

Vincent Maréchal¹, Henri Agut^{1,2}, Henri Gruffat³

¹ Team Persistent Viral Infections
Centre d'Immunologie et de Maladies Infectieuses (CIMI-Paris)
Université Pierre et Marie Curie (UPMC)
Inserm U1135
83 boulevard de l'hôpital
75651 Paris Cedex 13

² Service de Virologie
Hôpitaux Universitaires La Pitié-Salpêtrière - Charles Foix
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière
83 boulevard de l'hôpital
75651 Paris Cedex 13

³ Centre International de Recherche en Infectiologie -CIRI-
U1111 INSERM; UMR5308 CNRS; ENS-L; UCB-Lyon
46 allée d'Italie; 69364 Lyon

Auteur correspondant : vincent.marechal@upmc.fr

RETOUR DE CONGRES

3^{ème} Journée Herpèsvirus et pathologies associées (HerPAs), 5 mars 2014

L'Association HerPAs (Herpesvirus et Pathologies Associées) a tenu son troisième colloque à l'Institut Pasteur (Paris) le 5 mars 2014.

Adossée aux Journées Francophones de Virologie, cette journée était placée sous l'égide du Centre d'Immunologie et des Maladies infectieuses (CIMI-Paris ; INSERM, CNRS, Université Pierre et Marie Curie) et de l'Institut Universitaire de Cancérologie (IUC-UPMC). Elle a reçu le soutien de l'Institut Pasteur de Paris et de la société bioMérieux.

Quatre sessions ont permis d'aborder des aspects variés de la biologie des herpèsvirus et de leurs impacts médicaux.

La première session a été consacrée au Virus Epstein-Barr, découvert il y a précisément 50 ans par Epstein, Achong et Barr. Valentin Aubry (Equipe Oncogenic Herpesviruses, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon) s'est intéressé aux gènes tardifs de l'EBV, dont on sait que l'expression est conditionnée à la réplication du génome viral. Il est bien établi que les promoteurs viraux des gènes tardifs contiennent une séquence (TATT) qui se substitue à la séquence TATA canonique reconnue par la protéine cellulaire TBP. Henri Gruffat et ses collaborateurs ont démontré que les séquences TATT sont la cible de la protéine virale BcRF1, qui se substitue fonctionnellement à la protéine TBP pour activer les gènes tardifs. Ils démontrent également que BcRF1 est au cœur d'un complexe de transcription fonctionnel minimal qui comprend 5 autres protéines virales, l'ensemble formant un complexe appelé vPIC (*viral Pre-Initiation Complex*). Cette découverte constitue une avancée majeure dans la compréhension des processus d'expression des gènes tardifs à deux titres : d'une part, elle désigne des protéines virales spécifiques qui constituent une cible de choix pour de nouvelles thérapies antivirales ; d'autre part, elle ouvre la porte à une ré-analyse des processus de transcription chez l'ensemble des gammaherpèsvirus, mais également chez les betaherpèsvirus chez lesquels des protéines orthologues ont pu être identifiées.

Amanda Poissonnier (UMR CRIBL-CNRS 7276, Faculté de Médecine, Université de Limoges) s'est

intéressée aux propriétés pro-apoptotiques de l'isoNH₂CA-4 - un poison du fuseau - dans des lignées dérivées de lymphome de Burkitt infectées ou non par l'EBV, et présentant (BL2) ou non (BL41) des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53*. Si les lignées déficientes en P53 sont résistantes à l'apoptose induite par des poisons du fuseau, l'expression des gènes de latence de l'EBV peut resensibiliser ces cellules à une apoptose induite par l'isoNH₂CA-4. Ce processus requiert les MAP kinases p38 et JNK. Ces données ouvrent des perspectives intéressantes dans l'utilisation chimiothérapeutique de poisons du fuseau dans des cellules naturellement résistantes à ces traitements.

