

Université de Montréal

**Étude de l'immunité antivarielle chez l'enfant transplanté au
moyen de moelle osseuse ou de sang de cordon ombilical**

par
Anne-Julie Grenier

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Mars 2010

© Anne-Julie Grenier, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'immunité antivarielleuse chez l'enfant transplanté au moyen de
moelle osseuse ou de sang de cordon ombilical**

présenté par :
Anne-Julie Grenier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Michel Roger
Président-rapporteur

Hugo Soudeyns
Directeur de recherche

Sylvie Lesage
Membre du jury

RÉSUMÉ

L'infection primaire au VZV et la réactivation du VZV latent sont fréquemment observées à la suite d'une GMO ou d'une GSCO, ce qui cause de sérieuses complications chez le patient. Pour prévenir ces infections, une prophylaxie antivirale est administrée systématiquement chez tous les greffés de MO ou de SCO, alors qu'il n'existe aucun consensus sur la durée optimale d'une telle prophylaxie. Pour résoudre ce problème, notre objectif est de développer et valider une méthode ELISpot-VZV-IFN- γ qui permettra de suivre la reconstitution de l'immunité à médiation cellulaire anti-VZV chez les receveurs de GMO ou de GSCO et ainsi déterminer le moment opportun pour réduire ou interrompre la prophylaxie chez les receveurs de greffes de CSH. Dans un premier temps, des valeurs-seuil de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV chez la population pédiatrique saine ont dû être générées. À la lumière de nos résultats, un enfant avec un résultat ELISpot-VZV-IFN- γ > 190.0 SFU/10⁶ PBMC devrait être protégé contre une possible infection à VZV. Pour valider cette étude, une étude prospective de la reconstitution immunitaire anti-VZV a été effectuée chez 9 enfants greffés de MO ou de SCO. Nos résultats préliminaires ont montré qu'il n'y avait eu aucune reconstitution significative de l'immunité à médiation cellulaire anti-VZV dans les 18 premiers mois post-transplantation chez 8 de ces 9 enfants.

Les résultats de ces expériences vont fournir d'importantes informations quant à la reconstitution de l'immunité anti-VZV à la suite d'une GMO ou d'une GSCO et pourraient permettre l'amélioration des soins apportés aux receveurs de GMO ou de GSCO.

Mots clés : Varicella-zoster virus, varicelle, zona, greffe de cellules souches hématopoïétiques, ELISpot.

ABSTRACT

Primary infection with VZV and reactivation of latent VZV are commonly observed following BMT and UCBT, leading to serious complications in patients. As a result, antiviral prophylaxis is systematically administered to BMT and UCBT recipients, yet there is no consensus that defines its optimal duration. To resolve this problem, our objective was to develop and validate a VZV-IFN- γ -ELISpot with which reconstitution of VZV immunity can be followed in BMT and UCBT recipients, providing clinicians a practical tool to gauge the need for and adjust antiviral prophylaxis in individual HSCT recipients. First of all, threshold values for anti-VZV immunity in healthy pediatric subjects were generated. Based on our results, a child exhibiting > 190.0 VZV-specific SFU / 10^6 PBMC should be protected against a possible VZV infection. To validate these results, a prospective study on the recovery of VZV-specific T cell immunity was performed on 9 children following BMT or UCBT. Preliminary results demonstrated that there was no significant recovery of VZV-specific T cell immunity in the first 18 months post-transplantation in 8 of 9 cases.

Results of these experiments will yield important new information regarding reconstitution of anti-VZV immunity following BMT and UCBT and could lead to improvements in clinical management of BMT and UCBT recipients.

Keywords: Varicella-zoster virus, varicella, herpes zoster, hematopoietic stem cell transplantation, ELISpot.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xii
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Varicella-zoster virus	2
1.1.1 Aperçu du virus	2
1.1.2 Perspectives historiques.....	3
1.1.3 Pathogénèse	4
1.1.3.1 Varicelle	4
1.1.3.2 Zona.....	6
1.1.4 Épidémiologie.....	8
1.1.5 Structure du VZV	10
1.1.6 Cycle de réplication.....	11
1.1.7 Classification du VZV	13
1.1.8 Vaccins	15
1.2 Immunité antivarielleuse.....	16
1.2.1 Immunité innée.....	16
1.2.2 Immunité acquise.....	17
1.2.2.1 Immunité à médiation cellulaire.....	17
1.2.2.2 Immunité humorale	18
1.2.3 Les mécanismes d'évasion du VZV	19
1.3 Étude de la réponse à médiation cellulaire.....	19
1.3.1 Relâche de chrome	20
1.3.2 Marquage de cytokines intracellulaires	20

1.3.3 ELISpot	21
1.4 Greffe et transplantation.....	23
1.4.1 Transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH)	23
1.4.2 Greffe de moelle osseuse (GMO).....	24
1.4.3 Greffe de sang de cordon ombilical (GSCO)	25
1.4.4. Infections associées aux TCSH	28
1.4.4.1. Infection à VZV	29
1.4.4.1.1 Traitements actuels	32
1.5 Rationnel et hypothèses.....	33
Chapitre 2 : Génération de valeurs de référence de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV	36
Chapitre 3 : Étude prospective de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV post-transplantation	65
Chapitre 4 : Discussion	77
Chapitre 5 : Conclusion et perspectives.....	84
Références	87

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1. Pathologies causées par le Varicella-zoster virus.	3
Figure 2. Représentation schématique de la pathogenèse de l'infection à VZV....	5
Figure 3. Structure du Varicella-zoster virus.....	11
Figure 4. Cycle de réplication des herpesvirus.....	13
Figure 5. Schéma des principales étapes de l'ELISpot-IFN- γ	22
Figure 6. Compilation des principales infections associées aux TCSH durant la période pré- et post-transplantation.....	29
Figure 7. Les probabilités de contracter une maladie à VZV selon la source de CSH.....	30

Chapitre 2

Figure 1. Effects of irradiation of VZV antigen on observed frequency of IFN- γ - producing T lymphocytes.....	55
Figure 2. Quantification of VZV-specific cell-mediated immune responses in subjects from Group 1 using VZV-ELISpot and serial dilutions of antigen.....	56
Figure 3. Quantification of VZV-specific cell-mediated immune responses in subjects from Group 1, 2, and 3 using VZV-ELISpot.	57
Figure 4. Correlation between frequency of VZV-specific IFN- γ -producing T cells and age at study entry in subjects form Group 1.	58

Figure 5. Correlation between immunological responses to live attenuated VZV vaccine and age at study entry.	59
--	----

Chapitre 3

Figure 1. Quantification de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV chez les enfants greffés de MO ou de SCO pour chacun des temps étudiés.	73
Figure 2. Étude prospective de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV présentée pour chacun des enfants greffés de MO ou de SCO.	74

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau I. Compilation des virus herpétiques spécifiques à l'humain.	2
Tableau II. L'incidence de zona au sein des différents groupes d'âge.	9
Tableau III. Classification des souches de VZV selon différents auteurs.	14
Tableau IV. Maladies pouvant être corrigées par une transplantation de cellules souches hématopoïétiques.	23
Tableau V. Les avantages et les désavantages que comportent les greffes de MO et les greffes de SCO.	27

Chapitre 2

Tableau I. Clinical characteristics of study participants.	53
Tableau II. Frequency of VZV-specific T lymphocytes producing IFN- γ in children from Groups 1, 2, and 3.	54

Chapitre 3

Tableau I. Données cliniques des patients greffés de MO et de SCO recrutés pour l'étude prospective de l'immunité à médiation cellulaire anti- VZV post-transplantation.	69
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAS	anémie aplasique sévère
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl Phosphate et Nitro Blue Tetrazolium Chloride
CSH	cellules souches hématopoïétiques
DMSO	diméthylsulfoxyde
ELISpot	<i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>
GMO	greffe de moelle osseuse
gp	glycoprotéine
GSCO	greffe de sang de cordon ombilical
GvHD	<i>graft-vs-host disease</i>
HHV	<i>human herpes virus</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSV-1/-2	<i>herpes simplex virus type 1/type 2</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN-γ	interféron-gamma
IQ	intervalle interquartile
IL	interleukine
LAL	leucémie aigüe lymphoblastique
LANL	leucémie aigüe non-lymphoblastique
LTC	lymphocyte T cytotoxique
PBMC	<i>peripheral-blood mononuclear cell</i>

Pfu	<i>Plaque-forming unit</i>
MO	moelle osseuse
NK	<i>natural killer</i>
NPH	névralgies post-herpétiques
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SCO	sang de cordon ombilical
SVF	sérum de veau fœtal
TCSH	transplantation de cellules souches hématopoïétiques
T_H	<i>T helper</i> (lymphocyte T auxiliaire)
VZV	varicella-zoster virus

REMERCIEMENTS

Au terme de cette maîtrise, j'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Hugo Soudeyns, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que pour son encadrement et son suivi scientifique.

Je tiens vraiment et surtout à remercier Martine Caty, assistante de recherche du Dr Hugo Soudeyns, qui est tout simplement indispensable à plusieurs égards.

Et merci à mes partenaires de laboratoire, qui assurent le soutien technique et moral au quotidien et qui ont fait de ce lieu de travail un endroit si agréable; Natacha Merindol, Doris G. Ransy, Elyse Jolette, Mathieu Quesnel-Vallières et Fallah Chit.

Je voudrais finalement remercier mon copain Jean-Christophe et mes parents qui m'ont toujours encouragé dans mes projets et qui m'offrent un support inconditionnel!

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Varicella-zoster virus

1.1.1 Aperçu du virus

Le varicella-zoster virus (VZV) ou virus herpétique humain de type 3 (HHV-3, *human herpes virus 3*) est un membre de la sous-famille des *alphaherpesvirus* ayant des homologies avec les virus herpes simplex de type 1 et 2 (HSV-1/-2) (Tableau I). Il est l'agent étiologique de deux maladies cliniquement distinctes, soit la varicelle et le zona. La varicelle, qui représente l'infection primaire, se manifeste par une éruption cutanée généralisée. Toutefois, tout comme les autres *alphaherpesvirus*, le VZV établit une latence dans les tissus neuronaux à la suite de l'infection primaire. La réactivation du VZV latent dans les ganglions sensitifs postérieurs de la moelle épinière résulte en un zona, pathologie dont les éruptions cutanées sont douloureuses et localisées aux régions de la peau qui sont innervées par les cellules nerveuses au sein desquelles le virus s'était réfugié (Figure 1).

Tableau I. Compilation des virus herpétiques spécifiques à l'humain.

Noms formels	Noms communs	Sous-familles	Tropisme
Human herpes virus 1	Herpes simplex type 1 (HSV-1)	alphaherpesvirus	neurotrophique
Human herpes virus 2	Herpes simplex type 2 (HSV-2)	alphaherpesvirus	neurotrophique
Human herpes virus 3	Varicella-zoster virus (VZV)	alphaherpesvirus	neurotrophique
Human herpes virus 4	Epstein-Barr (EBV)	gammaherpesvirus	lymphotrophique
Human herpes virus 5	Cytomegalovirus (CMV)	betaherpesvirus	lymphotrophique
Human herpes virus 6/7	Roseolovirus (HHV-6/-7)	betaherpesvirus	lymphotrophique
Human herpes virus 8	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)	gammaherpesvirus	lymphotrophique

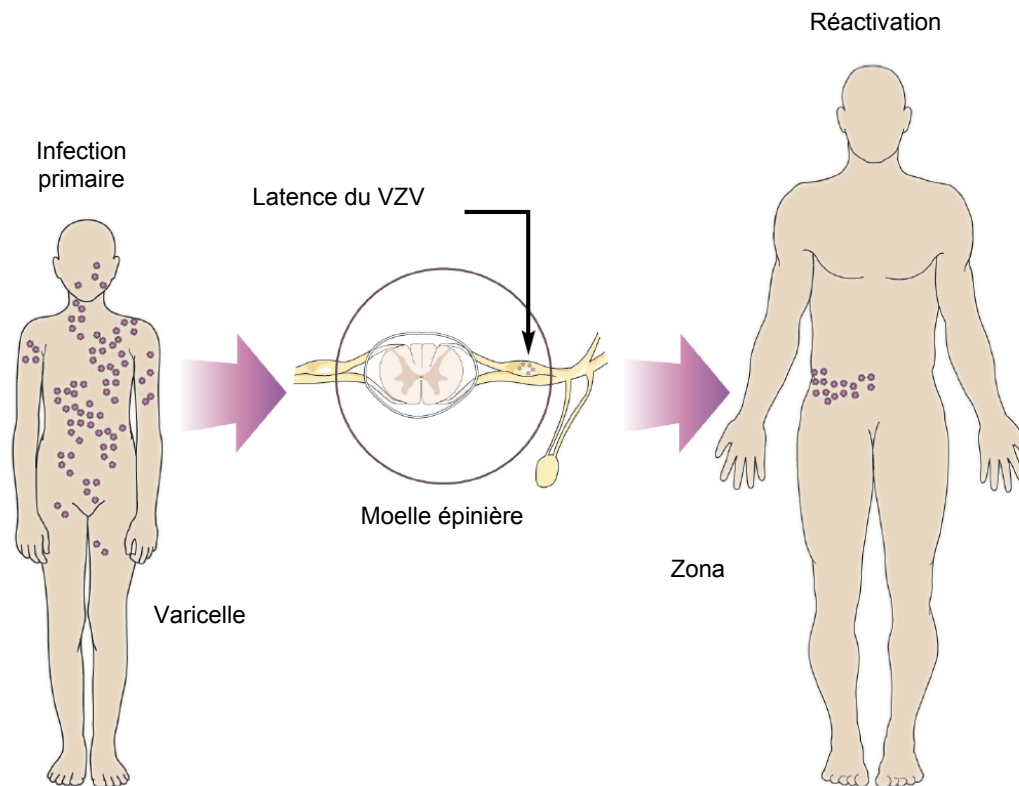


Figure 1. Pathologies causées par le *varicella-zoster virus* (adaptée de Weaver, 2009).

1.1.2 Perspectives historiques

C'est en 1888 que l'Allemand Janus von Bókay a émis pour la première fois l'hypothèse que la varicelle et le zona étaient causés par le même virus (Von Bókay, 1909). Il avait alors observé que des enfants contractaient la varicelle après avoir été en contact avec des adultes ayant le zona. Quelques années plus tard, cette hypothèse fut vérifiée. Pour ce faire, des fluides produits par les lésions du zona ont été inoculés chez 28 enfants âgés de moins de six ans sans histoire de varicelle. Parmi eux, 17 enfants ont contractés une varicelle à la suite de

l'inoculation (Kundratitz, 1925). En 1948, cette même hypothèse fut vérifiée à nouveau par microscopie électronique, où l'on a constaté que le virus de la varicelle et le virus du zona étaient identiques en apparence (Rake et al., 1948). En 1952, les chercheurs Weller et Stoddard ont isolé avec succès le virus de la varicelle et du zona à partir de cultures cellulaires (Weller, 1992; Weller et al., 1952). Le nom de *varicella-zoster virus* fut donné en 1958 (Weller et al., 1958) et il aura fallu attendre en 1965 pour que le Dr Edgar Hope-Simpson émette l'hypothèse que le zona était causé par une réactivation du virus de la varicelle resté latent dans l'organisme (Hope-Simpson, 1965). Finalement, le génome du VZV a été séquencé, séquence qui a été publiée en 1986 (Davison et al., 1986).

1.1.3 Pathogénèse

1.1.3.1 Varicelle

La varicelle est la maladie infectieuse la plus commune chez l'enfant dans les pays tempérés, où l'incidence est équivalente à la natalité en absence de vaccination. Elle est caractérisée par la formation d'une éruption vésiculaire généralisée qui s'accompagne de fièvre. La période d'incubation de la varicelle est en moyenne de 14-15 jours (10-21 jours) et on y retrouve deux phases de virémie qui se situent respectivement à environ 5 et 14 jours (Figure 2) (Grose, 1981; Heininger et al., 2006). Les éruptions, qui débutent lors de la deuxième virémie, vont être localisées sur le tronc, le visage et le cuir chevelu alors que les extrémités, telles que les mains et les pieds, sont habituellement épargnées (McCrary et al., 1999). La varicelle peut se transmettre de deux façons, soit par les voies respiratoires (1-2

jours avant le début des rougeurs) ou par contact avec les lésions cutanées (5-7 jours après l'apparition des rougeurs). La période de contagion se termine lorsque toutes les lésions se dessèchent (Sawyer et al., 1994; Sawyer et al., 1992; Suzuki et al., 2003).

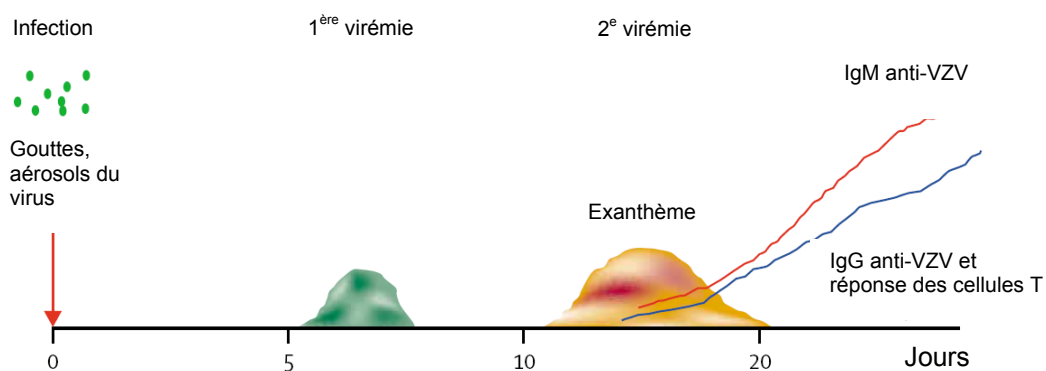


Figure 2. Représentation schématique de la pathogenèse de l'infection à VZV (adaptée de Heininger et al., 2006).

La varicelle est souvent considérée comme une maladie inévitable et bénigne de l'enfant. Cependant, elle peut entraîner des complications sévères chez certains groupes d'individus, dont les nouveau-nés, les adultes, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées. Les surinfections bactériennes des lésions de la peau causées par les streptocoques β -hémolytiques du groupe A et par *Staphylococcus aureus* sont les complications les plus communes associées à la varicelle. Ces infections incluent l'arthrite pyogénique, la fasciite nécrosante et l'ostéomyélite (Aebi et al., 1996; Tyrrell et al., 2005; Wilson et al., 1995). Les complications sévères liées au VZV peuvent également être d'ordre

neurologique. L'incidence des complications neurologiques associées à la varicelle est estimée à 1-3 par 10 000 cas (Guess et al., 1986). Les pathologies neurologiques les plus fréquentes sont les ataxies cérébelleuses et les encéphalites (Appelbaum et al., 1953; Heppleston et al., 1959) avec un taux d'incidence plus élevé chez les adultes et les bébés (Preblud, 1981). La pneumonie varicelleuse est une complication rare chez les enfants en santé, mais relativement fréquente chez les personnes immunodéprimées de tous âges ainsi que chez les adolescents et les adultes immunocompétents (Feldman, 1994; Gogos et al., 1992). Finalement, des complications d'ordre hématologique peuvent également survenir, telles que la thrombocytopenie (Feusner et al., 1979).

1.1.3.2 Zona

Le zona est, quant à lui, une maladie beaucoup plus douloureuse (picotements ou sensation de brûlure) qui consiste en une éruption vésiculaire localisée le long d'un dermatome. Après la primo-infection (varicelle), le VZV migre vers les ganglions rachidiens sensitifs postérieurs de la moelle épinière par un transport axonal rétrograde, puis devient latent. Par des mécanismes encore inconnus, le VZV peut se réactiver des années, voire des décennies plus tard, pour migrer vers la peau par un transport axonal antérograde et ainsi former les lésions caractéristiques du zona (Gilden et al., 1983; Lungu et al., 1995).

Le symptôme le plus observé est la forme intercostale (vésicules localisées sur le thorax). Cette éruption débute par le développement de macules érythémateuses,

suivies en 12-24 heures de vésicules qui évoluent vers la dessiccation et la formation de croûtes qui tombent en 7-10 jours (McCrary et al., 1999). Généralement, les éruptions auront lieu à l'endroit ayant été le plus touché par les éruptions varicelleuses, bien qu'elles puissent se produire à n'importe quel endroit sur le corps (Hope-Simpson, 1965). Il existe également une forme de zona avec une absence d'éruptions cutanées (*zoster sine herpette*) (Lewis, 1958). Le zona confère habituellement une immunité, mais des récurrences peuvent survenir, surtout chez les personnes immunodéprimées. L'incidence du zona augmente habituellement avec l'âge (> 50 ans) et l'immunodépression (e.g. greffes, VIH/Sida, cancers, prise d'immunosuppresseurs), les stress psychologiques et les traumatismes (Arvin, 1996). Par contre, même si le zona touche davantage les personnes âgées, trois populations pédiatriques sont particulièrement à risque, soit les enfants immunocompromis, les enfants ayant eu une exposition intra-utérine au VZV (Brunell, 1992; Enders et al., 1994; Lewkonia et al., 1973; Paryani et al., 1986; Pastuszak et al., 1994), et les enfants ayant eu la varicelle en très bas âge (> 1 an) (Baba et al., 1986; Kurlan et al., 2004). En effet, dans tous ces cas, l'inefficacité ou l'immaturité fonctionnelle du système immunitaire rend ce dernier incapable de monter une réponse anti-VZV appropriée, se traduisant ainsi par une réactivation varicelleuse précoce (Terada et al., 1994).

Les complications les plus fréquentes associées au zona sont d'ordre neurologique. Il s'agit principalement de névralgies post-herpétiques (NPH). Les NPH sont représentées par des douleurs violentes, constantes ou intermittentes, souvent

presque intolérables, survenant après la disparition des lésions. De telles douleurs peuvent persister pendant des mois, voire même des années, et ainsi diminuer considérablement la qualité de vie des personnes affectées (Dworkin et al., 1996). On ignore pourquoi de telles douleurs ne se développent que chez certains sujets et sont habituellement très rares chez les enfants (Banerjee, 1998). La sévérité de l'éruption du zona ne semble jouer aucun rôle. Parmi les autres complications neurologiques associées au zona, on retrouve les encéphalites aiguës et chroniques, le zona ophtalmique, la paralysie des nerfs crâniens et la paralysie périphérique dans la région du nerf atteint, incluant le syndrome de Ramsay-Hunt et la paralysie de Bell (Gilden et al., 2000). Les antiviraux peuvent réduire la sévérité et la durée de l'épisode de zona, mais ne peuvent malheureusement pas prévenir le zona et les NPH (Gnann et al., 2002; Kost et al., 1996).

