

# Mesure et interprétation des charges virales dans les infections à herpèsvirus humains (cytomégalovirus, virus Epstein-Barr, herpèsvirus humains 6 et 8)

Marie-Christine Mazon<sup>a,b</sup>, Corinne Amiel<sup>c,d</sup>, Henri Agut<sup>d,e</sup>

## RÉSUMÉ

La mesure de la charge virale est un progrès important pour la compréhension physiopathologique, le diagnostic et le suivi thérapeutique des infections par le cytomégalovirus, le virus d'Epstein-Barr, les herpèsvirus humains 6 et 8. Les méthodes de PCR quantitative, en particulier la PCR en temps réel, ont rendu la mesure de l'ADN génomique sensible, reproductible, accessible et applicable à un grand nombre de matrices biologiques, au premier rang desquelles le sang total, le plasma et le liquide cébrospinal. Des améliorations sont cependant encore nécessaires en termes de standardisation des techniques et mise à disposition d'étalons de quantification internationalement reconnus. Il faut également préciser et homogénéiser les critères d'interprétation de la charge virale en ce qui concerne le diagnostic des infections actives, la prédiction de survenue des maladies associées, les indications des traitements antiviraux et le suivi de leur efficacité. La mesure de la charge virale à cytomégalovirus est actuellement devenue un élément essentiel de la surveillance des sujets immunodéprimés. En ce qui concerne le virus d'Epstein-Barr, la charge virale est utilisée pour anticiper la survenue des lymphoproliférations associées alors que la charge virale à HHV-8 n'a pas encore d'indications parfaitement précisées dans le diagnostic des maladies tumorales associées, au premier rang desquelles la maladie de Kaposi. Des valeurs très élevées de la charge virale à herpèsvirus humain 6 doivent faire évoquer, outre une réactivation virale intense, une intégration chromosomique de l'ADN viral, évènement propre à ce virus et observé chez environ 1 % de la population générale.

**ADN génomique - liquide cébrospinal - PCR temps réel - sang total - standardisation**

### **a** Service de Virologie

Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,  
Hôpital Saint-Louis,

### **b** PRES Sorbonne Paris Cité

Université Paris Diderot, Inserm U941,  
Laboratoire associé au Centre national de référence Cytomégalovirus

### **c** Service de Virologie

Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,  
Hôpitaux Universitaires Est Parisien,  
site Tenon

### **d** Sorbonne Universités

Université Pierre et Marie Curie Paris 6,  
CIMI-Paris, Inserm UMR 1135, Equipe 1 PVI

### **e** Service de Virologie

Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,  
Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière-Charles Foix,  
Paris, France

\* correspondance

henri.agut@aphp.fr

## SUMMARY

### Determination and interpretation of viral load in human herpesvirus infections (cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human herpesviruses 6 and 8).

Measuring the viral load has provided a significant advance in the pathophysiological understanding, diagnosis and therapeutic monitoring of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 8 infections. The methods of quantitative PCR, especially real-time PCR, have made the quantification of DNA genome sensitive, reproducible, accessible and applicable to numerous biological matrices, among which whole blood, plasma and cerebrospinal fluid. However improvements are still required, in terms of standardization of techniques and disposal of internationally recognized quantification standards. It is also needed to clarify and homogenize the criteria for interpreting viral load values regarding the diagnosis of active infections, prediction of occurrence of associated diseases, indications of antiviral treatments and monitoring of their effectiveness. The measurement of viral load cytomegalovirus has now become an essential element in the monitoring of immunocompromised patients. Regarding Epstein-Barr virus, the viral load is used to anticipate the occurrence of associated lymphoproliferations while the viral load HHV-8 has still not perfectly specified indications in the diagnosis of associated malignancies, the first of which being Kaposi's sarcoma. Besides the possibility of an intense viral reactivation, very high values of viral load in the case of human herpesvirus 6 should evoke a chromosomal integration of viral DNA, specific to this virus and observed in about 1 % of the general population.

**genomic DNA - cerebrospinal fluid - real time PCR - whole blood - standardization**

## 1. Introduction

La quantité de virus présent dans un tissu ou un fluide biologique, appelée charge virale, est devenue un paramètre biologique essentiel pour le diagnostic, le pronostic et le suivi thérapeutique des infections virales humaines. L'exemple le plus illustratif est actuellement l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au cours de laquelle la mesure itérative de la charge virale plasmatique est l'examen virologique incontournable tant au moment de la primo-infection que dans le suivi des traitements antirétroviraux au long cours.

article reçu le 7 juin 2016, accepté le 30 septembre 2016.

