

Les nouveaux virus Herpès : outils diagnostiques virologiques

Henri Agut

Hôpital de la Salpêtrière, Paris.

Le terme de « nouveaux » herpèsvirus recouvre actuellement trois virus humains : les HHV6, HHV7 et HHV8 (ou KSHV), découverts respectivement en 1986, 1990 et 1994.^[1] Les deux premiers sont des β -herpèsvirus qui furent découverts à partir des cultures de cellules tandis que le HHV8 est un γ -herpèsvirus qui a été découvert grâce à l'amplification génique. L'expérience acquise dans le domaine du HHV-6 servira de guide principal dans l'exposé qui suit.

Généralités

Les herpèsvirus ont des interactions extrêmement complexes avec les cellules hôtes. Il s'agit de virus enveloppés, fragiles. Des protéines présentes à l'intérieur du tégument, entre capsid et enveloppe, sont immédiatement injectées dans les cellules au cours de l'infection, et elles modulent le fonctionnement cellulaire avant même qu'il y ait transcription ou réplication du génome viral.

Trois étapes de transcription d'ARNm respectivement très précoces, précoces et tardifs aboutissent à la production de particules virales et à la formation d'ADN ainsi que d'une somme considérable de protéines qui sont autant de marqueurs diagnostiques. Les herpèsvirus ont aussi la possibilité de se mettre en latence à l'intérieur de la cellule, le génome reste présent sous forme d'épisome avec une répression initiale et persistante des mécanismes de transcription. Les stratégies sont variables selon les différents herpèsvirus mais il y a le plus souvent une commutation permanente entre l'état de latence et l'état de réactivation. Sur le plan diagnostique, il reste donc très difficile d'établir une frontière précise entre ces deux états.

Méthodes diagnostiques

Le diagnostic peut faire appel à des méthodes directes (isolement sur cultures cellulaires, détection par les anticorps monoclonaux ou des sérums polyclonaux, hybridation *in situ*, PCR et autres méthodes d'amplification génique) et à des méthodes indirectes (sérologie...). Les méthodes d'amplification constituent la pierre angulaire actuelle du diagnostic^[2,3] tandis que le sérodiagnostic a des indications extrêmement limitées chez les patients transplantés et/ou immunodéprimés car il ne permet pas de suivre l'évolution de l'infection et les techniques disponibles ne sont pas encore suffisamment sensibles et surtout spécifiques pour les derniers virus identifiés.

La culture de HHV6 est très difficile en laboratoire sur des cellules mononucléées. Les difficultés sont encore plus grandes avec le HHV7 et la technique n'est actuellement pas utilisable avec le HHV8. L'isolement du HHV6 sur des lignées lymphocytaires n'est pas possible même si l'adaptation à ces lignées est obtenue pour certaines souches après isolement. La cytométrie de flux utilisant un anticorps monoclonal spécifique permet d'étudier le degré de réplication du virus et de réaliser un antivirogramme.^[4] La PCR permet en théorie d'obtenir 1 million de copies d'un seul fragment d'ADN après 20 cycles et elle est plus facile à mettre en œuvre qu'une culture. Ainsi, on peut détecter le génome viral et évaluer sa capacité de réplication, et aussi d'étudier les synthèses d'ARN messagers. En revanche, cette technique ne permet pas d'isoler la souche virale. En outre, la présence de très nombreux inhibiteurs potentiels ou l'existence d'un variant peuvent entraîner des faux négatifs. Enfin, les contaminations accidentelles par l'ADN amplifié peuvent avoir des conséquences désastreuses en induisant des résultats faussement positifs et les nouveaux herpèsvirus ont été ainsi associés à tort à certaines pathologies (sarcoïdose, myélome...). Les études virologiques doivent donc, si possible, être corrélées à des études cliniques ou épidémiologiques.

La PCR en temps réel permet de mesurer en permanence la quantité de produits amplifiés au fur et à mesure du déroulement de l'amplification et non plus à la fin de l'opération. Cette technique présente l'avantage indiscutable d'une approche à la fois qualitative et quantitative, réalisée sur un tube fermé (ce qui diminue considérablement le risque de contamination).