1.1.4 Épidémiologie

L'épidémiologie de la varicelle diffère selon le climat, qu'il soit tempéré ou tropical (Wharton, 1996). Effectivement, dans les pays tempérés sans programmes de vaccination, la varicelle est associée à l'enfance et 90% des personnes seront infectées avant l'âge de 15 ans (Preblud, 1986). La situation est cependant inversée dans les pays tropicaux, où ce sont les adolescents et les adultes qui sont les plus touchés par cette maladie (Garnett et al., 1993; Lee, 1998; Lolekha et al., 2001; Longfield et al., 1990; Maretic et al., 1963). Les différences observées entre les différentes régions géographiques ne sont pas entièrement comprises, mais pourraient être dues à des différences dans les souches virales, à des conditions

environnementales qui limitent la survie de ce virus dans les tropiques, ou encore à des facteurs génétiques de l'hôte (Smith et al., 2009). Les adultes sont 9 à 15 fois plus à risque d'être hospitalisés et 25 fois plus susceptibles de mourir des suites de la varicelle. Aux États-Unis, avant l'implantation du programme de vaccination universelle en 1995, on notait 4 millions de cas de varicelle par année, incluant 10 632 hospitalisations (8 198-16 586) et 105 décès (Galil et al., 2002; Meyer et al., 2000).

Le zona, quant à lui, affecte principalement les personnes âgées bien qu'il puisse se développer à n'importe quel âge. Aux États-Unis, on retrouve 1 million de cas de zona par année parmi lesquels 50% des gens affectés ont plus de 50 ans (Oxman et al., 2005). De plus, bien que 10-20% des gens développent un zona durant leur vie, on estime à 50% le risque de contracter un zona après l'âge de 85 ans (Katz et al., 2004). Donc, l'incidence du zona augmente dramatiquement avec l'âge (Tableau II).

Tableau II. L'incidence de zona au sein des différents groupes d'âge (données tirées de Insinga et al., 2005)

Groupes d'âge	Incidence / 1 000 personnes
< 50 ans	1.1 - 2.9
50 – 59	4.6
60 – 69	6.9
70 – 79	9.5
> 80 ans	10.9

1.1.5 Structure du VZV

Au niveau structural, le VZV possède un génome d'ADN bicaténaire d'environ 125 000 pb codant pour plus de 70 cadres de lecture ouverts (Davison et al., 1986). Le génome est localisé dans une nucléocapside icosaédrique entourée de matériel protéinique amorphe, le tégument (Davison, 1991). Le tout est recouvert par une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées la majorité des glycoprotéines virales (Figure 3). Parmi celles-ci, on retrouve les glycoprotéines gB, gC, gE (glycoprotéine majeure de l'enveloppe), gH et gL ainsi que les protéines précoces IE4, IE62 et IE63 (Jones et al., 2006). Cette dernière semble avoir une fonction très importante dans la réplication virale puisqu'elle est fortement exprimée lors d'infection à la varicelle ou lors d'épisodes de zona (Jones et al., 2007).

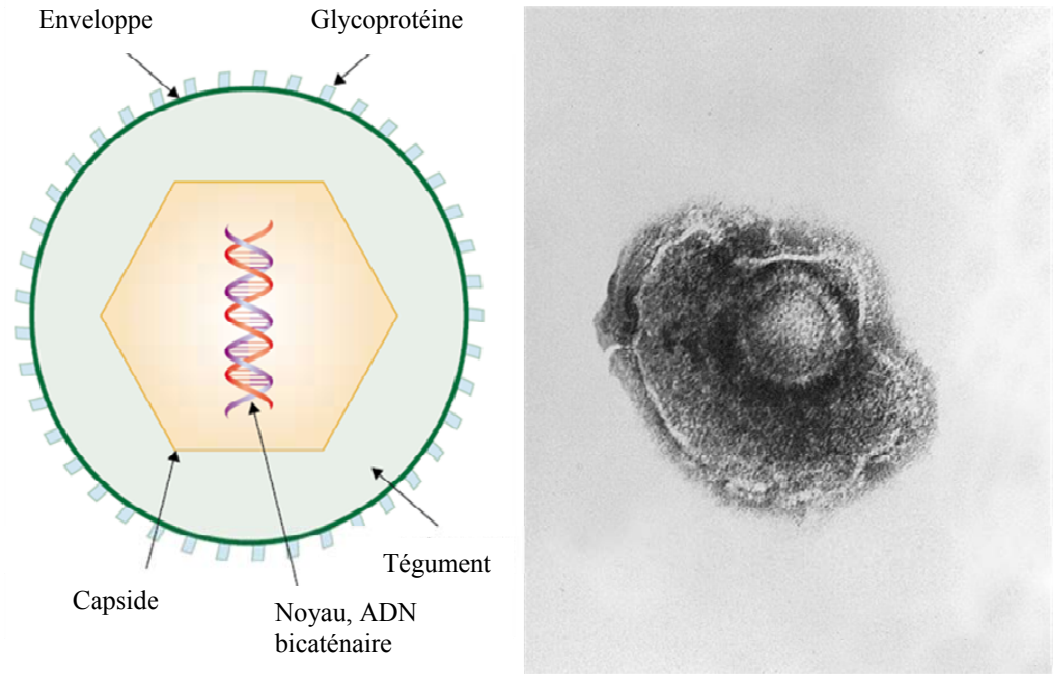


Figure 3. Structure du varicella-zoster virus (adaptée de Heininger et al., 2006; Palmer et al., 1982).

1.1.6 Cycle de réplication

Durant l'infection lytique du VZV, trois gènes sont exprimés de façon séquentielle tout comme chez les autres virus herpes simplex. Cette expression séquentielle mène à la production de protéines non-structurales précoces immédiates (IE, *immediate early*), de protéines non-structurales précoces (E, *early*) et finalement de protéines structurales tardives (L, *late*) (Cohrs et al., 2003). L'entrée du virus se fait par la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane plasmique de la cellule de l'hôte. Le VZV peut infecter plusieurs types cellulaires, dont les cellules T, les cellules B, les monocytes et les cellules dendritiques (Abendroth et al., 2001c; Ito et al., 2001; König et al., 2003). Une fois dans le cytoplasme de la

cellule, une partie du tégument se dissocie de la nucléocapside. Les protéines du tégument peuvent par la suite permettre de créer dans la cellule hôte un environnement bénéfique pour la réplication du virus. La nucléocapside est acheminée près du noyau grâce au système de microtubules. Elle peut par la suite injecter son ADN dans le noyau à travers les pores nucléaires. Après la réplication de l'ADN viral, celui-ci est incorporé dans des capsides préformées, puis quitte le noyau par bourgeonnement à partir de la membrane nucléaire interne. L'enveloppe primaire des virions se forme dans l'espace périnucléaire, puis cette enveloppe fusionne avec la membrane nucléaire externe et le virion est ainsi relâché dans le cytoplasme. Par la suite, les virions subissent un ré-enveloppement dans l'appareil de Golgi et sont finalement relâchés dans le milieu extracellulaire à la suite d'une fusion avec la membrane cellulaire (Figure 4) (Mettenleiter, 2004).

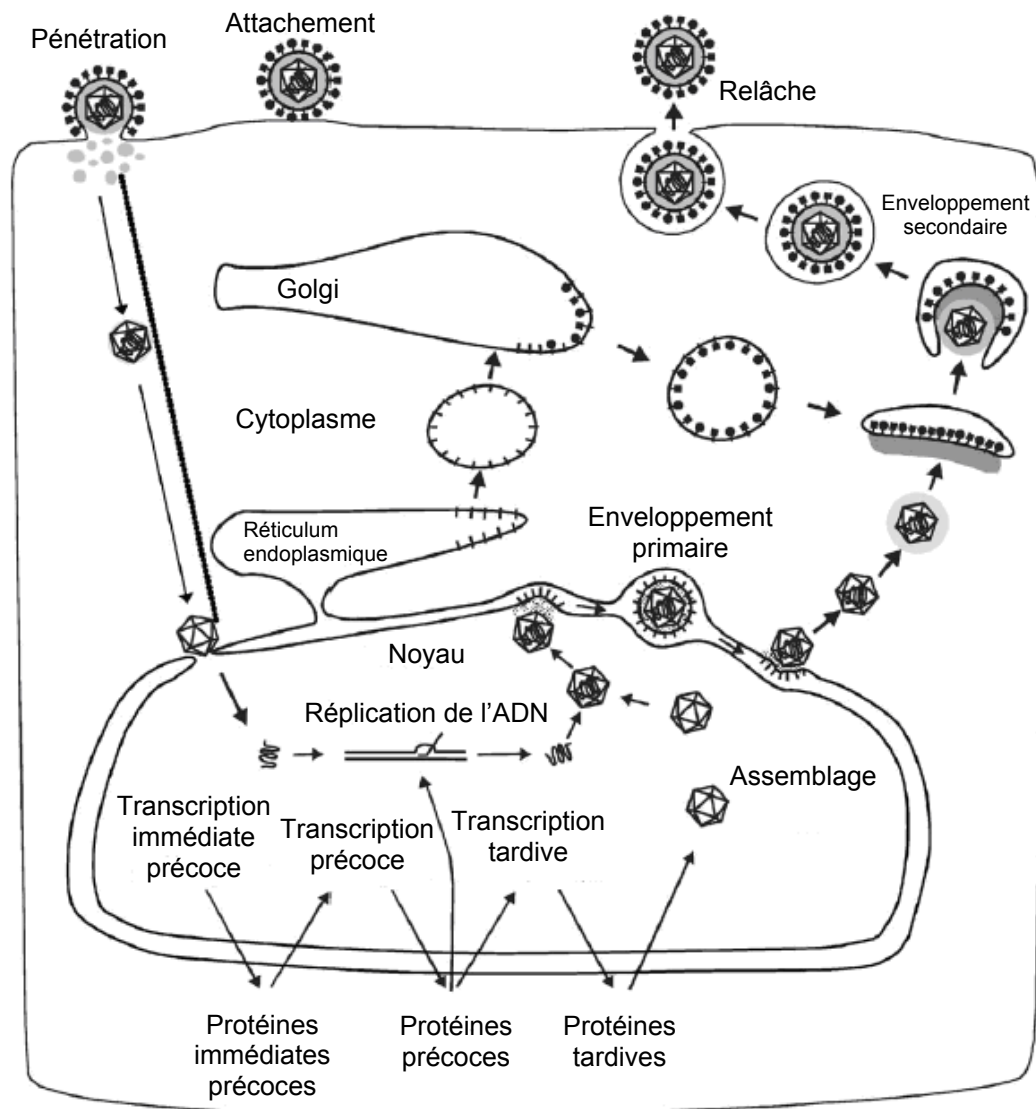


Figure 4. Cycle de répliation des herpesvirus (adaptée de Mettenleiter, 2004).

1.1.7 Classification du VZV

Le VZV est l'un des virus herpétiques humains les plus stables génétiquement (Tyler et al., 2007). Plusieurs facteurs contribuent à cette stabilité, dont la capacité de l'ADN polymérase à corriger efficacement les erreurs produites grâce à son activité exonucléasique 3'→5' qui permet d'exciser une base erronée au cours de la

réplication (activité *proofreading*) (Baker et al., 1998). Cependant, on peut tout de même observer une certaine variabilité entre les différentes souches de VZV. Étant donné le taux très bas de substitution de nucléotides, la recombinaison doit possiblement avoir joué un rôle crucial dans l'évolution du VZV. Il n'existe cependant aucun consensus dans la littérature sur la nomenclature des clades de VZV (Tableau III). Par contre, un article publié récemment propose une nouvelle nomenclature afin de standardiser la classification du VZV (Breuer et al., 2010).

Tableau III. Classification des souches de VZV selon différents auteurs.

Références	Loparev et al. 2009	Barett-Muir et al. 2003; Carr et al. 2004; Quinlivan et al. 2002.	Dayan et al. 2004; Sergeev et al. 2006	Peters et al. 2006	Distribution géographique
Génotypes	E1	C	E	A	Europe / Amérique du Nord
	E2	B	E	D	Europe / Amérique du Nord
	J	J	J	B	Japon
	M1	A	M1	--	Asie /Afrique
	M2	J	M2	C	Asie /Afrique
	M3	--	M3	--	Afrique
	M4	--	M4	--	Afrique

1.1.8 Vaccins

Le VZV est le seul virus herpétique pour lequel il existe des vaccins. Trois vaccins contre la varicelle sont actuellement sur le marché, soit le Varivax[®] III (Merck Frosst : 1 350 pfu/ml), le Varilrix[®] (GlaxoSmithKline : 1 995 pfu/ml) et le Priorix-Tetra[™] (GlaxoSmithKline : 1 996 pfu/ml) (Protocole d'immunisation du Québec). Le Varivax[®] III et le Varilrix[®] sont des vaccins monovalents alors que le Priorix-Tetra[®] est un vaccin tétravalent conférant en plus une immunité contre la rougeole, la rubéole et les oreillons. Tous ces vaccins sont constitués de virus vivants et atténués de la souche OKA, une souche développée au Japon au milieu des années 70 (Takahashi et al., 1974). Depuis peu, au Canada, on retrouve également un vaccin contre le zona administré chez les personnes âgées de plus de 60 ans, le Zostavax[®] (Merck Frosst : 19 400 pfu/ml). Ce vaccin renferme les mêmes ingrédients que les vaccins existants pour combattre la varicelle chez les enfants, mais il est plus concentré en virus (Protocole d'immunisation du Québec).

Aux États-Unis, il existe un programme de vaccination contre la varicelle depuis 1995 visant essentiellement à éradiquer cette maladie chez les enfants. Plusieurs pays ont depuis adopté un tel programme de vaccination universelle. Au Québec, le vaccin pour combattre la varicelle a été inclus dans le calendrier de vaccination à l'âge de 12 mois en 2006 (Calendrier régulier de vaccination). Actuellement, les enfants âgés de 12 mois à 12 ans ne reçoivent qu'une seule dose de vaccin alors que l'on administre deux doses de vaccin chez les enfants âgés de plus de 13 ans (Protocole d'immunisation du Québec). Ces vaccins ont considérablement

diminués les cas de varicelle observés ainsi que les taux de mortalité et de morbidité qui y sont rattachés (Guris et al., 2008; Reynolds et al., 2008; Seward et al., 2002). Cependant, l'utilisation de ces vaccins demeure controversée puisque des études ont démontré que les cas de zona étaient en hausse depuis l'introduction du programme de vaccination universelle (Patel et al., 2008; Rimland et al.). En effet, il semblerait que des expositions occasionnelles à la varicelle permettraient aux adultes d'augmenter leur immunité anti-VZV, et ainsi de les protéger d'une éventuelle réactivation varicelleuse (Brisson et al., 2002; Thomas et al., 2002). D'autres études viennent cependant ajouter un bémol à ces études, puisqu'on a également noté des augmentations de zona à certains endroits où il n'existe pas de programme de vaccination (Perez-Farinos et al., 2007; Russell et al., 2007).

1.2 Immunité antivarielle

1.2.1 Immunité innée

Lors de l'infection primaire au VZV, la première réponse de l'hôte contre ce virus est médiée par la réponse innée et comprend la production de cytokines antivirales et l'activation des cellules NK. Ces réponses sont nécessaires afin de contrôler le VZV aux sites des muqueuses et ainsi limiter l'étendue de l'infection et la réplication du virus (Arvin, 2008). Les cellules NK peuvent lyser les cellules infectées par le VZV en plus de produire de l'interféron- γ (IFN- γ) qui est

nécessaire pour l'expansion clonale des lymphocytes T VZV-spécifiques (Ihara et al., 1991).

1.2.2 Immunité acquise

1.2.2.1 Immunité à médiation cellulaire

Il est clairement établi que c'est l'immunité à médiation cellulaire, comprenant les lymphocytes T auxiliaires (Th) $CD4^+$ et les lymphocytes T cytotoxiques (LTC) $CD8^+$, qui est responsable du contrôle de la dissémination et de la réapparition du VZV (Jones et al., 2007). La réactivation varicelleuse corrèle fortement avec le déclin du nombre de lymphocytes T VZV-spécifiques, telle que proposé par Edgar Hope-Simpson en 1965 (Hope-Simpson, 1965). Les observations faites durant les quatre dernières décennies supportent toujours cette hypothèse (Arvin, 1992; Burke et al., 1982; Dolin et al., 1978; Hayward et al., 1987; Levin et al., 2003; Oxman, 1995; Weller, 1983; Wilson et al., 1992). De plus, les personnes souffrant d'une déficience en cellules T sont beaucoup plus susceptibles de développer une varicelle qui évoluera vers une forme sévère, ce qui démontre bien l'importance de la réponse immunitaire médiée par les cellules T pour le contrôle de l'infection VZV (Gershon et al., 1997). Le nombre de lymphocytes T VZV-spécifiques avec des capacités prolifératives a été estimé à environ 1 : 40 000 PBMC (Hayward et al., 1986). Ces derniers reconnaissent aussi bien les glycoprotéines virales que les protéines aux fonctions régulatrices ou structurales (Arvin et al., 1991). Basé sur le profil de cytokines, les cellules T $CD4^+$ spécifiques au VZV sont majoritairement

de type Th1 puisqu'elles relâchent de l'interleukine (IL)-2 et de l'IFN- γ , mais très peu d'IL-4 (Zhang et al., 1994). L'existence des cellules T CD8⁺ VZV spécifiques a déjà été démontrée (Frey et al., 2003). Cependant, les cellules T CD8⁺ VZV spécifiques n'étaient détectables qu'après une expansion *in vitro*, ce qui suggère qu'elles circulent à une fréquence relativement faible (Jones et al., 2006). Asanuma et al. ont démontré que les lymphocytes T VZV-spécifiques circulants appartenaient à la sous-population des cellules T CD4⁺, alors les cellules T CD8⁺ étaient indétectables (Asanuma et al., 2000). Cet aspect de l'immunité à médiation cellulaire semble être particulier au VZV, puisque l'on peut facilement détecter, avec les mêmes méthodes, des cellules T CD8⁺ spécifiques à d'autres virus herpétiques (EBV et CMV) de même qu'au VIH (Callan et al., 1998; Champagne et al., 2001).

1.2.2.2 Immunité humorale

Lors de la primo-infection, la réponse humorale joue également un rôle dans la défense de l'hôte. En effet, dans les trois jours suivants l'apparition des éruptions, il est possible de détecter des anticorps anti-VZV de type IgG, IgM et IgA (Arvin, 1996). Par la suite, seules les immunoglobulines de type IgG vont persister chez l'hôte (Figure 2). Par contre, des évidences indirectes semblent démontrer que la réponse humorale a un rôle de moindre importance que la réponse à médiation cellulaire, étant donné que les personnes ayant un déficit en lymphocytes B (*e.g.* agammaglobulinémie) n'auront pas nécessairement de varicelles sévères (Webster et al., 1988). De plus, lors d'une réactivation varicelleuse, on note une diminution

du nombre de lymphocytes T VZV-spécifiques alors que les anticorps de type IgG demeurent les mêmes (Webster et al., 1989).

1.2.3 Les mécanismes d'évasion du VZV

Le VZV a développé plusieurs mécanismes d'évasion pour contrer la réponse immunitaire. En effet, le VZV, via la protéine kinase codée par le cadre de lecture 66, est capable d'empêcher la présentation des peptides viraux aux cellules T par les molécules du CMH I et II en séquestrant ces dernières au niveau de l'appareil de Golgi (Abendroth et al., 2001a; Abendroth et al., 2001b; Abendroth et al., 2000; Cohen, 1998; Eisfeld et al., 2007). De plus, il serait possible que le VZV puisse inhiber l'expression d'ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), une protéine d'adhésion capable de se lier, entre autres, aux macrophages et aux lymphocytes (Nikkels et al., 2004).

1.3 Étude de la réponse à médiation cellulaire

Il existe plusieurs méthodes couramment utilisées pour étudier la réponse à médiation cellulaire. Il est possible d'étudier cette réponse via la cytotoxicité des cellules T (*e.g.* relâche de chrome) ou via la production de cytokines par les cellules T (*e.g.* marquage de cytokines intracellulaires, ELISpot). Ces trois techniques seront brièvement discutées dans cette section du mémoire.

1.3.1 Relâche de chrome

La méthode standard pour l'étude des fonctions cytotoxiques des cellules T est la l'essai de relâche de chrome (Brunner et al., 1968). Il s'agit de marquer au Cr⁵¹ les cellules infectées par le virus à l'étude et d'ajouter par la suite des LTC dans le milieu. La quantité de chrome radioactif présent dans le surnageant, libéré lors de la lyse, permet de fournir une mesure de l'activité cytotoxique des LTC.

1.3.2 Marquage de cytokines intracellulaires

La production de cytokines par les cellules T peut être détectée par marquage de cytokines intracellulaires et cytométrie en flux. Pour ce faire, les cellules T sont d'abord stimulées, habituellement avec du phorbolmyristate acétate (PMA) ou de l'ionomycine. Par la suite, de la brefeldine A est ajoutée afin de bloquer le transport des cytokines à travers l'appareil de Golgi et ainsi prévenir la sécrétion des cytokines. Les cellules T sont par la suite fixées et perméabilisées (pour permettre l'entrée des anticorps spécifiques aux cytokines) et marquées pour la présence de cytokines intracellulaires en utilisant des anticorps anti-cytokines couplés à des fluorochromes (Prussin et al., 1995). Cette technique a l'avantage de permettre l'analyse d'un nombre élevé de cellules T dans une courte période de temps et l'analyse simultanée de plusieurs cytokines marquées avec différents fluorochromes (Hickling, 1998).

1.3.3 ELISpot

L'essai ELISpot (*enzyme-linked immunospot*) est l'une des techniques de choix pour mesurer les réponses à médiation cellulaire. Cette méthode a été développée par l'immunobiologiste Cecil Czerkinsky en 1983 (Czerkinsky et al., 1983) et adaptée telle qu'on la connaît en 1988 (Czerkinsky et al., 1988). Il s'agit d'une méthode immunoenzymatique qui permet de dénombrer des cellules spécifiques à un antigène à partir de leur sécrétion d'une ou plusieurs cytokines données. Cette méthode comporte plusieurs avantages comparativement aux deux autres techniques présentées ci-haut. En plus d'être une technique non-radioactive, elle nécessite peu de cellules, qui peuvent être aussi bien des cellules fraîchement isolées que congelées (Smith et al., 2007). De plus, la technique est facilement reproductible et hautement sensible (Karlsson et al., 2003; Lalvani et al., 1997; Larsson et al., 1999; Lindemann et al., 2006). Parmi les différents types d'ELISpot, l'ELISpot-IFN- γ est de loin le plus utilisé (Figure 5).