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Dans le domaine des infections à herpèsvirus, l'intérêt pour la quantification virale est devenu majeur quand les méthodes moléculaires ciblant les acides nucléiques et fondées sur la PCR, spécifiques, rapides et relativement précises, ont remplacé les méthodes ciblant les particules virales infectieuses et fondées sur la culture virale, des méthodes certes de référence et pionnières en virologie mais lourdes, coûteuses, et d'efficacité incertaine. Cet intérêt était aussi concomitant avec l'utilisation élargie de la chimiothérapie antiherpétique. De fait, les infections à herpèsvirus étaient depuis longtemps en théorie une cible de choix pour la mise en œuvre de la quantification virale. En effet, ces infections persistent durant toute la vie de l'individu à bas bruit, concernent la majorité de la population générale et sont le plus souvent asymptomatiques sauf lorsqu'elles se réactivent, en particulier lors d'une immunodépression, et peuvent alors donner des maladies gravissimes. Dans ce contexte, le diagnostic virologique seulement qualitatif n'apporte qu'une contribution modeste à la prise en charge médicale des maladies associées et à l'évaluation de l'efficacité des traitements. L'avènement de la PCR en temps réel a bouleversé la quantification virale. Les infections de la peau, des muqueuses et du système nerveux central par les alphaherpèsvirus, virus herpes simplex (HSV) et virus varicelle-zona (VZV), ont relativement peu profité de son développement. En revanche, dans les infections systémiques par les bêtaherpèsvirus, cytomégalovirus (CMV) et herpèsvirus humain 6 (HHV-6), la quantification de l'ADN génomique viral dans le sang circulant est maintenant un élément essentiel d'analyse, de surveillance, de diagnostic et de décision thérapeutique, en particulier chez les sujets immunodéprimés. Il en est de même dans le cas des gammaherpèsvirus, virus d'Epstein-Barr (EBV) et herpèsvirus humain 8 (HHV-8) encore appelé herpèsvirus associé à la maladie de Kaposi (KSHV), pour lesquels l'ADNémie virale circulante est prédictive de la survenue de maladies cancéreuses associées à ces deux virus. On note que l'ADNémie, dans le cas de l'EBV et du HHV-8, correspond soit à la production de particules virales soit à la prolifération de cellules transformées porteuses du génome viral. Cette ambiguïté rappelle que, si la charge virale est mesurée grâce à des techniques de biologie moléculaire largement appliquées, elle doit être interprétée spécifiquement en fonction de l'herpèsvirus considéré, de la connaissance de sa physiopathologie, et des options thérapeutiques disponibles.

## 2. Méthodologie générale de mesure de la charge virale

Les cibles virales utilisables pour la quantification des virus sont celles utilisées pour leur détection qualitative. Ainsi, les particules virales ou virions sont détectables par leur morphologie lors de l'observation en microscopie électronique ou par leur pouvoir infectieux lors de l'inoculation en culture de cellules. Les protéines virales sont détectables par leurs propriétés antigéniques grâce à des anticorps monoclonaux. L'ADN bicaaténaire génomique des herpèsvirus, qui se trouve soit dans les particules virales, soit dans les noyaux des cellules infectées, est détectable grâce à l'hybridation moléculaire. C'est désormais la quantification de cet ADN qui est, de fait, la principale approche utilisée. La quantification des ARN messagers ou transcrits reste un objectif pertinent pour le diagnostic formel

d'une réactivation virale survenant à partir de l'état de latence mais nécessite encore des développements techniques pour gagner en spécificité et en sensibilité.

L'extraction des acides nucléiques est effectuée à partir d'un grand nombre de matrices biologiques différentes : sang total, fraction leucocytaire, plasma, liquide cébrospinal (LCS), urine, salive, lavage broncho-alvéolaire (LBA), biopsie tissulaire. La première étape est la lyse des particules virales et des cellules infectées par une combinaison d'agents chaotropiques, de détergents et d'enzymes protéolytiques. L'étape de purification des acides nucléiques met ensuite en jeu diverses combinaisons de réactions de précipitation sélective, de centrifugation et de séparation par affinité. Les techniques d'extraction ont considérablement évolué dans le sens d'une automatisation et d'une élimination plus efficace des inhibiteurs potentiels de la PCR, tels que l'hémoglobine. Cependant, c'est toujours un mélange d'acides nucléiques viraux et cellulaires qui est soumis à la réaction de quantification.

La quantification de l'ADN viral utilise le plus souvent la technique de PCR en temps réel. La spécificité de la réaction repose sur l'utilisation d'amorces strictement complémentaires de l'ADN du virus cible. La quantité de produits amplifiés est estimée, à tout moment de la réaction et sans ouvrir le tube réactionnel, par mesure de la fluorescence produite par une sonde spécifique. Le résultat concernant la charge virale de l'échantillon de départ est exprimé en nombre de copies du génome viral par référence à une gamme étalon externe. Plusieurs éléments annexes renforcent la robustesse de la méthode comme l'absence d'ouverture du récipient réactionnel après amplification, ce qui réduit le risque de contamination du laboratoire par de l'ADN amplifié et donc de faux positifs, l'inclusion de témoins internes de qualité d'extraction et d'absence d'inhibiteurs de PCR, et la mesure éventuelle du nombre de copies d'un gène cellulaire dans l'échantillon grâce à une PCR dédiée, ce qui permet l'expression finale de la charge virale en copies de génome par million de cellules. Des progrès restent à faire en termes de standardisation. Il est utile d'avoir recours à des trousseaux diagnostiques calibrés et validés, donnant des résultats reproductibles ainsi qu'à des étalons internationaux titrés qui facilitent les comparaisons entre laboratoires utilisant des techniques de quantification différentes. C'est pourquoi l'OMS a mis sur le marché des étalons de quantification permettant l'expression des résultats en unités internationales (UI), mais ceux-ci ne sont pas encore disponibles pour tous les herpèsvirus. Malgré ces progrès, la précision et la reproductibilité de la mesure de la charge virale, fondée sur l'amplification exponentielle de fragments d'ADN, ne sont pas absolues. Il importe, dans chaque cas, de définir la plus petite variation de charge qui, au-delà de la variabilité attendue de la méthode, indique un changement réel et significatif du niveau d'infection et/ou de multiplication du virus. Cela est particulièrement important quand on veut apprécier la dynamique d'évolution de la charge virale dans le cadre d'un suivi longitudinal de ce marqueur.

## 3. CMV

Le CMV est un bêtaherpès virus à tropisme cellulaire très large chez son hôte infecté. Il se réplique dans les cellules endothéliales, épithéliales, dendritiques, macrophages,

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/7645816>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/7645816>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)