Variants et sensibilité aux antiviraux

Le HHV6 a deux variants : A et B; certains anticorps monoclonaux peuvent être spécifiques de l'un des variants. Le premier (A) a, *in vitro*, un tropisme cellulaire plus large et peut être adapté plus facilement à

certaines cultures cellulaires. Depuis 1994, nous pouvons effectuer une PCR spécifique pour chaque variant^[5] dont le pouvoir pathogène reste un sujet de débat, comme dans le cas, par exemple, de l'exanthème subit. Quasiment tous les adultes sont infectés par les deux variants du HHV6 mais le variant B est celui détecté préférentiellement dans le sang périphérique, ce qui conduit peut-être à tort à le rendre responsable de la majorité des syndromes cliniques observés.

La sensibilité et la résistance aux antiviraux ne sont pas encore des questions critiques pour les derniers herpesvirus découverts mais il faut néanmoins envisager ce problème dès maintenant. Les tests phénotypiques permettent de déterminer la CI_{50} et la PCR en temps réel permet actuellement les tests les plus rapides et précis.

Le HHV 6 est habituellement sensible aux trois antiviraux utilisés contre le CMV (ganciclovir, cidofovir et foscarnet). Dans un travail expérimental sur une souche résistante au ganciclovir et au cidofovir, nous avons pu montrer que les mécanismes de résistance du HHV6 et du CMV (mutations de l'enzyme phosphorylant le ganciclovir) sont très proches.^[6] En clinique humaine, la recherche des mutations de résistance commence à se développer dans le cadre des herpesvirus. Parmi 30 patients VIH+ exposés à un traitement par le ganciclovir, nous avons retrouvé 5 patients ayant une virémie positive au HHV6. Dans un cas, nous avons retrouvé la mutation M318V spécifique de la résistance au ganciclovir. Ce patient VIH+ avait une rétinite à CMV ne répondant pas à un traitement prolongé par le ganciclovir. La souche virale n'a pas pu être isolée.

Stratégie diagnostique

Les états d'infection aiguë par herpesvirus sont en équilibre dynamique avec des états d'infection latente. En cas d'infection latente, une sérologie suffit pour le diagnostic ; en revanche, en cas d'infection aiguë, la PCR en temps réel est devenue la méthode de choix pour montrer la réplication active du virus.^[7,8] Des techniques d'examen *in situ*^[9] pourraient être développées pour les différents organes.

Toutefois, de nombreuses questions restent encore en suspens concernant les méthodes diagnostiques : le développement de nouveaux marqueurs immunologiques, l'intégration de techniques coûteuses dans la pratique quotidienne, la relation entre détection du génome et infectiosité, la pertinence de la charge virale pour le suivi de l'infection et l'interprétation de ses modifications, la reconnaissance des populations virales minoritaires.

Références

1. Agut H, Dupin N, Aubin JT, et al. Novel human herpesviruses (human herpesviruses 6, 7 and 8). *Clin Microbiol Infect* 1996; 2: 159-67
2. Boutolleau D, Fernandez C, Andre E, et al. Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients. *J Infect Dis* 2003; 187: 179-86
3. Gautheret-Dejean A, Aubin JT, Poirel L, et al. Detection of human Betaherpesvirinae in saliva and urine from immunocompromised and immunocompetent subjects. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1600-3
4. Manichanh C, Grenot P, Gautheret-Dejean A, et al. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral compounds by flow cytometry analysis. *Cytometry* 2000; 40: 135-40
5. Aubin JT, Poirel L, Robert C, et al. Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by amplicon hybridization with variant-specific oligonucleotides and amplification with variant-specific primers. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2434-40
6. Manichanh C, Olivier-Aubron C, Lagarde JP, et al. Selection of the same mutation in the U69 protein kinase gene of human herpesvirus-6 after prolonged exposure to ganciclovir in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 2001; 82: 2767-76
7. Fernandez C, Boutolleau D, Manichanh C, et al. Quantitation of HHV-7 genome by real-time polymerase chain reaction assay using MGB probe technology. *J Virol Methods* 2002; 106: 11-6
8. Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods* 2002; 100: 27-35
9. Fillet AM, Reux I, Joberty C, et al. Detection of human herpes virus 6 in AIDS-associated retinitis by means of in situ hybridization, polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Med Virol* 1996; 49: 289-95