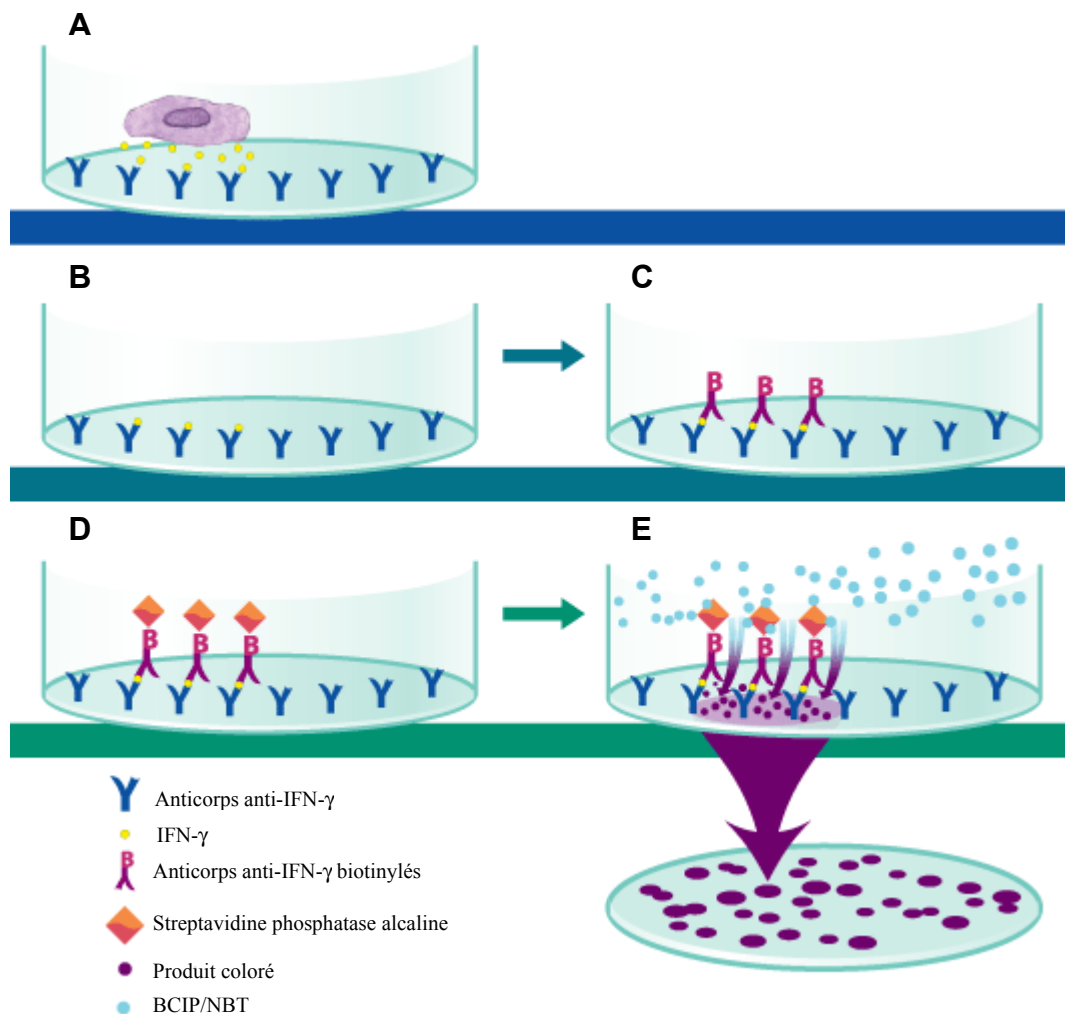


Figure 5. Schéma des principales étapes de l'ELISpot-IFN- γ . **A.** Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont mises en contact avec l'antigène dans un puits où ont été préalablement fixés les anticorps primaires anti-IFN- γ . **B.** Les anticorps primaires anti-IFN- γ captent les molécules d'IFN- γ qui ont été sécrétées. **C.** Les anticorps secondaires anti-IFN- γ biotinylés se lient aux molécules d'IFN- γ . **D.** Ajout de la streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline, qui se lie à la biotine. **E.** Ajout du substrat chromogène (BCIP/NBT) qui réagit avec la streptavidine/phosphatase alcaline pour former un produit coloré qui précipite de façon localisée.

1.4 Greffe et transplantation

1.4.1 Transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH)

Originellement un traitement de dernier recours, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) est maintenant effectuée au tout début du développement de certaines maladies (Copelan, 2006). Elle vise essentiellement à remédier à la situation chez les personnes ayant une insuffisance de la moelle osseuse, une hémopathie maligne ou une enzymopathie (Tableau IV).

Tableau IV. Maladies pouvant être corrigées par une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (tiré de Champagne et al., 2006).

Déficits	Maladies
Insuffisance de la moelle osseuse	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Totale (aplasie médullaire) :</u> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Idiopathique ▪ Génétique : Fanconi et autres ▪ <u>Partielle :</u> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Déficits immunitaires sévères ▪ Hémoglobinopathies <ul style="list-style-type: none"> ▪ Drépanocytose ▪ Thalassémie majeure
Hémopathies malignes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leucémies aiguës ▪ Hémopathies malignes chroniques <ul style="list-style-type: none"> ▪ Leucémie myéloïde chronique ▪ Leucémie myélomonocytaire chronique juvénile
Enzymopathies	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Certaines mucopolysaccharidoses (<i>e.g.</i> Hurler) ▪ Adrénoleucodystrophies (<i>e.g.</i> Krabbe)

En excluant le sang périphérique, on retrouve principalement deux sources de cellules souches hématopoïétiques (CSH), soit la moelle osseuse (MO) et le sang de cordon ombilical (SCO); chacune des sources comporte des avantages et des inconvénients qui lui sont propres (Tableau V). Avant d'effectuer une TCSH, il faut d'abord faire un conditionnement du receveur afin d'éliminer toutes les cellules du système immunitaire ainsi que les cellules tumorales s'il y a lieu. Ceci se fait par des traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie à forte dose. La greffe en question consiste plutôt en une transfusion de CSH provenant de l'une des 2 sources mentionnées ci-haut, qui migreront jusqu'à la MO grâce à diverses chimiokines et récepteurs de chimiokines. Une fois dans la MO du receveur, les CSH se différencieront pour reconstituer le système hématopoïétique et, par le fait même, le système immunitaire (Copelan, 2006).

1.4.2 Greffe de moelle osseuse (GMO)

Depuis le début des années 1980, la greffe de MO a été de plus en plus utilisée comme traitement contre de nombreuses maladies hématologiques, dont la leucémie, le lymphome, l'anémie aplasique et des immunodéficiences, particulièrement l'immunodéficiences combinée sévère (SCID, *severe combined immunodeficiency*) (Goldsby et al., 2000). Cependant, l'utilisation des cellules de la MO pour des transplantations comporte des inconvénients considérables. D'abord, la compatibilité HLA (*human leukocyte antigen*) entre les cellules du donneur et celles du receveur est primordiale. En fait, c'est l'élément principal qui détermine le succès de la greffe (Rubinstein, 2006). Les types HLA du donneur et

du receveur doivent être les plus apparentés possibles afin d'éviter de déclencher une réaction de rejet. Le rejet peut s'effectuer dans les deux sens, soit c'est l'hôte qui n'accepte pas le greffon comme étant le sien, soit c'est le greffon qui ne tolère pas l'hôte. Lors d'une transplantation de MO, le système immunitaire du receveur est très affaibli ou inexistant. Le risque que l'hôte rejette le greffon est alors peu probable. Dans ce cas, il se produit alors l'apparition de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD, *graft-vs-host disease*). La GvHD survient donc lorsque les cellules du donneur (greffon) reconnaissent les allo-antigènes des tissus de l'hôte. Cela a pour effet de mener à une activation et à une prolifération des cellules T du greffon, suivi d'une production subséquente de cytokines qui génèrent des réactions inflammatoires au niveau de la peau, du tractus gastro-intestinal et/ou du foie et dont la gravité peut varier (Przepiorka et al., 1995). La nécessité d'une compatibilité HLA presque parfaite lors d'une greffe de MO apporte donc l'inconvénient de limiter les donneurs potentiels.

1.4.3 Greffe de sang de cordon ombilical (GSCO)

Longuement considéré comme un déchet biologique, le SCO est maintenant reconnu pour sa richesse en CSH. La première GSCO a été faite par le Dr Éliane Gluckman et son équipe en 1989 à l'hôpital Saint-Louis de Paris chez un enfant atteint d'une maladie héréditaire rare et mortelle de la moelle osseuse, la maladie de Fanconi (Gluckman et al., 1989). Il s'agissait d'une greffe avec une compatibilité HLA parfaite de 6/6. Depuis ce temps, plus de 20 000 GSCO ont été rapportées dans le monde et plus de 400 000 unités de SCO ont été conservées

dans plus de 100 banques de SCO (Gluckman, 2009). Par contre, étant donné la quantité limitée (100-150 ml) de SCO obtenu, la GSCO est une option thérapeutique avantageuse seulement pour les personnes pesant moins de 40-50 kg (Champagne et al., 2006). La GSCO comporte cependant plusieurs avantages. Premièrement, elle nécessite une compatibilité HLA moins rigoureuse (4/6 ou plus) que la GMO, ce qui a pour effet d'augmenter la rapidité avec laquelle il est possible de trouver un donneur compatible (Kurtzberg et al., 1996). De plus, la transmission d'infections virales ainsi que l'incidence de GvHD sont plus faibles (Gluckman et al., 1997; Rubinstein et al., 1998; Wagner et al., 1995). Cependant, dû à une reconstitution immunitaire plus lente que lors d'une GMO, les infections sont plus communes après une GSCO (Copelan, 2006). Plusieurs études ont démontré que le nombre de cellules récoltées lors d'un prélèvement de SCO était étroitement relié à la reprise hématologique après la greffe (Gluckman, 2006; Gluckman et al., 2004a; Gluckman et al., 1997; Rubinstein et al., 1998; Wagner et al., 2002; Wagner et al., 1995). De plus, la disparité en HLA augmente les besoins en cellules souches (Eapen et al., 2007; Gluckman et al., 2004b).

Tableau V. Les avantages et les désavantages que comportent les greffes de MO et les greffes de SCO (tiré de Champagne et al., 2006).

	Moelle osseuse	Sang de cordon ombilical
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Accès au donneur après le don initial pour infusion de lymphocytes au receveur et possibilité de 2^e don en cas d'échec de la greffe. • Contenu cellulaire élevé. 	<ul style="list-style-type: none"> • Accès illimité. • Flexibilité immunologique diminuant le degré de compatibilité HLA requis. • Incidence plus faible de GvHD. • Incidence moindre d'infection à CMV et EBV. • Disponibilité sous forme congelée permettant une flexibilité de calendrier pour la préparation à la greffe. • Représentation ethnique maintenue et évoluant avec le profil changeant de la population. • Sécuritaire pour le donneur. • Cryopréservation prolongée possible.
Désavantages	<ul style="list-style-type: none"> • Grand nombre requis de volontaires. • Incidence élevée de GvHD. • Haut degré requis de compatibilité HLA. • Morbidité pour le donneur. • Déséquilibre racial. 	<ul style="list-style-type: none"> • Contenu cellulaire limité. • Reconstitution hématopoïétique plus lente et parfois incomplète. • Risque de maladies non infectieuses transmissibles compte tenu d'un historique médical limité. • Coûts élevés d'infrastructure (banque de sang de cordon).

1.4.4. Infections associées aux TCSH

Le conditionnement de l'hôte induit chez le receveur un important déficit immunologique le rendant vulnérable à d'éventuelles complications infectieuses. On peut séparer la période de transplantation en trois phases, soit la phase I (pré-greffe; < 15-45 jours), la phase II (post-greffe; 30-100 jours) et la phase III (phase tardive; > 100 jours) (Figure 6). Durant la phase I, la neutropénie et les bris dans la barrière mucocutanée résultent en des risques substantiels d'infections bactériennes et fongiques, incluant les espèces *Candida* et *Aspergillus*. De plus, la réactivation des virus herpes simplex se produit également lors de la première phase. Durant la phase II, les infections sont principalement dues à une déficience dans l'immunité à médiation cellulaire. On retrouve alors des infections virales causées, entre autres, par le cytomégalovirus (CMV) et le virus d'Epstein-Barr (EBV). D'autres pathogènes dominants retrouvés durant cette phase sont les *Aspergillus* et les *Pneumocystis jiroveci*. Finalement, durant la phase III, qui correspond également à la phase de GvHD chronique, les greffés de CSH sont très susceptibles au VZV, CMV et aux bactéries encapsulées (e.g. *Streptococcus pneumoniae*). Le risque de contracter ces infections est proportionnel à la sévérité de la GvHD durant la phase II et III. Les infections causées par les virus entériques et respiratoires demeurent élevées durant les trois phases de la greffe (Tomblyn et al., 2009).

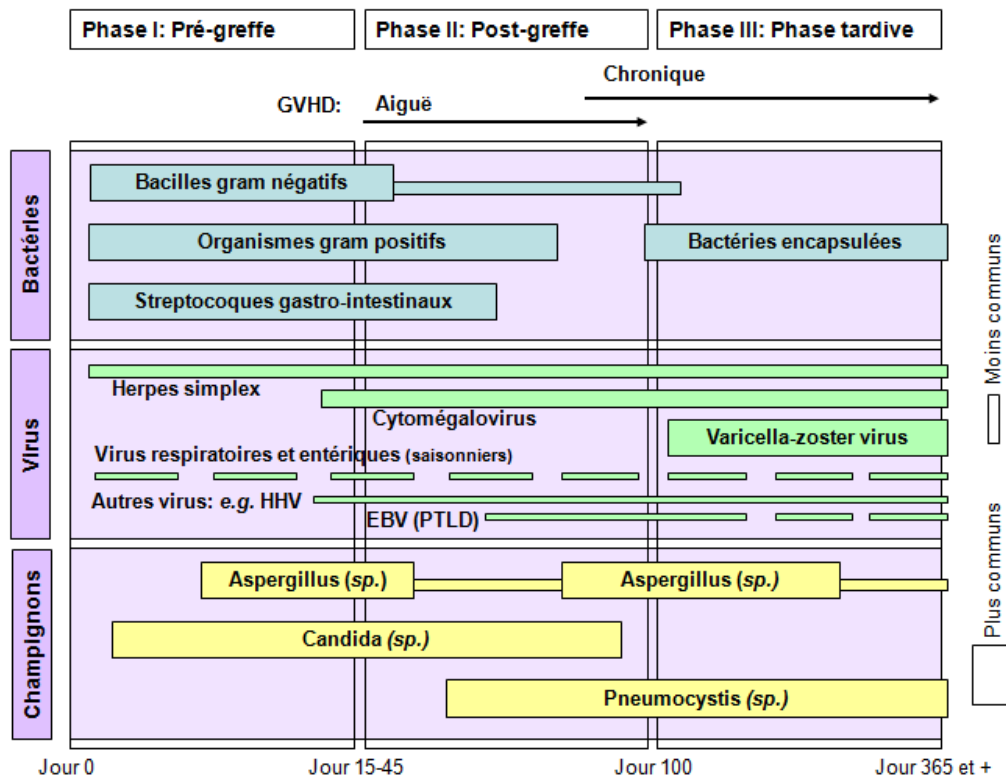


Figure 6. Compilation des principales infections associées aux TCSH durant la période pré- et post-transplantation (adaptée de Tomblyn et al., 2009).

1.4.4.1. Infection à VZV

Les infections à VZV sont parmi les infections virales les plus communes après une TCSH, avec un taux d'incidence variant de 25% à 68% (Atkinson et al., 1980; Han et al., 1994; Koc et al., 2000; Schuchter et al., 1989). Les infections à VZV observées chez les greffés de CSH peuvent apparaître sous forme d'infection primaire (varicelle) ou plus souvent sous forme d'infection secondaire (zona). Chez les patients immunodéprimés, les lésions sont plus lentes à guérir et plus susceptibles d'être infectées. Les infections vont généralement demeurer confinées

à la peau bien que des disséminations viscérales puissent se produire. Ces dernières sont associées à un sérieux taux de morbidité et de mortalité (Locksley et al., 1985).

L'incidence cumulative des infections à VZV diffère selon le type de greffe. Effectivement, une étude a démontré que les maladies à VZV étaient plus fréquentes et sévères à la suite d'une GSCO (46%) que d'une GMO (31%) à 3 ans post-transplantation (Figure 7) (Vandenbosch et al., 2008).

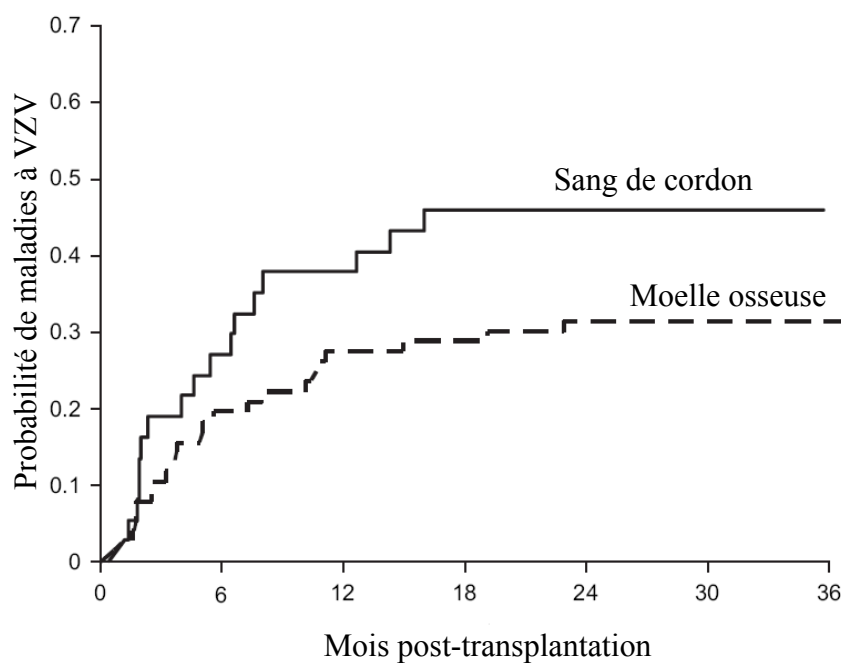


Figure 7. Les probabilités de contracter une maladie à VZV selon la source de CSH (tirée de Vandenbosch et al., 2008).

Deux facteurs principaux peuvent expliquer ce fait. D'abord, la MO et le SCO se distinguent au niveau de leur composition en lymphocytes T. La MO contient des cellules T mémoires spécifiques aux antigènes alors que les cellules T retrouvées au sein du sang de cordon expriment un phénotype naïf, n'ayant jamais rencontré leur antigène. Cette absence de cellules T mémoires pourrait expliquer en partie le fait que l'on observe une incidence plus élevée de varicelle et de zona chez les greffés de SCO. De plus, la reconstitution immunitaire diffère après une GMO et une GSCO. En effet, la reconstitution immunitaire à la suite d'une GSCO est caractérisée par un délai dans la reconstitution des cellules T CD8⁺. Ces dernières sont très peu nombreuses durant les 6 à 9 premiers mois post-transplantation. On note également un délai relatif dans la restauration du nombre de cellules T CD4⁺, mais de moindre importance. Les cellules NK et les cellules B sont, quant à elles, restaurées très rapidement tout comme lors d'une GMO (Giraud et al., 2000; Thomson et al., 2000; Vandebosch et al., 2008), suggérant que les cellules NK et les cellules B n'ont pas un rôle prédominant dans le contrôle du VZV en post-greffe.

Les maladies à VZV apparaissent relativement plus tard (*i.e.* phase tardive de la greffe : > 100 jours) que la majorité des autres virus associés aux TCSH (Figure 6) (Tomblyn et al., 2009). La GvHD chronique, qui se produit durant la phase tardive, a été identifiée comme étant le principal risque d'infections à VZV (Ljungman et al., 1986; Steer et al., 2000), mais cette hypothèse demeure controversée. Une étude publiée en 2006 a démontré que les infections à VZV

étaient reliées à la thérapie immunosuppressive qui suit la greffe plutôt que la GvHD chronique elle-même, bien que les deux soient reliées (Boeckh et al., 2006). Une autre hypothèse pour expliquer que les infections à VZV se produisent principalement après 100 jours post-transplantation repose sur la nécessité des cellules T pour la propagation du VZV. Il est connu que le VZV a besoin des lymphocytes T pour sa propagation (Ku et al., 2004; Moffat et al., 1995; Soong et al., 2000). De plus, une étude récemment publiée démontre que la pathogénèse du VZV implique l'infection des cellules dendritiques (Huch et al., 2010). Alors, dans les deux dernières hypothèses, une reconstitution immunitaire suffisamment complète est nécessaire pour que le VZV puisse causer une varicelle ou un zona, ce qui expliquerait pourquoi les infections à VZV apparaissent durant la phase tardive de la greffe.

1.4.4.1.1 Traitements actuels

Afin de prévenir les infections à VZV chez les enfants greffés de MO ou de SCO, une prophylaxie antivirale est administrée de façon systématique chez tous les enfants greffés pour une période de 12 mois (Boeckh et al., 2006). Les antiviraux couramment utilisés sont tous des analogues de la guanosine, soit l'acyclovir, le famciclovir (ester valine penciclovir) et le valacyclovir (ester valine acyclovir) (Tomblyn et al., 2009). La toxicité de ces molécules utilisées à long terme demeure un sujet controversé puisque plusieurs études ont démontré la néphrotoxicité de ces agents (Bianchetti et al., 1991; Brigden et al., 1982; Giustina et al., 1988; Hernandez et al., 1991; Schreiber et al., 2008) alors que d'autres

études ont montré l'innocuité de ces antiviraux utilisés à petites doses (Boeckh et al., 2006; Htwe et al., 2008; Shinjoh et al., 2009).

1.5 Rationnel et hypothèses

Considérée comme une maladie infectieuse bénigne de l'enfant, la varicelle n'en représente pas moins un réel problème en termes de morbidité et de mortalité, particulièrement chez les sujets immunodéprimés. Chez les enfants qui ont subi une GMO ou une GSCO, l'infection par le VZV et/ou la réactivation d'une varicelle latente sous forme de zona sont de fréquentes et sérieuses complications. Comme les enfants en rémission recouvrent des activités sociales normales, ils sont donc exposés au VZV dans la communauté. Du coup, un nombre considérable d'enfants ayant subi une GMO ou une GSCO seront touchés par une maladie à VZV (Kawasaki et al., 1996; Vandenbosch et al., 2008). Malgré le fait que tous ne développeront pas une varicelle, cette découverte a forcé l'implantation au CHU Sainte-Justine, depuis mai 2006, d'une prophylaxie antivarielle systématique (famciclovir) chez tous les enfants transplantés de la moelle ou du cordon. À l'heure actuelle, les enfants ayant reçu une GMO ou une GSCO ne reçoivent pas un traitement adapté à leur propre condition puisqu'il n'existe aucune donnée permettant de déterminer la durée optimale du famciclovir.

Dans ce contexte, nous émettons les hypothèses suivantes: i. La persistance du VZV mène au développement de réponses cellulaires anti-VZV primaires de type

Th et LTC chez les enfants transplantés de la moelle ou du cordon. ii. La prophylaxie antivarielleuse n'empêche pas le développement de ces réponses. iii. Des réponses Th et LTC anti-VZV de plus haute intensité sont associées à une incidence plus faible de réactivation varicelleuse.

Ce projet de maîtrise a pour objectif de développer et de valider une méthode d'analyse biomédicale destinée à être appliquée en clinique (ELISpot-VZV-IFN- γ). Cette technique permettra de mesurer et de suivre de manière prospective la reconstitution de l'immunité anti-VZV post-greffe. Pour ce faire, il est primordial d'établir des valeurs de référence de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV chez les enfants en santé, données qui sont présentement inexistantes dans la littérature.

Ce projet se divise donc en deux volets :

- 1) La génération de valeurs de référence chez la population pédiatrique saine qui permettront de déterminer le seuil de lymphocytes T VZV-spécifiques requis pour protéger un enfant contre une maladie à VZV (chapitre 2).
- 2) L'étude prospective de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV chez les enfants ayant reçu une greffe de moelle osseuse ou de sang de cordon à différents temps post-transplantation (6, 9, 12 et 18 mois) (chapitre 3).

Les résultats de cette étude pourraient ainsi fournir aux cliniciens un outil puissant pour juger du moment opportun pour débiter, réduire ou interrompre la prophylaxie anti-VZV chez les receveurs de GMO ou de GSCO.

**Chapitre 2 : Génération de valeurs de
référence de la réponse à médiation
cellulaire anti-VZV**

Varicella zoster virus (VZV)-specific T cells in children who contracted varicella and children immunized with live attenuated VZV vaccine: exploring threshold values for VZV-specific cell-mediated immune responses.

Anne-Julie Grenier^{a,b,c}, Roland Yang^{a,b,d}, Elyse Jolette^{ab}, Silvie Valois^e, Normand Lapointe^{e,f}, Jean-François Chicoine^f, Philippe Ovetckine^{b,f,g}, Hugo Soudeyns^{a,b,c,f}.

^aUnité d'immunopathologie virale, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada; ^bDepartment of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada; ^cGroupe de recherche en transplantation et immunologie du sang de cordon (GRETISC), Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada; ^dService de gastroentérologie, hépatologie et nutrition, CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada; ^eCentre maternel et infantile sur le SIDA (CMIS), Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada; ^fDepartment of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada; ^gService d'infectiologie pédiatrique, CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada.

Soumis pour publication à la revue *Vaccine* en décembre 2009

Contributions à l'article

J'ai effectué toutes les expériences ainsi que toutes les analyses qui ont mené aux résultats présentés dans l'article. Cet article, soumis au journal *Vaccine* fut, écrit conjointement par moi et le Dr Hugo Soudeyns. Elyse Jolette (M.Sc) et Roland Yang (stagiaire de juin 2007 à avril 2008) ont démarré le projet en effectuant l'optimisation de la technique ELISpot-VZV-IFN- γ auprès des donneurs sains. Silvie Valois, le Dr Normand Lapointe et le Dr Jean-François Chicoine ont participé au recrutement des enfants. Le Dr Philippe Ovetchkine a participé avec le Dr Hugo Soudeyns à l'écriture de la demande de fonds destinée à soutenir le projet.

Abstract

Antiherpetic prophylaxis is administered to pediatric recipients of bone marrow transplant (BMT) or umbilical cord blood transplant (UCBT) to prevent complications associated with varicella-zoster virus (VZV). Here, IFN- γ ELISpot was used to inform VZV-specific cell-mediated immunity in children and establish reference values. Significantly higher frequencies of VZV-specific IFN- γ -producing T cells were observed in VZV-infected children as compared with uninfected or vaccinated children. Based on these results, a child exhibiting > 190.0 spot-forming units/ 10^6 cells would be unlikely to be non-immune. Use of IFN- γ ELISpot could assist medical practitioners in gauging individual requirement for antiherpetic prophylaxis in BMT and UCBT recipients.

Keywords: Varicella-zoster virus (VZV); enzyme linked immunospot assay (ELISpot); cell-mediated immune responses.

1. Introduction

Varicella-zoster virus (VZV) is a ubiquitous human alphaherpesvirus which causes two different diseases, varicella (chickenpox) and herpes zoster (shingles). Primary infection with VZV causes varicella in absence of vaccination. After primary infection, the virus persists in sensory nerve ganglia of the dorsal root and establishes life-long latency in neuronal cells. The virus can reactivate years or decades later and spread along a dermatome to cause herpes zoster, a painful

localized vesicular rash [1,2]. Observations made during the last four decades support the hypothesis that CD4⁺ helper T cells and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes are primarily responsible for the control of VZV replication in the infected host [3-6] and that VZV reactivation is associated with a decline in VZV-specific cell-mediated immunity that occurs as a result of aging and immunosuppression [7-13]. Consistent with this, primary infection with VZV and VZV reactivation cause serious morbidity and mortality in immunosuppressed children [14], including pediatric patients who have undergone bone marrow transplant (BMT) [15-17]. The incidence and severity of VZV-related complications are particularly high in pediatric recipients of umbilical cord blood transplant (UCBT) [18]. As a result, antiviral prophylaxis (acyclovir) is universally administered to BMT and UCBT recipients [19]. However, there is no hard evidence-based consensus that defines the optimal duration of VZV prophylaxis, and recent reports even suggest that it prevents the reconstitution of host VZV-specific immune responses [20]. Therefore, improved assessment of the reconstitution of VZV-specific immunity in pediatric UCBT recipients could enable medical practitioners to distinguish children who would benefit the most from VZV prophylaxis from those whose immune system could control VZV by itself. VZV-specific cell-mediated immune responses can be measured *ex vivo* using interferon- γ enzyme linked immunospot assay (IFN- γ ELISpot), which provides a sensitive measurement of IFN- γ production at the single cell level [13,20-23]. Here, in order to validate this method for use in the clinic and to establish reference and threshold values for VZV-specific cell-mediated immunity,

IFN- γ ELISpot was used to enumerate VZV-specific T cells in pediatric subjects who were either: a) previously infected with VZV; b) not infected with VZV; or c) vaccinated with live attenuated VZV vaccine. Results from this study revealed that subjects previously infected with VZV exhibited significantly higher circulating levels of T cells producing IFN- γ in response to VZV antigen than either uninfected or vaccinated children. In contrast, the gain in numbers of IFN- γ -producing VZV-specific T cells was considerably more modest following vaccination. Finally, descriptive statistics were computed for each group, leading to the estimation of a set of threshold values that could potentially be used to gauge VZV-specific cell-mediated immunity in pediatric populations.

2. Materials and methods

2.1 Study subjects.

Three groups of immunocompetent children aged between 9 months and 12 years were enrolled at the Infectious Diseases Clinic and Special Immunology Clinic of CHU Sainte-Justine between June 2007 and September 2009 (Table I). Group 1 was comprised of children with a documented history of varicella (n = 50). Group 2 was comprised of children with no history of VZV infection (n = 50). Upon enrolment, subjects from Group 2 were immunized with the Varivax[®] III (Merck Frosst, Kirkland, Canada) (n = 34) or Priorix-Tetra[™] (GlaxoSmithKline Inc., Mississauga, Canada) (n = 14) live attenuated varicella vaccines. Exclusion criteria included: a) any evidence of immunodeficiency disease; and b) use of immunosuppressive drugs (corticosteroids, chemotherapy). One subject was

excluded from Group 2 because he presented with a febrile condition at the time of immunization (n = 49). Group 3 was comprised of children from Group 2 (n = 46; three subjects lost to follow-up) who came back for follow-up a median of 161 days (range = 56 - 358 days) after VZV immunization (Table I). As a consequence of the implementation in 2006 of a universal, publicly-funded VZV vaccination program in children > 1 year of age in the province of Quebec [24], median age of children from Group 1 was 9.47 years, significantly higher than that of children from Group 2 (1.2 years; $p < 0.0001$, Mann-Whitney U test). VZV serological status was verified in all subjects using ELISA (Captia Varicella-Zoster Virus IgG, Trinity Biotech, Jamestown, NY). This study was approved by the Institutional Ethics Review Board of CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada, where the study was conducted. Full informed consent was obtained from all study participants, parents and legal guardians.

2.2 Isolation of peripheral blood mononuclear cells from whole blood.

Whole blood (5 ml) was obtained by venipuncture and was collected in tubes containing K₂-EDTA as anticoagulant (Becton Dickinson, Mississauga, Canada). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on Ficoll-Hypaque density gradients (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada) and cryopreserved in heat inactivated foetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Burlington, Canada) containing 10% (v/v) DMSO (Sigma, St-Louis, MO). Aliquots were stored in liquid nitrogen.

2.3 VZV-specific IFN- γ ELISpot assay.

Frozen PBMC were thawed in the presence of Benzonase Nuclease (Novagen, Madison, WI) and were resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS and 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin (Invitrogen). Cells obtained were incubated overnight into flasks at a concentration of $1\text{-}2 \times 10^6$ cells/ml at 37°C and 5% CO_2 . Assays were performed using 96-well Multiscreen IP plates (Millipore, Bedford, MA) coated overnight at 4°C with purified mouse anti-human IFN- γ capture antibody (NIB42; BD Biosciences, San Diego, CA) diluted 10 $\mu\text{g/ml}$ in PBS (Invitrogen). Plates were blocked for 2 h at 37°C with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. PBMC concentrations were determined using a haemocytometer. Cells were then diluted at a final concentration of 2×10^6 cells/ml in AIM-V medium (Invitrogen) supplemented with 2% (v/v) inactivated human serum (IHS; Wisent, St-Jean-Baptiste, Canada). 100 μl of the suspension was added to each well, combined with 100 μl of VZV antigen diluted 1/200, 1/400, and 1/800 in AIM-V medium. Irradiated (10,000 Gy) Varivax[®] III (Merck Frosst; 1,350 plaque forming units (pfu)/ml at expiry) was used as VZV antigen. Anti-CD3 mAb (OKT3; Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) was used as positive control (0.005 $\mu\text{g/ml}$), while cells incubated with AIM-V and 2% IHS alone were used as negative control. Plates were developed by the addition of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of biotinylated anti-IFN- γ MAb (4S.B3; BD Biosciences) and alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (Bio-Rad, Hercules, CA). Plates were washed and incubated with BCIP/NBT-plus substrate solution (Bio-Rad). Spots were enumerated using an automated ELISpot reader (CTL ImmunoSpot S4 UV

Analyser, CTL Technology Ltd., Shaker Heights, OH). Background was subtracted and IFN- γ production was expressed as number of spot-forming units (SFU) per 10^6 PBMC.

2.4 Statistical analysis.

Normality of data distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Where appropriate, statistical significance in between-groups comparisons was assessed using the Mann-Whitney *U* test, the Wilcoxon matched pairs test, or the Kruskal-Wallis test with Dunn's post test. Relationships between variables were tested using Spearman correlation. *p* values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) or SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

3.1 Preparation of VZV antigen.

Published studies on VZV-specific cell-mediated immune responses have used various sources of VZV antigen in IFN- γ ELISpot, including UV-inactivated clarified cell culture supernatants from VZV-infected MRC-5 cell [22], UV-treated varicella vaccine (3×10^4 pfu/ml; Biken, Osaka, Japan) [23], or lysates of Vero cells infected with the VZV ROD strain [20]. As our intent was to measure vaccine-induced VZV-specific cell-mediated immune responses, we elected to use Varivax[®] III (Merck Frosst) as antigen. To restrict the occurrence of VZV-induced cytopathic effects during incubation of antigen with PBMC, and to limit

manipulation of live infectious VZV, Varivax[®] III was inactivated using a Gammacell G220 irradiator (10,000 Gy; MDS Nordion, Ottawa, Canada). Pilot experiments using PBMC derived from an adult VZV⁺ volunteer showed that incubation with serial twofold dilutions of γ -irradiated Varivax[®] III induced at least twice as many T lymphocytes to produce IFN- γ as non-irradiated antigen at all antigen concentrations tested (Figure 1).

3.2 Quantification of VZV-specific cell-mediated immune responses.

IFN- γ ELISpot was performed on PBMC samples obtained from all study participants using 1/200, 1/400, and 1/800 dilutions of γ -irradiated Varivax[®] III as antigen. IFN- γ production was expressed as number of SFU/10⁶ PBMC. Because distribution of ELISpot data did not conform to a normal distribution ($p < 0.0001$, Kolmogorov-Smirnov test), nonparametric methods were used to test statistical significance in between-groups comparisons. Using data from Group 1 (children with a documented history of varicella), significant differences were shown between median SFU estimates obtained using the three dilutions of VZV antigen ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test). These disparities were largely accounted for by the difference between the 1/200 dilution (median = 115.0 SFU/10⁶ PBMC; interquartile range [IQR] = 75.0 – 232.5 SFU/10⁶ PBMC) and the 1/800 dilution (median = 50.0 SFU/10⁶ PBMC; IQR = 20.0 – 105.0 SFU/10⁶ PBMC), and between the 1/400 dilution (median = 92.5 SFU/10⁶ PBMC; IQR = 52.5 – 177.5 SFU/10⁶ PBMC) and the 1/800 dilution ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively, Dunn's multiple comparisons test) (Figure 2). Similar results were obtained when

aggregate data from Group 1, Group 2, and Group 3 were used ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test) (data not shown). Because the 1/200 dilution of Varivax III[®] yielded consistently higher SFU values than the 1/400 and 1/800 dilutions, and because these values were similar in range and magnitude with those obtained in other studies [20,22,23], it was selected for use in subsequent analysis. Consistent with previous reports [22], experiments using antibody coupled magnetic beads showed that removal of CD4⁺ cells from PBMC led to depletion of essentially all VZV-specific IFN- γ -producing cells (data not shown). In subjects belonging to Group 1 (documented history of varicella), the median frequency of VZV-specific IFN- γ -producing cells was 115.0 SFU/10⁶ PBMC (IQR = 75.0 – 232.5 SFU/10⁶ PBMC; range = 50.0 – 680.0 SFU/10⁶ PBMC) (Table II; Figure 3). In addition, numbers of SFU/10⁶ PBMC was positively correlated with the age of the study subjects at study entry ($r = 0.2991$; $p = 0.0174$) (Figure 4). Predictably, the frequency of VZV-specific IFN- γ -producing cells in subjects from Group 1 was higher than that measured in subjects from Group 2 (no documented history of varicella; median = 25.0 SFU/10⁶ PBMC; IQR = 5.0 – 70.0 SFU/10⁶ PBMC; range = 0.0 – 490.0 SFU/10⁶ PBMC), and this difference was statistically significant ($p < 0.0001$, Mann-Whitney U test) (Table II; Figure 3). Interestingly, the median number of VZV-specific SFU was also significantly higher in subjects from Group 1 as compared with subjects from Group 3 (immunized; median = 40.0 SFU/10⁶ PBMC; IQR = 15.0 – 100.0 SFU/10⁶ PBMC; range = 0.0 – 335.0 SFU/10⁶ PBMC; $p < 0.0001$, Mann-Whitney U test). As expected, the median number of VZV-specific IFN- γ -producing cells was lower in subjects from Group

2 than subjects from group 3, but this difference did not reach statistical significance ($p = 0.1152$, Wilcoxon matched pairs test) (Table II; Figure 3). Overall, immunization led to a median increase of 5.0 SFU/ 10^6 PBMC on a per patient basis (IQR = -22.5 – 52.5 SFU/ 10^6 PBMC) (data not shown). Response to vaccination expressed in terms of Δ SFU/ 10^6 PBMC was significantly correlated with the age of the subject at study entry ($r = 0.4016$; $p = 0.0028$) (Figure 5). Finally, there was no evidence that the magnitude of the VZV-specific response to Varivax[®] III was different from that elicited by Priorix-Tetra[™] ($p = 0.2873$, Mann-Whitney U test; data not shown).

3.3 Determination of a specific threshold value for VZV-specific cell-mediated immunity.

The use of VZV-IFN- γ ELISpot and the establishment of reference and threshold values could provide medical practitioners with a tool to gauge VZV-specific cell-mediated immunity in children following BMT or UCBT. As subjects from Group 3 were immunized with live attenuated VZV vaccine, which is known to elicit > 85% protection from the disease [24], the median number of VZV-specific IFN- γ producing cells measured in this group (*i.e.* 40.0 SFU/ 10^6 PBMC) could potentially be used as an index of protection from VZV infection. Data obtained in the present study shows that 20 of 49 children from Group 2 (40.8%), who were presumably susceptible to VZV infection based on negative VZV serology at baseline, displayed frequencies of VZV-specific IFN- γ -producing cells equal to or greater than 40.0 SFU/ 10^6 PBMC. Alternatively, the 75th, 90th, or 95th percentiles

of Group 2 (*i.e.* 70.0, 145.0, and 190.0 SFU/10⁶ PBMC, respectively) could also represent threshold candidates. Using the lowest value (*i.e.* 70.0 SFU/10⁶ PBMC), 28 of 46 (60.9%) vaccinated children (Group 3) and 6 of 50 (12.0%) children with a history of varicella (Group 1) would score below threshold, and would thus be considered non-immune. Using the mid-range percentile (*i.e.* 145.0 SFU/10⁶ PBMC), few of the vaccinated subjects would attain the threshold (6 of 46; 13.0%), as compared with 21 of 50 (42.0%) in group 1. Finally, using the highest value (*i.e.* 190.0 SFU/10⁶ PBMC), all but 3 vaccinated subjects (93.5%) would score below threshold, while 15 of 50 (30.0%) subjects with a history of varicella would register equal or higher frequencies of VZV-specific SFU. Therefore, it is unlikely that a subject exhibiting > 190.0 VZV-specific SFU/10⁶ PBMC would not be immune to VZV.

4. Discussion

VZV reactivation and *de novo* infection with VZV are common and sometimes serious complications of BMT and UCBT. Currently, prevention of these complications is based in large part on the long-term administration of acyclovir to the transplant recipient [19,26]. Reconstitution of VZV-specific cell-mediated immune responses could be monitored using IFN- γ ELISpot, providing a rationale for maintenance or interruption of antiherpetic prophylaxis. Here, this method was used to quantitate VZV-specific immune responses in three groups of subjects: children with or without a clinical history of varicella, and children who were recently immunised with live attenuated VZV vaccine. Data obtained in these

three groups was then used to estimate threshold values for VZV-specific cell mediated immune responses, values above which a child could in theory be considered functionally VZV-immune.

As antigen, dilutions of Varivax[®] III were chosen over cell culture-derived VZV. This was done to insure uniformity in antigen source and preparation and to limit culture and manipulation of live wild-type VZV strains in a clinical setting where nosocomial transmission is always a serious concern [26]. To our knowledge, this is the first report of the use of Varivax[®] III as antigen in ELISpot assays. In addition, γ irradiation was preferred over UV inactivation because of the comparative precision with which doses of γ radiation can be delivered and because, unlike UV, γ rays efficiently penetrate sealed VZV-containing vials. Irradiation of viral stocks led to consistently higher estimates of the frequency of VZV-specific IFN- γ -producing cells, possibly as a result of mitigation of VZV-induced cytopathic effects. Taken together, the modifications that were introduced in the VZV-ELISpot assay may make it better adapted for use in the clinical setting.

The frequency of VZV-specific IFN- γ -producing cells measured using ELISpot was significantly higher in subjects with a history of varicella than in subjects who showed no sign of previous VZV infection. One important caveat is that the age distribution of study subjects was not equivalent in these two groups: VZV-naïve subjects were significantly younger as a result of the recent inclusion of VZV

vaccine in the Quebec universal immunization program. Hence, it was not possible to accrue significant numbers of VZV negative children older than 2 years of age in our study group. In children from Group 1, age was positively correlated with frequency of VZV-specific SFU. This is consistent with a progressive increase in the numbers of VZV-specific IFN- γ -producing T cells in the circulation with age (range = 2.70 – 12.7 years), perhaps as a result of continuous exposure to VZV antigens associated with low-level viral replication and/or subsequent re-exposure to the virus [27]. This situation is different than that observed in older adults, in whom declining frequencies of VZV-specific IFN- γ -producing T cells are associated with increased incidence of herpes zoster [13].

The frequency of VZV-specific IFN- γ -producing cells was also significantly higher in subjects with a history of varicella than in subjects who were immunized with either Varivax[®] III or Priorix-Tetra[™]. Moreover, immunization only led to a modest increase of 5.0 VZV-specific SFU/10⁶ PBMC over baseline. These results are compatible with the limited immunogenicity of currently available live attenuated VZV vaccines and observed incidence of breakthrough varicella in immunized children, which have led to the recommendation that routine 2-dose varicella immunization schedules be implemented [28-32]. Interestingly, age at study entry was positively correlated with vaccine response in our study group, suggesting that older children responded comparatively better to VZV immunization than their younger counterparts. This finding was particularly striking in the lower age group. Increased rate of vaccine failure and breakthrough

varicella have been reported in children < 14 months of age, once again advocating for improvement in the efficacy of VZV immunization regimens [33]. Unlike what was suggested in a recently-published report based on a larger series [34], the present study provides no evidence for differential immunogenicity between Varivax[®] III and Priorix-Tetra[™].

Two methods for computing threshold values for VZV-specific cell-mediated immune responses were explored. The first was based on the median frequency of VZV-specific SFU (40.0 SFU/10⁶ PBMC) in subjects who were immunized with one dose of Varivax[®] III or Priorix-Tetra[™]. However, as cell-mediated immune responses triggered by either of these vaccines in terms of VZV-specific SFU were comparatively small, a sizable proportion of non-immunized subjects (*i.e.* 40.8%) would be erroneously categorized as «protected» or «immune» should this criterion be used. For this reason, upper boundaries of data distribution in Group 2 (75th, 90th, and 95th percentiles) were used to calculate a second series of candidate threshold values that exhibited graded levels of stringency. Using the 75th percentile leads to 60.9% of vaccinated children being considered nonimmunized, which is not compatible with generally accepted estimates of vaccine efficacy [25]. Using the 95th percentile (*i.e.* 190.0 SFU/10⁶ PBMC) would be most conservative, as it would make it highly unlikely that a child exhibiting an above threshold frequency of VZV-specific SFU would be non-immune. However, this value is greater than the median frequency of VZV-specific SFU observed in children with a history of varicella (*i.e.* 115.0 SFU/10⁶ PBMC), which

would lead to the categorization of a significant proportion of VZV-immune children as non-immune. This criterion will need to be evaluated in comprehensive longitudinal studies of BMT or UCBT recipients before one can establish whether reaching this threshold (*i.e.* ≥ 190 SFU/ 10^6 PBMC) would allow for safe discontinuation of antiherpetic prophylaxis. Other clinical parameters, such as age, CD4⁺ T cell counts, VZV serostatus, T cell phenotype, source of hematopoietic stem cells (*i.e.* bone marrow, umbilical cord blood), or combinations thereof might also need to be taken into account to reliably estimate the onset and dynamics of functional VZV-specific immune reconstitution.

Tables and figures

Table I. Clinical characteristics of study participants

Parameters	Group 1 (history of varicella) ^a	Group 2 (no history of varicella, non- vaccinated) ^a	Group 3 (vaccinated)
Study participants (n)	50	49 ^b	46 ^c
Age (years)			
Range	2.70 - 12.69	0.76 - 11.82	1.30 - 12.08
Median	9.47	1.20	1.79
Gender (♂/♀)	26/24	22/27	20/26

^aVZV serological status was verified in all subjects using ELISA, as described under Materials and Methods. ^bOne subject was excluded as he presented with a febrile illness at the time of vaccination. ^cThree subjects were lost to follow up.

Table II. Frequency of VZV-specific T lymphocytes producing IFN- γ in children from Groups 1, 2, and 3.

Descriptive statistics	Group 1 (history of varicella) ^a	Group 2 (no history of varicella, non-vaccinated) ^a	Group 3 (vaccinated)
Mean (95% CI)	180.1 (136.9 - 223.3)	54.7 (31.0 - 78.4)	70.7 (46.8 - 94.5)
Median	115.0	25.0	40.0
Minimum	50.0	0.0	0.0
Maximum	680.0	490.0	335.0
Interquartile range (IQR)	157.5	65.0	85.0
75 th percentile	232.5	70.0	100.0
90 th percentile	420.0	145.0	178.0
95 th percentile	566.5	190.0	298.3

^aVZV serological status was verified in all subjects using ELISA, as described under Materials and Methods.

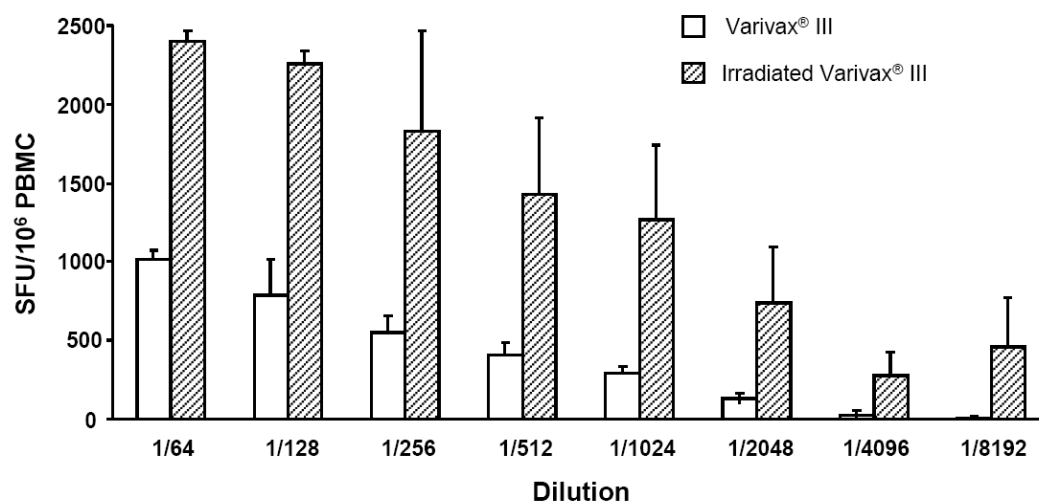


Figure 1. Effects of irradiation of VZV antigen on observed frequency of IFN- γ -producing T lymphocytes. VZV-specific IFN- γ ELISpot was performed as described under Materials and Methods using PBMC from a control volunteer and serial dilutions of irradiated (10,000 Gy) Varivax[®] III as antigen. Data represent the mean \pm SEM of one representative experiment performed in triplicate. PBMC: peripheral mononuclear cells; SFU: spot-forming units.

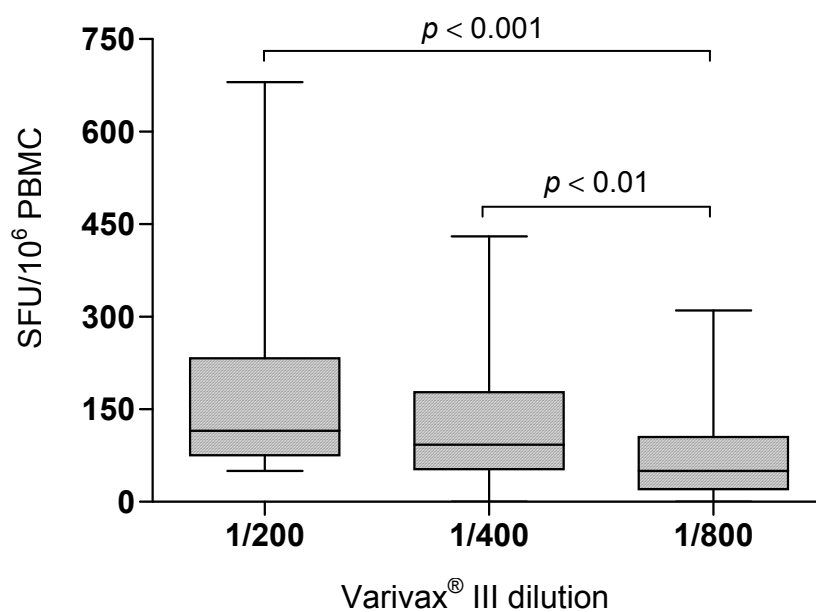


Figure 2. Quantification of VZV-specific cell-mediated immune responses in subjects from Group 1 using VZV-ELISpot and serial dilutions of antigen. VZV-specific IFN- γ ELISpot was performed as described under Materials and Methods using PBMC isolated from subjects with a history of varicella (Group 1) and serial dilutions (1/200, 1/400, and 1/800) of irradiated (10,000 Gy) Varivax[®] III as antigen. Boxes represent the median and interquartile range (IQR). PBMC: peripheral mononuclear cells; SFU: spot-forming units.

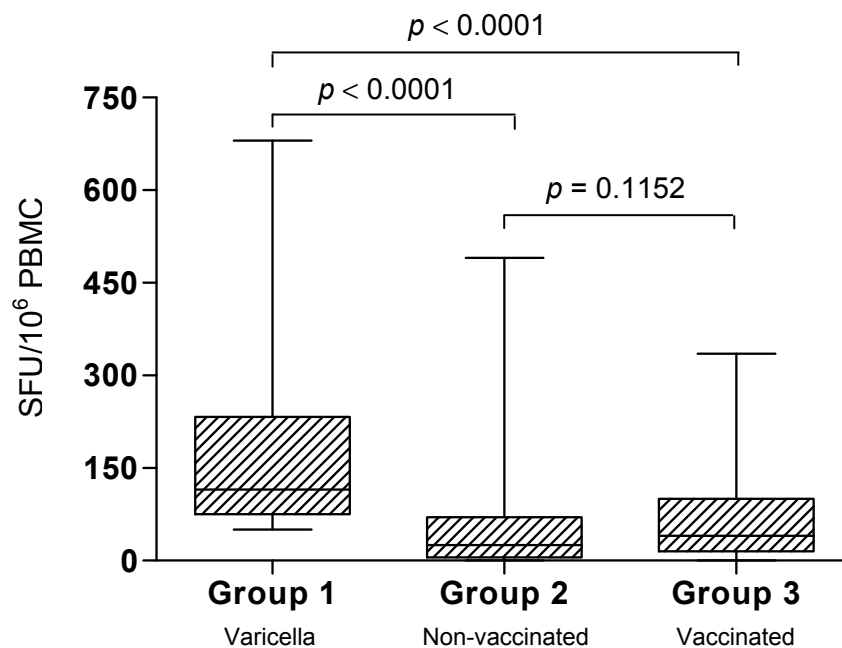


Figure 3. Quantification of VZV-specific cell-mediated immune responses in subjects from Group 1, 2, and 3 using VZV-ELISpot. VZV-specific IFN- γ ELISpot was performed as described under Materials and Methods using PBMC isolated from subjects with a history of varicella (Group 1), and subjects without a history of varicella before (Group 2) and after immunization (Group 3) with live attenuated VZV vaccine. A 1/200 dilution of Varivax[®] III was used antigen. Boxes represent median and interquartile range (IQR). PBMC: peripheral mononuclear cells; SFU: spot-forming units.

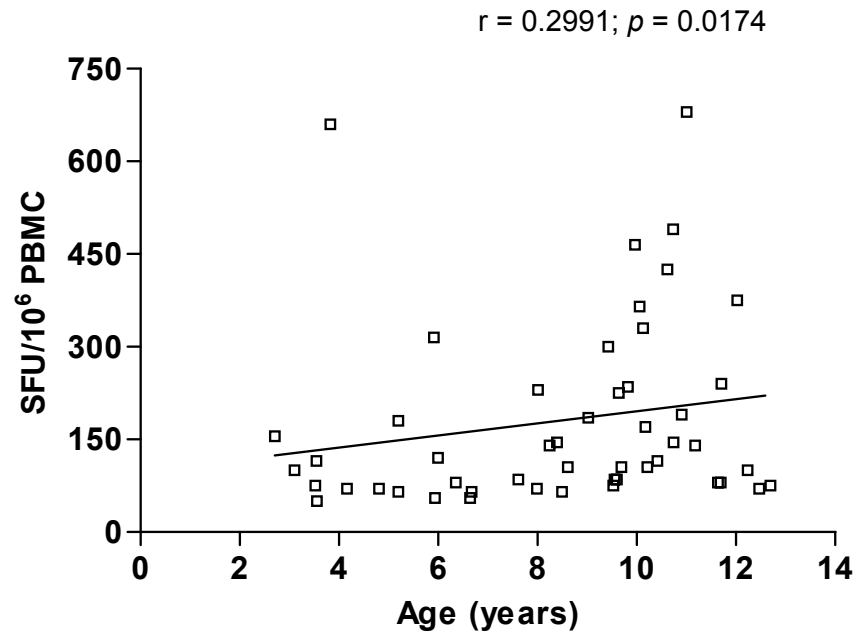


Figure 4. Correlation between frequency of VZV-specific IFN- γ -producing T cells and age at study entry in subjects from Group 1. VZV-specific IFN- γ ELISpot was performed as described under Materials and Methods using PBMC isolated from subjects with a history of varicella (Group 1). A 1/200 dilution of Varivax[®] III was used antigen. SFU: spot-forming units.

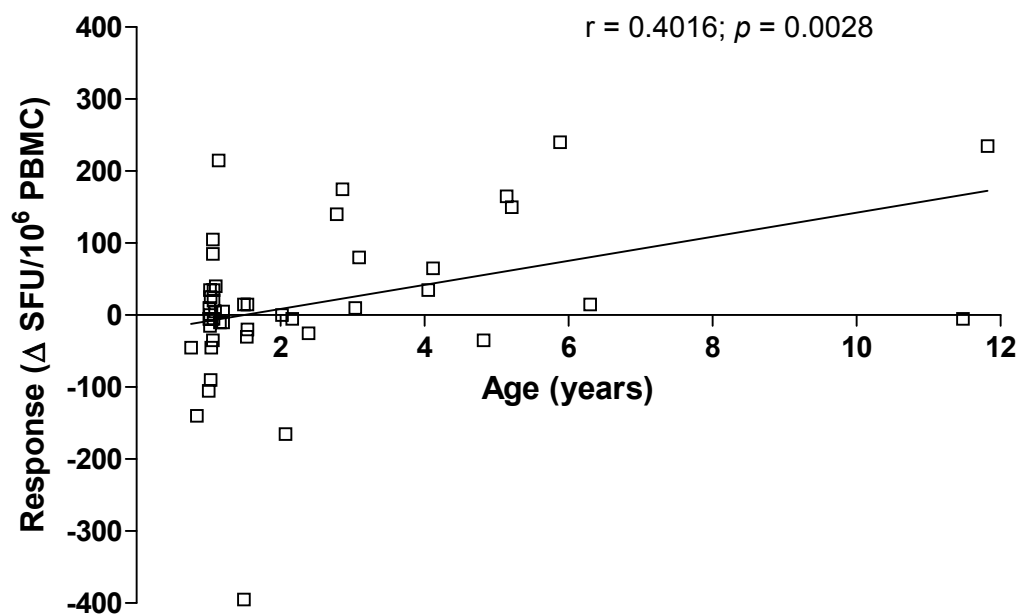


Figure 5. Correlation between immunological responses to live attenuated VZV vaccine and age at study entry. VZV-specific IFN- γ ELISpot was performed as described under Materials and Methods using PBMC isolated from subjects without a history of varicella before (Group 2) and after immunization (Group 3) with live attenuated VZV vaccine. A 1/200 dilution of Varivax[®] III was used antigen. Δ SFU is defined as the difference between the frequencies of VZV-specific IFN- γ -producing T cells post vaccination and pre-vaccination. SFU: spot-forming units.

References

1. Arvin AM. Varicella-zoster virus. *Clin Microbiol Rev* 1996;9(3):361-81.
2. Lungu O, Annunziato PW, Gershon A, Staugaitis SM, Josefson D, LaRussa P, et al. Reactivated and latent varicella-zoster virus in human dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(24):10980-4.
3. Hickling JK, Borysiewicz LK, Sissons JG. Varicella-zoster virus-specific cytotoxic T lymphocytes (Tc): detection and frequency analysis of HLA class I-restricted Tc in human peripheral blood. *J Virol* 1987;61(11):3463-9.
4. Frey CR, Sharp MA, Min AS, Schmid DS, Loparev V, Arvin AM. Identification of CD8⁺ T cell epitopes in the immediate early 62 protein (IE62) of varicella-zoster virus, and evaluation of frequency of CD8⁺ T cell response to IE62, by use of IE62 peptides after varicella vaccination. *J Infect Dis* 2003;188(1):40-52.
5. Jones L, Black AP, Malavige GN, Ogg GS. Persistent high frequencies of varicella-zoster virus ORF4 protein-specific CD4⁺ T cells after primary infection. *J Virol* 2006;80(19):9772-8.
6. Malavige GN, Jones L, Black AP, Ogg GS. Rapid effector function of varicella zoster virus glycoprotein I-specific CD4⁺ T cells many decades after primary infection. *J Infect Dis* 2007;195(5):660-4.
7. Hope-Simpson RE. The Nature of Herpes Zoster: A long-term study and a new hypothesis. *Proc R Soc Med* 1965;58:9-20.

8. Dolin R, Reichman RC, Mazur MH, Whitley RJ. NIH conference. Herpes zoster varicella infections in immunosuppressed patients. *Ann Intern Med* 1978;89(3):375-88.
9. Burke BL, Steele RW, Beard OW, Wood JS, Cain TD, Marmer DJ. Immune responses to varicella-zoster in the aged. *Arch Intern Med* 1982;142(2):291-3.
10. Weller TH. Varicella and herpes zoster. Changing concepts of the natural history, control, and importance of a not-so-benign virus. *N Engl J Med* 1983;309(23):1434-40.
11. Hayward AR, Herberger M. Lymphocyte responses to varicella zoster virus in the elderly. *J Clin Immunol* 1987;7(2):174-8.
12. Oxman MN. Immunization to reduce the frequency and severity of herpes zoster and its complications. *Neurology* 1995; 45(12 Suppl 8):S41-6.
13. Levin MJ, Smith JG, Kaufhold RM, Barber D, Hayward AR, Chan CY, et al. Decline in varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity with increasing age and boosting with a high-dose VZV vaccine. *J Infect Dis* 2003;188(9):1336-44.
14. Blattner RJ. Serious complications of varicella, including fatalities. *J Pediatr* 1957;50(4):515-8.
15. Locksley RM, Flournoy N, Sullivan KM, Meyers JD. Infection with varicella-zoster virus after marrow transplantation. *J Infect Dis* 1985;152:1172-81.
16. Wilson A, Sharp M, Koropchak CM, Ting SF, Arvin AM. Subclinical varicella-zoster virus viremia, herpes zoster, and T lymphocyte immunity to

- varicella-zoster viral antigens after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1992;165(1):119-26.
17. Arvin AM. Varicella-Zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000;6(3):219-30.
 18. Vandebosch K, Ovetchkine P, Champagne MA, Haddad E, Alexandrov L, Duval M. Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(8):867-71.
 19. Boeckh M, Kim HW, Flowers MED, Meyers JD, Bowden RA. Long-term acyclovir for prevention of varicella zoster virus disease after allogeneic haematopoietic cell transplantation-a randomised double-blind placebo-controlled study. *Blood* 2006;107(5):1800-5.
 20. Distler E, Schnürer E, Wagner E, von Auer C, Plachter B, Wehler D, et al. Recovery of varicella-zoster virus-specific T cell immunity after T cell-depleted allogeneic transplantation requires symptomatic virus reactivation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(12):1417-24.
 21. Hutchings PR, Cambridge G, Tite JP, Meager T, Cooke A. The detection and enumeration of cytokine-secreting cells in mice and man and the clinical application of these assays. *J Immunol Methods* 1989;120(1):1-8.
 22. Smith JG, Liu X, Kaufhold RM, Clair J, Caulfield MJ. Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular

- immune responses to varicella-zoster virus. *Clin Diag Lab Immunol* 2001;8(5):871-9.
23. Sadaoka K, Okamoto S, Gomi Y, Tanimoto T, Ishikawa T, Yoshikawa T, et al. Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay. *J Infect Dis* 2008;198(9):1327-33.
 24. Protocole d'immunisation du Québec. Direction des communications du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec, 2009. Available at www.msss.gouv.qc.ca/immunisation/piq.
 25. Vazquez M, La Russa P, Gershon AA, Steinberg SP, Freudigman K, Shapiro ED. The effectiveness of the varicella vaccine in clinical practice. *N Engl J Med* 2001;344(13):955-60.
 26. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: A global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15(10): 1143-238.
 27. Arvin AM. Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus: an overview. *J Infect Dis* 2008;197 Suppl 2:S58-60.
 28. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. Prevention of varicella: recommendations for use of varicella vaccines in children, including a recommendation for a routine 2-dose varicella immunization schedule. *Pediatrics* 2007;120(1):221-31.

29. Lopez AS, Guris D, Zimmerman L, Gladden L, Moore T, Haselow DT, et al. One dose of varicella vaccine does not prevent school outbreaks: is it time for a second dose? *Pediatrics* 2006;117(6):e1070-7.
30. Michalik DE, Steinberg SP, Larussa PS, Edwards KM, Wright PF, Arvin AM, et al. Primary vaccine failure after 1 dose of varicella vaccine in healthy children. *J Infect Dis* 2008;197(7):944-9.

Chapitre 3 : Étude prospective de la réponse à médiation cellulaire anti- VZV post-transplantation

Contributions au projet

J'ai effectué toutes les expériences sur les sujets greffés ainsi que toutes les analyses qui ont mené aux résultats présentés dans le chapitre 3. Les enfants greffés ont été recrutés par les infirmières de recherche Samira Mezziani et Ingrid Thonnes. Natacha Merindol m'a offert certains de ses échantillons non-utilisés de PBMC de patients greffés, dont les participants, parents ou tuteurs légaux avaient consenti à ce qu'ils puissent servir pour d'autres recherches sur les greffes hématopoïétiques. Françoise Le Deist (M.D., Ph.D.), Michel Duval (M.D.), Martin Champagne (M.D.), Philippe Ovetchkine (M.D.), Elie Haddad (M.D., Ph.D.) et Hugo Soudeyns (Ph.D.), tous membres du Groupe de recherche en transplantation et immunologie du sang de cordon (GRETISC), ont écrit la demande de fonds destinée à soutenir ce projet.

L'étude de l'immunité à médiation cellulaire anti-VZV n'est pas complète. Par conséquent, les résultats présentés dans le chapitre 3 sont des résultats préliminaires.

1. Introduction

La varicelle et le zona représentent un réel problème en termes de morbidité et de mortalité chez les sujets immunodéprimés due à une GMO ou une GSCO tel que discuté dans l'introduction générale à la page 29. Pour éviter les infections à VZV, une prophylaxie est administrée de façon systématique chez tous les greffés de MO ou de SCO depuis mai 2006 au CHU Sainte-Justine puisque les médecins n'ont aucun moyen pour distinguer les enfants qui profiteraient davantage d'un traitement au famciclovir de ceux dont le système immunitaire serait capable de lui-même de contrôler la prolifération du VZV.

L'équipe du Dr Soudeyns a récemment étudié la réponse à médiation cellulaire anti-VZV auprès de 150 enfants sains avec la technique ELISpot-VZV-IFN- γ (Grenier et al., 2010, soumis pour publication ; Chapitre 2). À la lumière des résultats obtenus, nous avons été en mesure de proposer une valeur-seuil de l'immunité anti-VZV. Nous avons suggéré qu'un enfant qui génère plus de $190.0 \text{ SFU}/10^6$ PBMC pouvait théoriquement être considéré comme un enfant immun, donc apte à combattre une infection à VZV.

Afin de confirmer ces résultats, une étude prospective de l'immunité anti-VZV chez les enfants greffés de MO ou de SCO s'est avérée nécessaire. Les résultats de ces expériences permettront d'obtenir d'importantes informations concernant la reconstitution de l'immunité anti-VZV post-transplantation et de fournir aux cliniciens un outil puissant pour juger du moment opportun pour débiter, réduire

ou interrompre la prophylaxie antivarielleuse chez les enfants transplantés de la MO ou du SCO.

2. Matériel et méthodes

2.1 Recrutement des patients.

Dans le cadre de cette étude, 7 patients ayant reçu une GSCO allogénique non apparentée et 2 patients ayant reçu une GMO allogénique apparentée ou non-apparentée ont été recrutés au CHU Sainte-Justine auprès du Service d'hématologie (Tableau I). La médiane de l'âge des patients est de 5.86 ans. Pour plusieurs raisons (*e.g.* décès, déménagement, difficulté de prélèvement), la majorité des patients n'ont pu être prélevés à tous les temps prévus, soit 6, 9, 12 et 18 mois. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada. Un consentement éclairé a été obtenu de tous les participants, parents ou tuteurs légaux.

Tableau I. Données cliniques des patients greffés de MO et de SCO recrutés pour l'étude prospective de l'immunité à médiation cellulaire anti-VZV post-transplantation.

Patients	Type de greffe	Âge ^a	Sexe	Diagnostic	Prélevé à :
277 ^b	GSCO allogénique non apparentée	5,24	M	LANL	6, 9, 12 mois
279	GSCO allogénique non apparentée	5,86	M	LAL	12, 18 mois
2923102	GSCO allogénique non apparentée	5,49	M	LAL	6, 18 mois
2816009	GSCO allogénique non apparentée	0,59	M	Maladie de Farber	12, 18 mois
2848424	GSCO allogénique non apparentée	14,11	M	LAL	9, 12, 21 mois
2856583	GSCO allogénique non apparentée	15,74	M	LAL	6, 9, 12, 21 mois
2863225	GSCO allogénique non apparentée	0,68	M	SCID	9, 12, 18 mois
389	GMO allogénique non apparentée	12,56	M	AAS	6, 18 mois
2947895	GMO allogénique apparentée	11.11	F	AAS	6, 9, 12 mois

^aAge au moment de la greffe.

^bPatient décédé d'une rechute due à la persistance de la maladie.

LANL : leucémie aigüe non-lymphoblastique; LAL : leucémie aigüe lymphoblastique; SCID : *severe combined immunodeficiency* (immunodéficience combinée sévère); AAS : anémie aplasique sévère.

2.2 Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique.

Le sang total (2-5 ml) a été collecté dans des tubes contenant de l'EDTA ou de l'héparine comme anticoagulant (Becton Dickinson, Mississauga, Canada) à 6, 9, 12 et 18 mois (ou 21 mois). Les cellules du sang périphérique (PBMC) ont été isolées par gradient de Ficoll (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada) et cryopréservées dans du sérum de veau foetal (SVF) (Invitrogen, Burlington, Canada) contenant 10% (v/v) de DMSO (Sigma, St-Louis, MO). Les aliquots ont été entreposés dans l'azote liquide.

2.3 ELISpot-VZV-IFN- γ .

Les PBMC ont été décongelées en présence de nucléase Benzonase (Novagen, Madison, WI) et ont été resuspendues dans du milieu RPMI 1640 avec 20% de SVF et 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine (Invitrogen). Les cellules obtenues ont été incubées toute la nuit dans des flasques à une concentration de $1-2 \times 10^6$ cellules/ml à 37°C et 5% CO_2 . Les essais ont été effectués dans des plaques 96 puits Multiscreen IP plates (Millipore, Bedford, MA) dans lesquelles on avait préalablement fixé des anticorps de capture anti-IFN- γ anti-humain de souris (NIB42; BD Biosciences, San Diego, CA) dilués à 10 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS (Invitrogen). Les plaques ont été bloquées durant 2 h à 37°C avec du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVF et 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine (Invitrogen). Les concentrations de PBMC ont été déterminées en utilisant un hémacytomètre. Les cellules ont ensuite été diluées à une concentration finale de 2×10^6 cellules/ml dans du milieu AIM-V (Invitrogen) contenant 2% (v/v) de sérum humain inactivé

(Wisent, St-Jean-Baptiste, Canada). 100 µl de suspension a été ajoutés dans chaque puits, combiné avec 100 µl d'antigène VZV dilué à 1/200, 1/400, et/ou 1/800 dans du milieu AIM-V. Le Varivax[®] III irradié (10 000Gy) (Merck Frosst; 1 350 pfu/ml) a été utilisé comme antigène VZV. Un anticorps anti-CD3 (OKT3; Sanquin, Amsterdam, Hollande) a été utilisé comme contrôle positif (0.005 µg/ml), alors que les cellules incubées seules dans de l'AIM-V et du sérum humain inactivé (2%) ont été utilisées comme contrôle négatif. Les plaques ont été développées par l'ajout de 0.5 µg/ml d'anticorps anti-IFN-γ couplés à la biotine (4S.B3; BD Biosciences) et de phosphatase alcaline conjuguée à la streptavidine (Bio-Rad, Hercules, CA). Les plaques ont été lavées et incubées avec du BCIP/NBT (Bio-Rad). Les immunospots ont été comptés avec un compteur ELISpot automatisé (CTL ImmunoSpot S4 UV Analyser, CTL Technology Ltd., Shaker Heights, OH). Le bruit de fond a été soustrait et la production d'IFN-γ a été exprimée en nombre d'immunospots (*spot-forming units* (SFU)) par 10⁶ PBMC.

3. Résultats préliminaires

3.1 Quantification de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV post-greffe.

L'ELISpot-VZV-IFN-γ a été effectué sur tous les échantillons de PBMC de patients greffés obtenus dans le cadre de cette étude en utilisant des dilutions 1/200, 1/400 et/ou 1/800 de Varivax[®] III irradié. Les résultats présentés sont ceux obtenus avec la dilution VZV 1/200, puisque c'est la dilution qui a été utilisée

pour générer les valeurs de référence chez la population pédiatrique saine. La production d'IFN- γ est exprimée en termes de SFU/10⁶ PBMC. À 6 mois post-transplantation (n = 4), la médiane et la moyenne de lymphocytes T VZV-spécifiques sont respectivement de 0.0 et 8.8 SFU/10⁶ PBMC (IIQ = 0.0 – 35.0 SFU/10⁶ PBMC). Les résultats demeurent sensiblement les mêmes à 9 mois post-greffe (n = 5) avec une médiane et une moyenne de 0.0 et 5.0 SFU/10⁶ PBMC respectivement (IIQ = 0.0 – 25.0 SFU/10⁶ PBMC). On note une légère augmentation de lymphocytes T VZV-spécifiques à 12 mois post-greffe (n = 7) avec une médiane de 10.0 SFU/10⁶ PBMC et une moyenne de 23.6 SFU/10⁶ PBMC (IIQ = 0.0 – 100.0 SFU/10⁶ PBMC). Six mois après la cessation de la prophylaxie antivirale, soit à 18 mois post-greffe (n = 6), on observe une réponse à médiation cellulaire anti-VZV aussi faible que celles observées à 6 et 9 mois post-transplantation. La moyenne ainsi que la médiane sont de 5.0 SFU/10⁶ PBMC (IIQ = 0.0 – 10.0 SFU/10⁶ PBMC). Les échantillons de PBMC de greffés obtenus à 21 mois post-greffe (impossibilité de les prélever à 18 mois) (n = 2) montrent pour la première fois une reconstitution immunitaire anti-VZV. La moyenne et la médiane sont de 220.0 SFU/10⁶ PBMC (IIQ = 35.0 – 405.0) (Figure 1). Les résultats préliminaires semblent montrer que la reconstitution immunitaire anti-VZV est très lente à la suite de la greffe, puisque que l'on observe aucune valeur supérieure à la valeur de référence (190.0 SFU/10⁶ PBMC) durant les 18 premiers mois post-greffe. Seul le patient 2856583 a réussi à reconstituer son immunité anti-VZV, et cela, à 21 mois post-greffe. L'évolution de la réponse à médiation cellulaire anti-

VZV pour chacun des enfants ayant eu une GMO ou une GSCO est présentée dans la figure 2.

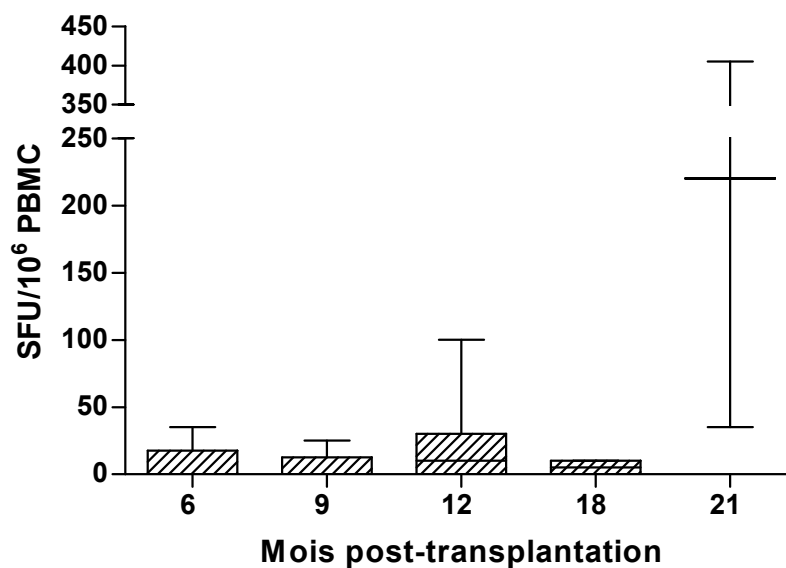


Figure 1. Quantification de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV chez les enfants greffés de MO ou de SCO pour chacun des temps étudiés. L'ELISpot-VZV-IFN- γ a été effectué tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Une dilution 1/200 du Varivax[®] III irradié a été utilisée.

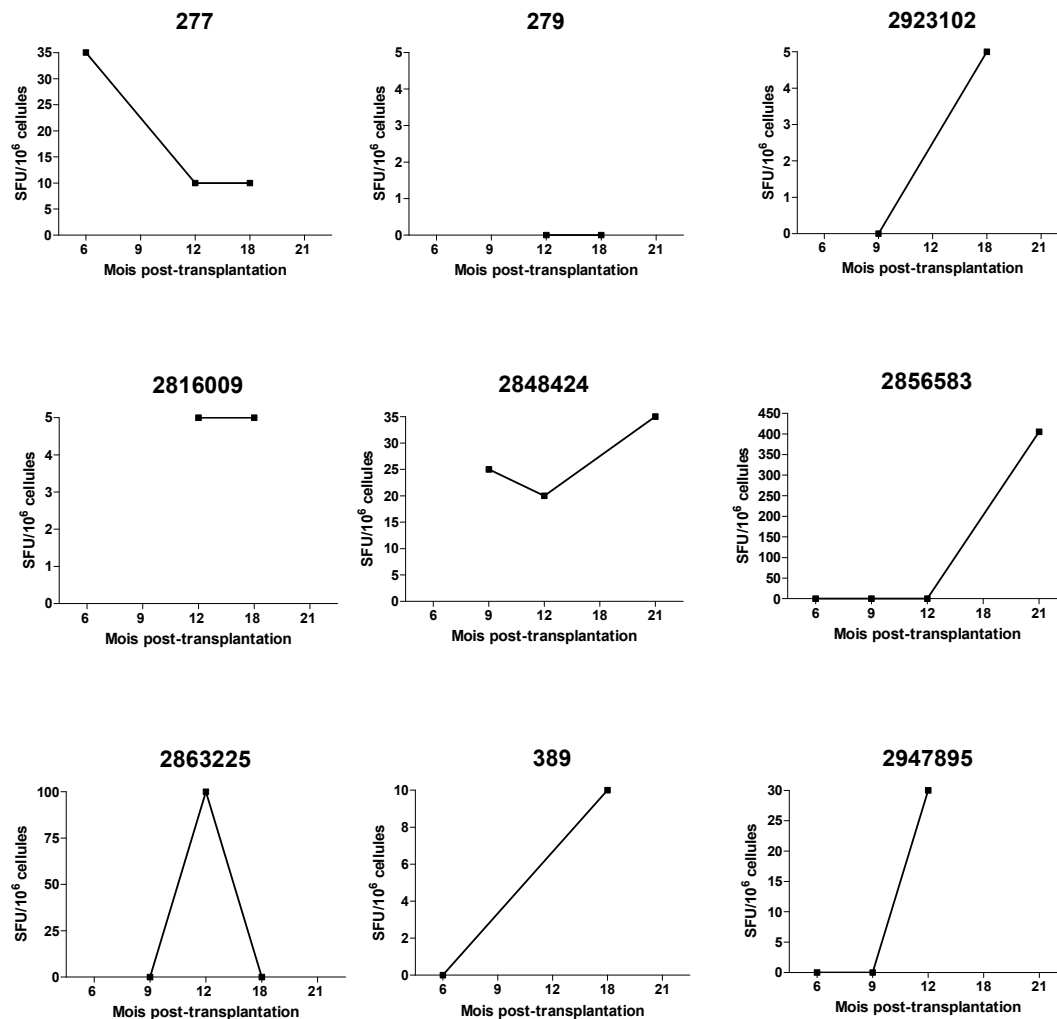


Figure 2. Étude prospective de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV présentée pour chacun des enfants greffés de MO ou de SCO. L'ELISpot-VZV-IFN- γ a été effectué tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Une dilution 1/200 du Varivax[®] III a été utilisée.

4. Discussion

La réactivation ou l'infection primaire du VZV sont des complications communes à la suite d'une GMO ou d'une GSCO. À l'heure actuelle, la prévention de ces complications repose principalement sur l'administration à long terme d'une prophylaxie antivirale (Boeckh et al., 2006; Tomblyn et al., 2009). La reconstitution de l'immunité à médiation cellulaire anti-VZV peut être suivie en utilisant l'ELISpot-IFN- γ . Précédemment, nous avons mis au point une méthode d'ELISpot-VZV-IFN- γ avec laquelle nous avons généré des valeurs de référence de la réponse anti-VZV auprès de 150 enfants sains (Grenier et al., 2010, soumis pour publication; chapitre 2). À partir de cette étude, nous avons proposé qu'un enfant ayant un résultat ELISpot-VZV-IFN- γ supérieur à 190.0 SFU/10⁶ PBMC était considéré comme étant protégé contre le VZV.

Même si l'on sait qu'il existe des différences dans la reconstitution immunitaire à la suite d'une GMO *versus* une GSCO, les données obtenues pour chacune de ces greffes ont été compilées et aucune comparaison n'a été effectuée dû au faible nombre de sujets étudiés. En étudiant la réponse à médiation cellulaire anti-VZV de manière prospective chez les enfants greffés de MO ou de SCO, nous avons observé une reconstitution de l'immunité anti-VZV chez un seul patient (2856583) selon notre valeur de référence, et cela, à 21 mois post-transplantation (405 SFU/10⁶ PBMC).

On remarque également qu'aucun patient greffé de MO ou de SCO n'a été en mesure de reconstituer son immunité anti-VZV à l'intérieur d'une période de 12 mois. Cette période de 12 mois correspond à la durée durant laquelle les enfants greffés reçoivent une prophylaxie antiherpétique. Une étude publiée en 2008 a démontré qu'une réactivation varicelleuse était nécessaire pour reconstituer l'immunité anti-VZV (Distler et al., 2008). Dans cette étude, les patients greffés ayant eu un épisode de zona montraient un niveau de lymphocytes T VZV-spécifiques similaire à celui des patients sains avec une histoire de varicelle. À l'inverse, les patients n'ayant pas eu de réactivation du VZV dans la première année post-greffe n'avaient pas de lymphocytes T VZV-spécifiques. Une situation similaire avait été observée avec le CMV, alors que la reconstitution des cellules T corrélait avec la réactivation du virus (Cwynarski et al., 2001; Gratama et al., 2001). Si cette hypothèse s'avère exacte, la prophylaxie antivarielle administrée à long terme empêcherait indirectement la reconstitution immunitaire anti-VZV, puisque cette dernière prévient les réactivations du VZV. Cependant, dans notre étude, rien n'indique que le patient 2856583, le seul ayant reconstitué son immunité anti-VZV, a eu un épisode de varicelle ou de zona. Les résultats obtenus (aucune reconstitution anti-VZV complète durant la première année et même durant les premiers 18 mois) viennent cependant renforcer l'idée qu'une immunisation post-greffe pourrait représenter une excellente alternative ou un complément à l'utilisation d'agents anti-herpétiques (Hata et al., 2002; Sauerbrei et al., 1997).

Chapitre 4 : Discussion

Notre étude a permis de mettre au point une méthode d'analyse biomédicale (ELISpot-VZV-IFN- γ) avec laquelle nous avons généré des valeurs de référence de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV. Ces valeurs pourront éventuellement être utilisées par les médecins-greffeurs pour la prise de décision en ce qui concerne les traitements antiviraux chez les greffés de CSH.

ELISpot-VZV-IFN- γ

Nous avons choisi d'utiliser l'ELISpot-IFN- γ pour étudier la réponse à médiation cellulaire anti-VZV. L'essai ELISpot-IFN- γ a déjà été utilisé dans des études précédentes portant sur l'immunité à médiation cellulaire anti-VZV (Distler et al., 2008; Levin et al., 2003; Malavige et al., 2008; Sadaoka et al., 2008; Smith et al., 2001). À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir opté pour le Varivax[®] III (Merck Frosst) comme antigène VZV dans un essai ELISpot. L'uniformité de la source d'antigène que le vaccin nous assure et l'absence de manipulation et de culture de souches vivantes et sauvages du VZV sont les principales raisons qui nous ont motivés à faire ce choix dans un milieu hospitalier où les infections nosocomiales sont particulièrement préoccupantes.

Réponses LTC et Th VZV-spécifiques chez la population pédiatrique : Génération de valeurs de référence

Afin d'étudier la réponse immunitaire anti-VZV chez les enfants sains, trois groupes de sujets ont été assemblés : a) enfants avec une histoire de varicelle (Groupe 1), b) enfants sans histoire de varicelle passée (Groupe 2) et c) enfants

ayant été récemment immunisés par le vaccin VZV (Groupe 3 : rappel du Groupe 2, 90 jours après la vaccination).

Les résultats ont démontré que les enfants ayant eu une varicelle naturelle présentaient un niveau significativement plus élevé de cellules T VZV-spécifiques que les enfants n'ayant jamais été en contact avec ce virus. Les enfants récemment vaccinés montraient également un niveau plus élevés de lymphocytes T VZV-spécifiques que les enfants sans histoire de varicelle, mais beaucoup moindre que les enfants ayant eu la varicelle naturelle. Ce dernier résultat corrobore certaines études où il a été démontré qu'une seule dose de vaccin était insuffisante pour conférer une protection maximale anti-VZV (Chaves et al., 2007; Lopez et al., 2006; Michalik et al., 2008; Watson, 2008). Aux États-Unis, on recommande maintenant deux doses de vaccin VZV chez les enfants, soit une première dose à l'âge de 12-15 mois et la seconde dose à l'âge de 4-6 ans (Marin et al., 2007). Au Québec, les enfants ne reçoivent toujours qu'une seule dose de vaccin VZV.

Détermination d'une valeur-seuil

À la lumière des résultats obtenus chez la population pédiatrique saine, nous avons suggéré deux façons de déterminer la valeur-seuil de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV requise pour prévenir une infection à VZV. La première était basée sur la médiane du groupe d'enfants ayant été immunisés par le Varivax[®] III ou le Priorix-Tetra[™] (Groupe 3). Bien qu'il existe une certaine controverse sur l'efficacité de la vaccination à une dose, ces vaccins ont tout de même un taux

d'efficacité de 80 à 85% pour prévenir les épisodes de varicelle, toute sévérité confondue, et de > 95% pour prévenir les cas de varicelles sévères (Marin et al., 2008). Cependant, étant donné que cette médiane, exprimée en termes de SFU, est relativement basse, une proportion considérable d'enfants non-immuns seront faussement catégorisés comme étant des enfants protégés contre le VZV. La seconde façon suggérée pour établir une valeur-seuil est l'utilisation du 95^e centile (190.0 SFU/10⁶ PBMC) du groupe d'enfants sans histoire de varicelle (Groupe 2). Nous pensons qu'au dessus de cette valeur, il y a très peu de chance qu'un enfant développe une maladie à VZV. Cette valeur est très conservatrice puisqu'elle est supérieure à la médiane des enfants ayant eu la varicelle naturelle (Groupe 1 : 115.0 SFU/10⁶ PBMC). Certes, des études longitudinales devront être effectuées sur les greffés de MO et de SCO pour déterminer si cette valeur-seuil permet véritablement de conférer une immunité anti-VZV chez les greffés. En nous basant sur nos résultats préliminaires (chapitre 3) et sur les données obtenues par d'autres groupes (Distler et al., 2008), on peut cependant présumer que cette valeur-seuil ne sera pas atteinte par les enfants greffés de MO ou de SCO dans les premiers mois, voire même la première année suivant la greffe.

Réponses LTC et Th VZV-spécifiques chez les GMO et GSCO

Pour étudier la réponse à médiation cellulaire anti-VZV post-greffe, nous avons comme objectif de recruter 15 receveurs de MO et 15 receveurs de SCO à 6, 9, 12 et 18 mois auprès du Service d'hémo-oncologie du CHU Sainte-Justine. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de recruter autant de patients en tenant

compte de la durée de ma maîtrise et du nombre de greffes effectuées au CHU Sainte-Justine durant cette période. La réponse à médiation cellulaire anti-VZV post-transplantation a été mesurée par l'ELISpot-VZV-IFN- γ . Nous nous attendions à observer une augmentation du nombre de lymphocytes T VZV-spécifiques au fur et à mesure que la reconstitution immunitaire avait lieu chez le receveur de CSH. Toutefois, le nombre de lymphocytes T VZV-spécifiques est demeuré quasi-indétectable ou presque tout au long de la reconstitution immunitaire chez tous les enfants greffés suivis sur une période de 21 mois, à l'exception de 2 patients chez qui nous avons pu observer des valeurs égales ou supérieures à 100 SFU/10⁶ PBMC. Donc, nous pouvons penser que la prophylaxie antivarielle administrée à long terme empêcherait la reconstitution immunitaire anti-VZV. Si cette affirmation est réellement fondée, la prophylaxie administrée sur une longue période de temps ne ferait que remettre à plus tard les cas de varicelle ou de zona. Cependant, une étude a montré qu'il était faux de croire que l'interruption de la prophylaxie antivirale entraîne nécessairement l'apparition des maladies à VZV (phénomène de « rebound ») (Erard et al., 2007). Une des approches proposées pour améliorer la prévention des maladies à VZV repose sur la vaccination post-greffe avec un vaccin adapté aux besoins des personnes dont le système immunitaire est affaibli (Hata et al., 2002; Sauerbrei et al., 1997). Cette alternative pourrait être combinée avec les traitements actuels basés sur l'administration d'agents antiviraux.

Approfondissement de l'étude sur l'immunité anti-VZV

Afin d'approfondir nos connaissances sur l'immunité à médiation cellulaire anti-VZV, nous pourrions également étudier le phénotype de surface et la multifonctionnalité des cellules T VZV-spécifiques (production d'IFN- γ et d'IL-2) par marquage de cytokines intracellulaires et cytométrie en flux. L'IL-2 est une cytokine produite, entre autres, par les lymphocytes T activés et plus particulièrement par les lymphocytes Th CD4⁺, bien que les CD8⁺ et les cellules NK puissent en sécréter dans certaines conditions (Chavez et al., 2009). Il est également possible d'effectuer des ELISpot qui mesurent à la fois la production d'IFN- γ et d'IL-2 (Boulet et al., 2007). Une autre façon d'étudier la réponse anti-VZV serait de suivre l'expression de surface du CD107a (LAMP-1), qui est un marqueur de la dégranulation. Le CD107a est une glycoprotéine appartenant à la famille des LAMP (lysosome associated membrane protein), qui se situe sur les granules lytiques tout comme le CD107b (LAMP-2) ou le CD63 (LAMP-3) et qui permet de donner des indications sur le potentiel cytotoxique des cellules (Peters et al., 1991). Cependant, cette molécule est principalement exprimée par les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK (Alter et al., 2004; Betts et al., 2003), alors que la majorité des études démontrent que les lymphocytes T CD4⁺ sont davantage impliqués dans la réponse anti-VZV (Asanuma et al., 2000). Ce phénomène, à savoir qu'on retrouve très peu ou pas de lymphocytes T CD8⁺ VZV-spécifiques, est peu connu. On pourrait supposer que les cellules T CD8⁺ sont impliquées dans la pathogénèse du VZV pour la propagation du virus ou encore que les cellules T CD4⁺ possèdent des mécanismes d'évasion pour

empêcher l'entrée du virus. De plus, la localisation des cellules T CD8⁺ VZV-spécifiques en périphérie pourraient également expliquer pourquoi elles sont indétectables. Finalement, il serait également pertinent de détecter la présence de perforine et de granzyme B. Ces molécules sont également des indicateurs du potentiel cytotoxique des LTC (Chavez-Galan et al., 2009). Quoiqu'il en soit, l'IFN- γ est toujours l'une des cytokines de choix pour mesurer les réponses antivirales. La destruction des pathogènes intracellulaires nécessite la production d'IFN- γ par les cellules T (Miller et al., 2009). L'IFN- γ permet, entre autres, de réguler à la hausse les protéines PKR (Donze et al., 1999; Meurs et al., 1990; Wong et al., 1997), ADAR1 (Patterson et al., 1995) et GBP1/-2 (Anderson et al., 1999; Kimura et al., 1996; Vestal et al., 2000) qui ont tous un rôle à jouer dans la réponse immunitaire antivirale.

Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

Le VZV demeure un virus somme toute très peu connu. Peu d'études ont été effectuées sur ce virus comparativement à d'autres virus, tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le cytomegalovirus, (CMV), le virus d'Epstein-Barr (EBV) et les virus herpes simplex (HSV) pour ne nommer que ceux-ci. La croyance populaire qui veut que ce virus ne cause que des maladies bénignes et indolentes a possiblement joué un rôle dans le manque d'intérêt qui a été porté à ce virus.

Dans ce projet de maîtrise, nous avons voulu déterminer quel était le nombre de lymphocytes T VZV-spécifiques requis pour combattre une infection à VZV dans le but de l'utiliser comme valeur de référence pour mieux juger de la nécessité d'une prophylaxie anti-VZV chez les enfants greffés de MO et de SCO. Nous sommes arrivés à la conclusion qu'une valeur de $190.0 \text{ SFU}/10^6 \text{ PBMC}$ pouvait être considérée comme étant le nombre de lymphocytes T VZV-spécifiques nécessaire pour conférer une immunité anti-VZV et ainsi permettre la cessation de la prophylaxie.

L'étude préliminaire de la réponse à médiation cellulaire anti-VZV post-transplantation n'a pas donné les résultats escomptés. En effet, les essais ELISpot-VZV-IFN- γ n'ont pas permis d'observer une hausse du nombre de lymphocytes T VZV-spécifiques dans les mois suivants la transplantation. La prophylaxie anti-VZV semble empêcher le développement de réponses à médiation cellulaire anti-VZV chez les greffés alors que l'on avait émis l'hypothèse contraire. Bien que

n'étant pas l'objectif de départ de ce projet, notre étude permet cependant de fournir des arguments additionnels en faveur de l'immunisation chez les enfants ayant eu une TCSH.

Afin de confirmer les résultats préliminaires obtenus, d'autres enfants ayant reçu une GMO ou une GSCO continuent d'être recrutés au CHU Sainte-Justine. Une étude longitudinale canadienne, en collaboration avec des hôpitaux de la Colombie-Britannique et de l'Ontario, permettra d'augmenter significativement le nombre de sujets greffés recrutés dans chaque bras de l'étude, ce qui confèrera une puissance statistique accrue.

Références

Abendroth, A., et Arvin, A. (2001a). Immune evasion mechanisms of varicella-zoster virus. *Arch Virol Suppl*, 99-107.

Abendroth, A., Lin, I., Slobedman, B., Ploegh, H., et Arvin, A.M. (2001b). Varicella-zoster virus retains major histocompatibility complex class I proteins in the Golgi compartment of infected cells. *J Virol* 75, 4878-4888.

Abendroth, A., Morrow, G., Cunningham, A.L., et Slobedman, B. (2001c). Varicella-zoster virus infection of human dendritic cells and transmission to T cells: implications for virus dissemination in the host. *J Virol* 75, 6183-6192.

Abendroth, A., Slobedman, B., Lee, E., Mellins, E., Wallace, M., et Arvin, A.M. (2000). Modulation of major histocompatibility class II protein expression by varicella-zoster virus. *J Virol* 74, 1900-1907.

Aebi, C., Ahmed, A., et Ramilo, O. (1996). Bacterial complications of primary varicella in children. *Clin Infect Dis* 23, 698-705.

Alter, G., Malenfant, J.M., et Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294, 15-22.

Anderson, S.L., Carton, J.M., Lou, J., Xing, L., et Rubin, B.Y. (1999). Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* 256, 8-14.

Appelbaum, E., Rachelson, M.H., et Dolgopol, V.B. (1953). Varicella encephalitis. *Am J Med* 15, 223-230.

Arvin, A.M. (1992). Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 166 *Suppl* 1, S35-41.

Arvin, A.M. (1996). Varicella-zoster virus. *Clin Microbiol Rev* 9, 361-381.

Arvin, A.M. (2008). Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus: an overview. *J Infect Dis* 197 *Suppl* 2, S58-60.

Arvin, A.M., Sharp, M., Smith, S., Koropchak, C.M., Diaz, P.S., Kinchington, P., Ruyechan, W., et Hay, J. (1991). Equivalent recognition of a varicella-zoster virus immediate early protein (IE62) and glycoprotein I by cytotoxic T lymphocytes of either CD4+ or CD8+ phenotype. *J Immunol* 146, 257-264.

Asanuma, H., Sharp, M., Maecker, H.T., Maino, V.C., et Arvin, A.M. (2000). Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *J Infect Dis* 181, 859-866.

Atkinson, K., Meyers, J.D., Storb, R., Prentice, R.L., et Thomas, E.D. (1980). Varicella-zoster virus infection after marrow transplantation for aplastic anemia or leukemia. *Transplantation* 29, 47-50.

Baba, K., Yabuuchi, H., Takahashi, M., et Ogra, P.L. (1986). Increased incidence of herpes zoster in normal children infected with varicella zoster virus during infancy: community-based follow-up study. *J Pediatr* 108, 372-377.

Baker, R.O., et Hall, J.D. (1998). Impaired mismatch extension by a herpes simplex DNA polymerase mutant with an editing nuclease defect. *J Biol Chem* 273, 24075-24082.

Banerjee, A. (1998). Zona in children. *Arch Pediatr* 5, 199-203.

Barrett-Muir, W., Scott, F.T., Aaby, P., John, J., Matondo, P., Chaudhry, Q.L., Siqueira, M., Poulsen, A., Yaminishi, K., et Breuer, J. (2003). Genetic variation of varicella-zoster virus: evidence for geographical separation of strains. *J Med Virol* 70 Suppl 1, S42-47.

Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., De Rosa, S.C., Douek, D.C., Roederer, M., et Koup, R.A. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281, 65-78.

Bianchetti, M.G., Roduit, C., et Oetliker, O.H. (1991). Acyclovir-induced renal failure: course and risk factors. *Pediatr Nephrol* 5, 238-239.

Boeckh, M., Kim, H.W., Flowers, M.E., Meyers, J.D., et Bowden, R.A. (2006). Long-term acyclovir for prevention of varicella zoster virus disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation--a randomized double-blind placebo-controlled study. *Blood* 107, 1800-1805.

Boulet, S., Ndongala, M.L., Peretz, Y., Boisvert, M.P., Boulassel, M.R., Tremblay, C., Routy, J.P., Sekaly, R.P., et Bernard, N.F. (2007). A dual color ELISPOT method for the simultaneous detection of IL-2 and IFN-gamma HIV-specific immune responses. *J Immunol Methods* 320, 18-29.

Breuer, J., Grose, C., Norberg, P., Tipples, G., et Schmid, D.S. (2010). A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the genus varicella-zoster virus. *J Gen Virol* 91, 821-828.

Brigden, D., Rosling, A.E., et Woods, N.C. (1982). Renal function after acyclovir intravenous injection. *Am J Med* 73, 182-185.

Brisson, M., Gay, N.J., Edmunds, W.J., et Andrews, N.J. (2002). Exposure to varicella boosts immunity to herpes-zoster: implications for mass vaccination against chickenpox. *Vaccine* 20, 2500-2507.

Brunell, P.A. (1992). Varicella in pregnancy, the fetus, and the newborn: problems in management. *J Infect Dis* *166 Suppl 1*, S42-47.

Brunner, K.T., Mael, J., Cerottini, J.C., et Chapuis, B. (1968). Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* *14*, 181-196.

Burke, B.L., Steele, R.W., Beard, O.W., Wood, J.S., Cain, T.D., et Marmer, D.J. (1982). Immune responses to varicella-zoster in the aged. *Arch Intern Med* *142*, 291-293.

Calendrier régulier de vaccination. Direction des communications du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec, 2010. Disponible sur www.msss.gouv.qc.ca/sujets/santepub/vaccination.

Callan, M.F., Tan, L., Anells, N., Ogg, G.S., Wilson, J.D., O'Callaghan, C.A., Steven, N., McMichael, A.J., et Rickinson, A.B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8⁺ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* *187*, 1395-1402.

Carr, M.J., McCormack, G.P., et Crowley, B. (2004). Genetic variation in clinical varicella-zoster virus isolates collected in Ireland between 2002 and 2003. *J Med Virol* *73*, 131-136.

Champagne, M., Duval, M., et Wagener, E. (2006). La transplantation de sang de cordon au Québec. *Ann Biol Clin Qué*, 3-10.

Champagne, P., Ogg, G.S., King, A.S., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G.P., Fleury, S., Lipp, M., *et al.* (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* *410*, 106-111.

Chaves, S.S., Gargiullo, P., Zhang, J.X., Civen, R., Guris, D., Mascola, L., et Seward, J.F. (2007). Loss of vaccine-induced immunity to varicella over time. *N Engl J Med* *356*, 1121-1129.

Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R., et Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* *6*, 15-25.

Chavez, A.R., Buchser, W., Basse, P.H., Liang, X., Appleman, L.J., Maranchie, J.K., Zeh, H., de Vera, M.E., et Lotze, M.T. (2009). Pharmacologic administration of interleukin-2. *Ann N Y Acad Sci* *1182*, 14-27.

Cohen, J.I. (1998). Infection of cells with varicella-zoster virus down-regulates surface expression of class I major histocompatibility complex antigens. *J Infect Dis* *177*, 1390-1393.

Cohrs, R.J., Hurley, M.P., et Gilden, D.H. (2003). Array analysis of viral gene transcription during lytic infection of cells in tissue culture with Varicella-Zoster virus. *J Virol* 77, 11718-11732.

Copelan, E.A. (2006). Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 354, 1813-1826.

Cwynarski, K., Ainsworth, J., Cobbold, M., Wagner, S., Mahendra, P., Apperley, J., Goldman, J., Craddock, C., et Moss, P.A. (2001). Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 97, 1232-1240.

Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H.P., Nilsson, L.A., Klareskog, L., et Ouchterlony, O. (1988). Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods* 110, 29-36.

Czerkinsky, C.C., Nilsson, L.A., Nygren, H., Ouchterlony, O., et Tarkowski, A. (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 65, 109-121.

Davison, A.J. (1991). Varicella-zoster virus. The Fourteenth Fleming lecture. *J Gen Virol* 72 (Pt 3), 475-486.

Davison, A.J., et Scott, J.E. (1986). The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol* 67 (Pt 9), 1759-1816.

Dayan, G.H., Panero, M.S., Debbag, R., Urquiza, A., Molina, M., Prieto, S., Del Carmen Perego, M., Scagliotti, G., Galimberti, D., Carroli, G., *et al.* (2004). Varicella seroprevalence and molecular epidemiology of varicella-zoster virus in Argentina, 2002. *J Clin Microbiol* 42, 5698-5704.

Distler, E., Schnurer, E., Wagner, E., von Auer, C., Plachter, B., Wehler, D., Huber, C., Kolbe, K., Meyer, R.G., et Herr, W. (2008). Recovery of varicella-zoster virus-specific T cell immunity after T cell-depleted allogeneic transplantation requires symptomatic virus reactivation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 1417-1424.

Dolin, R., Reichman, R.C., Mazur, M.H., et Whitley, R.J. (1978). NIH conference. Herpes zoster-varicella infections in immunosuppressed patients. *Ann Intern Med* 89, 375-388.

Donze, O., Dostie, J., et Sonenberg, N. (1999). Regulatable expression of the interferon-induced double-stranded RNA dependent protein kinase PKR induces apoptosis and fas receptor expression. *Virology* 256, 322-329.

Dworkin, R.H., et Portenoy, R.K. (1996). Pain and its persistence in herpes zoster. *Pain* 67, 241-251.

Eapen, M., Rubinstein, P., Zhang, M.J., Stevens, C., Kurtzberg, J., Scaradavou, A., Loberiza, F.R., Champlin, R.E., Klein, J.P., Horowitz, M.M., *et al.* (2007). Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* *369*, 1947-1954.

Eisfeld, A.J., Yee, M.B., Erazo, A., Abendroth, A., et Kinchington, P.R. (2007). Downregulation of class I major histocompatibility complex surface expression by varicella-zoster virus involves open reading frame 66 protein kinase-dependent and -independent mechanisms. *J Virol* *81*, 9034-9049.

Enders, G., Miller, E., Cradock-Watson, J., Bolley, I., et Ridehalgh, M. (1994). Consequences of varicella and herpes zoster in pregnancy: prospective study of 1739 cases. *Lancet* *343*, 1548-1551.

Erard, V., Guthrie, K.A., Varley, C., Heugel, J., Wald, A., Flowers, M.E., Corey, L., et Boeckh, M. (2007). One-year acyclovir prophylaxis for preventing varicella-zoster virus disease after hematopoietic cell transplantation: no evidence of rebound varicella-zoster virus disease after drug discontinuation. *Blood* *110*, 3071-3077.

Feldman, S. (1994). Varicella-zoster virus pneumonitis. *Chest* *106*, 22S-27S.

Feusner, J.H., Slichter, S.J., et Harker, L.A. (1979). Mechanisms of thrombocytopenia in varicella. *Am J Hematol* *7*, 255-264.

Frey, C.R., Sharp, M.A., Min, A.S., Schmid, D.S., Loparev, V., et Arvin, A.M. (2003). Identification of CD8⁺ T cell epitopes in the immediate early 62 protein (IE62) of varicella-zoster virus, and evaluation of frequency of CD8⁺ T cell response to IE62, by use of IE62 peptides after varicella vaccination. *J Infect Dis* *188*, 40-52.

Galil, K., Brown, C., Lin, F., et Seward, J. (2002). Hospitalizations for varicella in the United States, 1988 to 1999. *Pediatr Infect Dis J* *21*, 931-935.

Garnett, G.P., Cox, M.J., Bundy, D.A., Didier, J.M., et St Catharine, J. (1993). The age of infection with varicella-zoster virus in St Lucia, West Indies. *Epidemiol Infect* *110*, 361-372.

Gershon, A.A., Mervish, N., LaRussa, P., Steinberg, S., Lo, S.H., Hodes, D., Fikrig, S., Bonagura, V., et Bakshi, S. (1997). Varicella-zoster virus infection in children with underlying human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* *176*, 1496-1500.

Gilden, D.H., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., LaGuardia, J.J., Mahalingam, R., et Cohrs, R.J. (2000). Neurologic complications of the reactivation of varicella-zoster virus. *N Engl J Med* *342*, 635-645.

Gilden, D.H., Vafai, A., Shtram, Y., Becker, Y., Devlin, M., et Wellish, M. (1983). Varicella-zoster virus DNA in human sensory ganglia. *Nature* 306, 478-480.

Giraud, P., Thuret, I., Reviron, D., Chambost, H., Brunet, C., Novakovitch, G., Farnarier, C., et Michel, G. (2000). Immune reconstitution and outcome after unrelated cord blood transplantation: a single paediatric institution experience. *Bone Marrow Transplant* 25, 53-57.

Giustina, A., Romanelli, G., Cimino, A., et Brunori, G. (1988). Low-dose acyclovir and acute renal failure. *Ann Intern Med* 108, 312.

Gluckman, E. (2006). Cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 808-812.

Gluckman, E. (2009). History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 44, 621-626.

Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., *et al.* (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321, 1174-1178.

Gluckman, E., et Rocha, V. (2004a). Cord blood transplantation for children with acute leukaemia: a Eurocord registry analysis. *Blood Cells Mol Dis* 33, 271-273.

Gluckman, E., Rocha, V., Arcese, W., Michel, G., Sanz, G., Chan, K.W., Takahashi, T.A., Ortega, J., Filipovich, A., Locatelli, F., *et al.* (2004b). Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 32, 397-407.

Gluckman, E., Rocha, V., Boyer-Chammard, A., Locatelli, F., Arcese, W., Pasquini, R., Ortega, J., Souillet, G., Ferreira, E., Laporte, J.P., *et al.* (1997). Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 337, 373-381.

Gnann, J.W., Jr., et Whitley, R.J. (2002). Clinical practice. Herpes zoster. *N Engl J Med* 347, 340-346.

Gogos, C.A., Bassaris, H.P., et Vagenakis, A.G. (1992). Varicella pneumonia in adults. A review of pulmonary manifestations, risk factors and treatment. *Respiration* 59, 339-343.

Goldsby, R.A., Kindt, T.J., et Osborne, B.A. (2000). *Immunologie Le cours de Janis Kuby*, 4e edn (Paris).

Gratama, J.W., van Esser, J.W., Lamers, C.H., Tournay, C., Lowenberg, B., Bolhuis, R.L., et Cornelissen, J.J. (2001). Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* 98, 1358-1364.

Grenier, A.J., Yang, R., Jolette, E., Valois, S., Lapointe, N., Chicoine, J.F., Ovetchkine, P., et Soudeyins, H. (2010). Varicella zoster virus (VZV)-specific T cells in children who contracted varicella and children immunized with live attenuated VZV vaccine: exploring threshold values for VZV-specific cell-mediated immune responses. *Soumis pour publication dans Vaccine*.

Grose, C. (1981). Variation on a theme by Fenner: the pathogenesis of chickenpox. *Pediatrics* 68, 735-737.

Guess, H.A., Broughton, D.D., Melton, L.J., 3rd, et Kurland, L.T. (1986). Population-based studies of varicella complications. *Pediatrics* 78, 723-727.

Guris, D., Jumaan, A.O., Mascola, L., Watson, B.M., Zhang, J.X., Chaves, S.S., Gargiullo, P., Perella, D., Civen, R., et Seward, J.F. (2008). Changing varicella epidemiology in active surveillance sites--United States, 1995-2005. *J Infect Dis* 197 Suppl 2, S71-75.

Han, C.S., Miller, W., Haake, R., et Weisdorf, D. (1994). Varicella zoster infection after bone marrow transplantation: incidence, risk factors and complications. *Bone Marrow Transplant* 13, 277-283.

Hata, A., Asanuma, H., Rinki, M., Sharp, M., Wong, R.M., Blume, K., et Arvin, A.M. (2002). Use of an inactivated varicella vaccine in recipients of hematopoietic-cell transplants. *N Engl J Med* 347, 26-34.

Hayward, A.R., et Herberger, M. (1987). Lymphocyte responses to varicella zoster virus in the elderly. *J Clin Immunol* 7, 174-178.

Hayward, A.R., Pontesilli, O., Herberger, M., Laszlo, M., et Levin, M. (1986). Specific lysis of varicella zoster virus-infected B lymphoblasts by human T cells. *J Virol* 58, 179-184.

Heininger, U., et Seward, J.F. (2006). Varicella. *Lancet* 368, 1365-1376.

Heppleston, J.D., Pearce, K.M., et Yates, P.O. (1959). Varicella encephalitis. *Arch Dis Child* 34, 318-321.

Hernandez, E., Praga, M., Moreno, F., et Montoyo, C. (1991). Acute renal failure induced by oral acyclovir. *Clin Nephrol* 36, 155-156.

Hickling, J.K. (1998). Measuring human T-lymphocyte function. *Expert Rev Mol Med* 1998, 1-20.

Hope-Simpson, R.E. (1965). The Nature of Herpes Zoster: A long-term study and a new hypothesis. *Proc R Soc Med* 58, 9-20.

Htwe, T.H., Bergman, S., et Koirala, J. (2008). Famciclovir substitution for patients with acyclovir-associated renal toxicity. *J Infect* 57, 266-268.

Huch, J.H., Cunningham, A.L., Arvin, A.M., Nasr, N., Santegoets, S.J., Slobedman, E., Slobedman, B., et Abendroth, A. (2010). Impact of varicella-zoster virus on dendritic cell subsets in human skin during natural infection. *J Virol* 84, 4060-4072.

Ihara, T., Kato, T., Torigoe, S., Oitani, K., Isaji, M., Ito, M., Kamiya, H., et Sakura, M. (1991). Antibody response determined with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), neutralizing antibody, and varicella skin test in children with natural varicella and after varicella immunization. *Acta Paediatr Jpn* 33, 43-49.

Insinga, R.P., Itzler, R.F., Pellissier, J.M., Saddier, P., et Nikas, A.A. (2005). The incidence of herpes zoster in a United States administrative database. *J Gen Intern Med* 20, 748-753.

Ito, Y., Kimura, H., Hara, S., Kido, S., Ozaki, T., Nishiyama, Y., et Morishima, T. (2001). Investigation of varicella-zoster virus DNA in lymphocyte subpopulations by quantitative PCR assay. *Microbiol Immunol* 45, 267-269.

Jones, L., Black, A.P., Malavige, G.N., et Ogg, G.S. (2006). Persistent high frequencies of varicella-zoster virus ORF4 protein-specific CD4⁺ T cells after primary infection. *J Virol* 80, 9772-9778.

Jones, L., Black, A.P., Malavige, G.N., et Ogg, G.S. (2007). Phenotypic analysis of human CD4⁺ T cells specific for immediate-early 63 protein of varicella-zoster virus. *Eur J Immunol* 37, 3393-3403.

Karlsson, A.C., Martin, J.N., Younger, S.R., Brecht, B.M., Epling, L., Ronquillo, R., Varma, A., Deeks, S.G., McCune, J.M., Nixon, D.F., *et al.* (2003). Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *J Immunol Methods* 283, 141-153.

Katz, J., Cooper, E.M., Walther, R.R., Sweeney, E.W., et Dworkin, R.H. (2004). Acute pain in herpes zoster and its impact on health-related quality of life. *Clin Infect Dis* 39, 342-348.

Kawasaki, H., Takayama, J., et Ohira, M. (1996). Herpes zoster infection after bone marrow transplantation in children. *J Pediatr* 128, 353-356.

Kimura, T., Kadokawa, Y., Harada, H., Matsumoto, M., Sato, M., Kashiwazaki, Y., Tarutani, M., Tan, R.S., Takasugi, T., Matsuyama, T., *et al.* (1996). Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3 gamma) and IRF-1 in both type I and type

II interferon responses, as revealed by gene targeting studies. *Genes Cells* 1, 115-124.

Koc, Y., Miller, K.B., Schenkein, D.P., Griffith, J., Akhtar, M., DesJardin, J., et Snyderman, D.R. (2000). Varicella zoster virus infections following allogeneic bone marrow transplantation: frequency, risk factors, and clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 6, 44-49.

Konig, A., Homme, C., Hauröder, B., Dietrich, A., et Wolff, M.H. (2003). The varicella-zoster virus induces apoptosis in vitro in subpopulations of primary human peripheral blood mononuclear cells. *Microbes Infect* 5, 879-889.

Kost, R.G., et Straus, S.E. (1996). Postherpetic neuralgia--pathogenesis, treatment, and prevention. *N Engl J Med* 335, 32-42.

Ku, C.C., Zerboni, L., Ito, H., Graham, B.S., Wallace, M., et Arvin, A.M. (2004). Varicella-zoster virus transfer to skin by T Cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon-alpha. *J Exp Med* 200, 917-925.

Kundratitz, K. (1925). Über die Ätiologie des Zoster and über seine Beziehungen zu Varizellen. *Wien Klin Wochenschr* 38, 502-503.

Kurlan, J.G., Connelly, B.L., et Lucky, A.W. (2004). Herpes zoster in the first year of life following postnatal exposure to varicella-zoster virus: four case reports and a review of infantile herpes zoster. *Arch Dermatol* 140, 1268-1272.

Kurtzberg, J., Laughlin, M., Graham, M.L., Smith, C., Olson, J.F., Halperin, E.C., Ciocci, G., Carrier, C., Stevens, C.E., et Rubinstein, P. (1996). Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 335, 157-166.

Lalvani, A., Brookes, R., Hambleton, S., Britton, W.J., Hill, A.V., et McMichael, A.J. (1997). Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med* 186, 859-865.

Larsson, M., Jin, X., Ramratnam, B., Ogg, G.S., Engelmayer, J., Demoitie, M.A., McMichael, A.J., Cox, W.I., Steinman, R.M., Nixon, D., et al. (1999). A recombinant vaccinia virus based ELISPOT assay detects high frequencies of Pol-specific CD8 T cells in HIV-1-positive individuals. *AIDS* 13, 767-777.

Lee, B.W. (1998). Review of varicella zoster seroepidemiology in India and Southeast Asia. *Trop Med Int Health* 3, 886-890.

Levin, M.J., Smith, J.G., Kaufhold, R.M., Barber, D., Hayward, A.R., Chan, C.Y., Chan, I.S., Li, D.J., Wang, W., Keller, P.M., et al. (2003). Decline in varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity with increasing age and boosting with a high-dose VZV vaccine. *J Infect Dis* 188, 1336-1344.

Lewis, G.W. (1958). Zoster sine herpete. *Br Med J* 2, 418-421.

Lewkonja, I.K., et Jackson, A.A. (1973). Infantile herpes zoster after intrauterine exposure to varicella. *Br Med J* 3, 149.

Lindemann, M., Witzke, O., Lutkes, P., Fiedler, M., Kreuzfelder, E., Philipp, T., Roggendorf, M., et Grosse-Wilde, H. (2006). ELISpot assay as a sensitive tool to detect cellular immunity following influenza vaccination in kidney transplant recipients. *Clin Immunol* 120, 342-348.

Ljungman, P., Lonnqvist, B., Gahrton, G., Ringden, O., Sundqvist, V.A., et Wahren, B. (1986). Clinical and subclinical reactivations of varicella-zoster virus in immunocompromised patients. *J Infect Dis* 153, 840-847.

Locksley, R.M., Flournoy, N., Sullivan, K.M., et Meyers, J.D. (1985). Infection with varicella-zoster virus after marrow transplantation. *J Infect Dis* 152, 1172-1181.

Lolekha, S., Tanthiphabha, W., Sornchai, P., Kosuwan, P., Sutra, S., Warachit, B., Chup-Upprakarn, S., Hutagalung, Y., Weil, J., et Bock, H.L. (2001). Effect of climatic factors and population density on varicella zoster virus epidemiology within a tropical country. *Am J Trop Med Hyg* 64, 131-136.

Longfield, J.N., Winn, R.E., Gibson, R.L., Juchau, S.V., et Hoffman, P.V. (1990). Varicella outbreaks in Army recruits from Puerto Rico. Varicella susceptibility in a population from the tropics. *Arch Intern Med* 150, 970-973.

Loparev, V.N., Rubtcova, E.N., Bostik, V., Tzaneva, V., Sauerbrei, A., Robo, A., Sattler-Dornbacher, E., Hanovcova, I., Stepanova, V., Splino, M., *et al.* (2009). Distribution of varicella-zoster virus (VZV) wild-type genotypes in northern and southern Europe: evidence for high conservation of circulating genotypes. *Virology* 383, 216-225.

Lopez, A.S., Guris, D., Zimmerman, L., Gladden, L., Moore, T., Haselow, D.T., Loparev, V.N., Schmid, D.S., Jumaan, A.O., et Snow, S.L. (2006). One dose of varicella vaccine does not prevent school outbreaks: is it time for a second dose? *Pediatrics* 117, e1070-1077.

Lungu, O., Annunziato, P.W., Gershon, A., Staugaitis, S.M., Josefson, D., LaRussa, P., et Silverstein, S.J. (1995). Reactivated and latent varicella-zoster virus in human dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10980-10984.

Malavige, G.N., Jones, L., Kamaladasa, S.D., Wijewickrama, A., Seneviratne, S.L., Black, A.P., et Ogg, G.S. (2008). Viral load, clinical disease severity and cellular immune responses in primary varicella zoster virus infection in Sri Lanka. *PLoS One* 3, e3789.

Maretic, Z., et Cooray, M.P. (1963). Comparisons between Chickenpox in a Tropical and a European Country. *J Trop Med Hyg* 66, 311-315.

Marin, M., Guris, D., Chaves, S.S., Schmid, S., et Seward, J.F. (2007). Prevention of varicella: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 56, 1-40.

Marin, M., Meissner, H.C., et Seward, J.F. (2008). Varicella prevention in the United States: a review of successes and challenges. *Pediatrics* 122, e744-751.

McCrary, M.L., Severson, J., et Tyring, S.K. (1999). Varicella zoster virus. *J Am Acad Dermatol* 41, 1-14; quiz 15-16.

Mettenleiter, T.C. (2004). Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* 106, 167-180.

Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R., et Hovanessian, A.G. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62, 379-390.

Meyer, P.A., Seward, J.F., Jumaan, A.O., et Wharton, M. (2000). Varicella mortality: trends before vaccine licensure in the United States, 1970-1994. *J Infect Dis* 182, 383-390.

Michalik, D.E., Steinberg, S.P., Larussa, P.S., Edwards, K.M., Wright, P.F., Arvin, A.M., Gans, H.A., et Gershon, A.A. (2008). Primary vaccine failure after 1 dose of varicella vaccine in healthy children. *J Infect Dis* 197, 944-949.

Miller, C.H., Maher, S.G., et Young, H.A. (2009). Clinical Use of Interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sci* 1182, 69-79.

Moffat, J.F., Stein, M.D., Kaneshima, H., et Arvin, A.M. (1995). Tropism of varicella-zoster virus for human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and epidermal cells in SCID-hu mice. *J Virol* 69, 5236-5242.

Nikkels, A.F., Sadzot-Delvaux, C., et Pierard, G.E. (2004). Absence of intercellular adhesion molecule 1 expression in varicella zoster virus-infected keratinocytes during herpes zoster: another immune evasion strategy? *Am J Dermatopathol* 26, 27-32.

Oxman, M.N. (1995). Immunization to reduce the frequency and severity of herpes zoster and its complications. *Neurology* 45, S41-46.

Oxman, M.N., Levin, M.J., Johnson, G.R., Schmader, K.E., Straus, S.E., Gelb, L.D., Arbeit, R.D., Simberkoff, M.S., Gershon, A.A., Davis, L.E., *et al.* (2005). A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med* 352, 2271-2284.

Palmer, E., et Partin, B.G. (1982). Electron micrograph of a Varicella (Chickenpox) Virus.

Paryani, S.G., et Arvin, A.M. (1986). Intrauterine infection with varicella-zoster virus after maternal varicella. *N Engl J Med* 314, 1542-1546.

Pastuszak, A.L., Levy, M., Schick, B., Zuber, C., Feldkamp, M., Gladstone, J., Bar-Levy, F., Jackson, E., Donnenfeld, A., Meschino, W., *et al.* (1994). Outcome after maternal varicella infection in the first 20 weeks of pregnancy. *N Engl J Med* 330, 901-905.

Patel, M.S., Gebremariam, A., et Davis, M.M. (2008). Herpes zoster-related hospitalizations and expenditures before and after introduction of the varicella vaccine in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29, 1157-1163.

Patterson, J.B., Thomis, D.C., Hans, S.L., et Samuel, C.E. (1995). Mechanism of interferon action: double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells is inducible by alpha and gamma interferons. *Virology* 210, 508-511.

Perez-Farinos, N., Ordobas, M., Garcia-Fernandez, C., Garcia-Comas, L., Canellas, S., Rodero, I., Gutierrez-Rodriguez, A., Garcia-Gutierrez, J., et Ramirez, R. (2007). Varicella and herpes zoster in Madrid, based on the Sentinel General Practitioner Network: 1997-2004. *BMC Infect Dis* 7, 59.

Peters, G.A., Tyler, S.D., Grose, C., Severini, A., Gray, M.J., Upton, C., et Tipples, G.A. (2006). A full-genome phylogenetic analysis of varicella-zoster virus reveals a novel origin of replication-based genotyping scheme and evidence of recombination between major circulating clades. *J Virol* 80, 9850-9860.

Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W., et Geuze, H.J. (1991). Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 173, 1099-1109.

Protocole d'immunisation du Québec. Direction des communications du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec, 2010. Disponible sur www.msss.gouv.qc.ca/immunisation/piq.

Preblud, S.R. (1981). Age-specific risks of varicella complications. *Pediatrics* 68, 14-17.

Preblud, S.R. (1986). Varicella: complications and costs. *Pediatrics* 78, 728-735.

Prussin, C., et Metcalfe, D.D. (1995). Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 188, 117-128.

Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., Klingemann, H.G., Beatty, P., Hows, J., et Thomas, E.D. (1995). 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 15, 825-828.

Quinlivan, M., Hawrami, K., Barrett-Muir, W., Aaby, P., Arvin, A., Chow, V.T., John, T.J., Matondo, P., Peiris, M., Poulsen, A., et al. (2002). The molecular epidemiology of varicella-zoster virus: evidence for geographic segregation. *J Infect Dis* 186, 888-894.

Rake, G., Blank, H., Coriell, L.L., Nagler, F.P., et Scott, T.F. (1948). The Relationship of Varicella and Herpes Zoster: Electron Microscope Studies. *J Bacteriol* 56, 293-303.

Reynolds, M.A., Watson, B.M., Plott-Adams, K.K., Jumaan, A.O., Galil, K., Maupin, T.J., Zhang, J.X., et Seward, J.F. (2008). Epidemiology of varicella hospitalizations in the United States, 1995-2005. *J Infect Dis* 197 *Suppl* 2, S120-126.

Rimland, D., et Moanna, A. Increasing Incidence of Herpes Zoster among Veterans. *Clin Infect Dis* 50, 1000-1005.

Rubinstein, P. (2006). Why cord blood? *Hum Immunol* 67, 398-404.

Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., Kurtzberg, J., Adamson, J., Migliaccio, A.R., Berkowitz, R.L., Cabbad, M., Dobrila, N.L., Taylor, P.E., et al. (1998). Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 339, 1565-1577.

Russell, M.L., Schopflocher, D.P., Svenson, L., et Virani, S.N. (2007). Secular trends in the epidemiology of shingles in Alberta. *Epidemiol Infect* 135, 908-913.

Sadaoka, K., Okamoto, S., Gomi, Y., Tanimoto, T., Ishikawa, T., Yoshikawa, T., Asano, Y., Yamanishi, K., et Mori, Y. (2008). Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay. *J Infect Dis* 198, 1327-1333.

Sauerbrei, A., Prager, J., Hengst, U., Zintl, F., et Wutzler, P. (1997). Varicella vaccination in children after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 20, 381-383.

Sawyer, M.H., Chamberlin, C.J., Wu, Y.N., Aintablian, N., et Wallace, M.R. (1994). Detection of varicella-zoster virus DNA in air samples from hospital rooms. *J Infect Dis* 169, 91-94.

Sawyer, M.H., Wu, Y.N., Chamberlin, C.J., Burgos, C., Brodine, S.K., Bowler, W.A., LaRocco, A., Oldfield, E.C., 3rd, et Wallace, M.R. (1992). Detection of

varicella-zoster virus DNA in the oropharynx and blood of patients with varicella. *J Infect Dis* 166, 885-888.

Schreiber, R., Wolpin, J., et Koren, G. (2008). Determinants of aciclovir-induced nephrotoxicity in children. *Paediatr Drugs* 10, 135-139.

Schuchter, L.M., Wingard, J.R., Piantadosi, S., Burns, W.H., Santos, G.W., et Saral, R. (1989). Herpes zoster infection after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 74, 1424-1427.

Sergeev, N., Rubtcova, E., Chizikov, V., Schmid, D.S., et Loparev, V.N. (2006). New mosaic subgenotype of varicella-zoster virus in the USA: VZV detection and genotyping by oligonucleotide-microarray. *J Virol Methods* 136, 8-16.

Seward, J.F., Watson, B.M., Peterson, C.L., Mascola, L., Pelosi, J.W., Zhang, J.X., Maupin, T.J., Goldman, G.S., Tabony, L.J., Brodovicz, K.G., et al. (2002). Varicella disease after introduction of varicella vaccine in the United States, 1995-2000. *JAMA* 287, 606-611.

Shinjoh, M., et Takahashi, T. (2009). Varicella zoster exposure on paediatric wards between 2000 and 2007: safe and effective post-exposure prophylaxis with oral aciclovir. *J Hosp Infect* 72, 163-168.

Smith, C.K., et Arvin, A.M. (2009). Varicella in the fetus and newborn. *Semin Fetal Neonatal Med* 14, 209-217.

Smith, J.G., Joseph, H.R., Green, T., Field, J.A., Wooters, M., Kaufhold, R.M., Antonello, J., et Caulfield, M.J. (2007). Establishing acceptance criteria for cell-mediated-immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions. *Clin Vaccine Immunol* 14, 527-537.

Smith, J.G., Liu, X., Kaufhold, R.M., Clair, J., et Caulfield, M.J. (2001). Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 871-879.

Soong, W., Schultz, J.C., Patera, A.C., Sommer, M.H., et Cohen, J.I. (2000). Infection of human T lymphocytes with varicella-zoster virus: an analysis with viral mutants and clinical isolates. *J Virol* 74, 1864-1870.

Steer, C.B., Szer, J., Sasadeusz, J., Matthews, J.P., Beresford, J.A., et Grigg, A. (2000). Varicella-zoster infection after allogeneic bone marrow transplantation: incidence, risk factors and prevention with low-dose aciclovir and ganciclovir. *Bone Marrow Transplant* 25, 657-664.

Suzuki, K., Yoshikawa, T., Ihira, M., Ohashi, M., Suga, S., et Asano, Y. (2003). Spread of varicella-zoster virus DNA to the environment from varicella patients who were treated with oral acyclovir. *Pediatr Int* 45, 458-460.

Takahashi, M., Otsuka, T., Okuno, Y., Asano, Y., et Yazaki, T. (1974). Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet* *2*, 1288-1290.

Terada, K., Kawano, S., Yoshihiro, K., et Morita, T. (1994). Varicella-zoster virus (VZV) reactivation is related to the low response of VZV-specific immunity after chickenpox in infancy. *J Infect Dis* *169*, 650-652.

Thomas, S.L., Wheeler, J.G., et Hall, A.J. (2002). Contacts with varicella or with children and protection against herpes zoster in adults: a case-control study. *Lancet* *360*, 678-682.

Thomson, B.G., Robertson, K.A., Gowan, D., Heilman, D., Broxmeyer, H.E., Emanuel, D., Kotylo, P., Brahmi, Z., et Smith, F.O. (2000). Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* *96*, 2703-2711.

Tomblyn, M., Chiller, T., Einsele, H., Gress, R., Sepkowitz, K., Storek, J., Wingard, J.R., Young, J.A., et Boeckh, M.A. (2009). Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* *15*, 1143-1238.

Tyler, S.D., Peters, G.A., Grose, C., Severini, A., Gray, M.J., Upton, C., et Tipples, G.A. (2007). Genomic cartography of varicella-zoster virus: a complete genome-based analysis of strain variability with implications for attenuation and phenotypic differences. *Virology* *359*, 447-458.

Tyrrell, G.J., Lovgren, M., Kress, B., et Grimsrud, K. (2005). Varicella-associated invasive group A streptococcal disease in Alberta, Canada--2000-2002. *Clin Infect Dis* *40*, 1055-1057.

Vandenbosch, K., Ovetchkine, P., Champagne, M.A., Haddad, E., Alexandrov, L., et Duval, M. (2008). Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* *14*, 867-871.

Vestal, D.J., Gorbacheva, V.Y., et Sen, G.C. (2000). Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions? *J Interferon Cytokine Res* *20*, 991-1000.

Von Bókay, J. (1909). Über den etiologischen Zusammenhang der Varizellen mit gewissen Fällen von Herpes Zoster. *Wien Klin Wochenschr* *22*, 1323-1326.

Wagner, J.E., Barker, J.N., DeFor, T.E., Baker, K.S., Blazar, B.R., Eide, C., Goldman, A., Kersey, J., Krivit, W., MacMillan, M.L., et al. (2002). Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* *100*, 1611-1618.

- Wagner, J.E., Kernan, N.A., Steinbuch, M., Broxmeyer, H.E., et Gluckman, E. (1995). Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* *346*, 214-219.
- Watson, B. (2008). Humoral and cell-mediated immune responses in children and adults after 1 and 2 doses of varicella vaccine. *J Infect Dis* *197 Suppl 2*, S143-146.
- Weaver, B.A. (2009). Herpes zoster overview: natural history and incidence. *J Am Osteopath Assoc* *109*, S2-6.
- Webster, A., Grint, P., Brenner, M.K., Prentice, H.G., et Griffiths, P.D. (1989). Titration of IgG antibodies against varicella zoster virus before bone marrow transplantation is not predictive of future zoster. *J Med Virol* *27*, 117-119.
- Webster, A.D., Spickett, G.P., Thomson, B.J., et Farrant, J. (1988). Viruses and antibody deficiency syndromes. *Immunol Invest* *17*, 93-105.
- Weller, T.H. (1983). Varicella and herpes zoster. Changing concepts of the natural history, control, and importance of a not-so-benign virus. *N Engl J Med* *309*, 1434-1440.
- Weller, T.H. (1992). Varicella and herpes zoster: a perspective and overview. *J Infect Dis* *166 Suppl 1*, S1-6.
- Weller, T.H., et Stoddard, M.B. (1952). Intranuclear inclusion bodies in cultures of human tissue inoculated with varicella vesicle fluid. *J Immunol* *68*, 311-319.
- Weller, T.H., et Witton, H.M. (1958). The etiologic agents of varicella and herpes zoster; serologic studies with the viruses as propagated in vitro. *J Exp Med* *108*, 869-890.
- Wharton, M. (1996). The epidemiology of varicella-zoster virus infections. *Infect Dis Clin North Am* *10*, 571-581.
- Wilson, A., Sharp, M., Koropchak, C.M., Ting, S.F., et Arvin, A.M. (1992). Subclinical varicella-zoster virus viremia, herpes zoster, and T lymphocyte immunity to varicella-zoster viral antigens after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* *165*, 119-126.
- Wilson, G.J., Talkington, D.F., Gruber, W., Edwards, K., et Dermody, T.S. (1995). Group A streptococcal necrotizing fasciitis following varicella in children: case reports and review. *Clin Infect Dis* *20*, 1333-1338.
- Wong, A.H., Tam, N.W., Yang, Y.L., Cuddihy, A.R., Li, S., Kirchhoff, S., Hauser, H., Decker, T., et Koromilas, A.E. (1997). Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. *EMBO J* *16*, 1291-1304.

Zhang, Y., Cosyns, M., Levin, M.J., et Hayward, A.R. (1994). Cytokine production in varicella zoster virus-stimulated limiting dilution lymphocyte cultures. *Clin Exp Immunol* 98, 128-133.