L'équipe de Pierre Busson (UMR 8126 CNRS, IGR, Villejuif) s'intéresse depuis plusieurs années aux exosomes, des nanovésicules pouvant contenir des acides nucléiques (microARN, ARN messagers) et des protéines cellulaires ou virales. Leur libération par les cellules tumorales pourrait influencer directement le microenvironnement tumoral. Les travaux présentés démontrent que l'expression de la protéine LMP-1 modifie non seulement le niveau de production des exosomes, mais également leur contenu. Les exosomes libérés par des cellules exprimant LMP-1 seraient ainsi plus abondants, enrichis en ADN cellulaire, en composants chromatiniens et en ADN viral dans une moindre mesure. Ces observations suggèrent que les exosomes issus des cellules tumorales pourraient être à l'origine d'un transfert horizontal d'ADN entre les cellules et/ou moduler la réponse immunitaire péri-tumorale.

Sylvie Rogez (UMR CNRS 7276, Faculté de Pharmacie ; Laboratoire de Virologie, CHU Dupuytren, Limoges) a présenté les résultats d'une étude corrélative récente visant à analyser la valeur prédictive de différents variants de délétion du gène codant LMP-1 – l'oncogène majeur de l'EBV - chez des patients atteints de lymphomes NK/T. Ces lymphomes extra-ganglionnaires rares mais très agressifs sont associés dans 100% des cas à l'EBV. De nombreux variants du gène LMP-1 ont été décrits dans la littérature et les impacts biologiques de ces variations sont activement étudiés. L'étude présentée a inclus 32 patients et 21 cas témoins. Elle indique que des souches virales présentant une forme délétée de 15 ou 30 pb du gène codant LMP-1 sont fréquemment détectables dans le sang des patients, et qu'elles sont probablement issues des cellules tumorales. L'apparition de souches de profil sauvage sous traitement serait associée à une évolution favorable, ce qui suggère que le typage LMP-1 des souches pourrait constituer un nouveau marqueur de suivi dans les lymphomes NK/T.

La seconde session s'est attachée à des aspects fondamentaux des infections à herpes simplex et à cytomégalovirus.

David Padeloup (Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale, CNRS, Gif-sur-Yvette ; Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, UMR984, Chatenay-Malabry) a étudié les perturbations précoces qui affectent la dynamique microtubulaire au cours de l'infection de cellules par HSV-1 et par le virus de la pseudo-rage. A la différence de l'infection par le virus de la pseudo-rage, HSV-1 induit la disparition du centrosome : de nouveaux microtubules se forment néanmoins à partir de sites non centrosomiaux, ce qui pourrait potentiellement faciliter le processus de sortie du virus en réorientant les capsides vers des sites d'enveloppement secondaires. Camille Cohen (Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire CNRS, UMR5534, Université Claude Bernard, Lyon) s'est appuyée également sur des approches de microscopie – sur fibroblastes *ex vivo* ou sur neurones murins – pour analyser le devenir des génomes viraux lors d'une infection non-productive par HSV-1. Elle démontre que les génomes, peu après leur entrée dans le noyau de la cellule, forment des structures nucléaires associées avec des corps PML (DNA-containing PML-NBs). Ces structures, qui pourraient traduire un mécanisme de défense antivirale, conduisent à une modification de la chromatine virale. Elles résultent d'un assemblage séquentiel de protéines cellulaires autour du génome viral : PML, Sp100, Daxx, ATRX, protéines impliquées dans la réponse antivirale (SUMO-1 et SUMO-2/3) et protéines de remodelage de la chromatine. La chromatinisation du génome pourrait jouer un rôle central dans la régulation de l'expression virale et l'entrée en latence.

Le virus de la maladie de Marek est un alphaherpèsvirus aviaire oncogène. La transmission du virus se fait principalement par le biais de particules virales produites au niveau des follicules plumeux, sites majeurs de production virale. Il n'existe pas de modèle simple pour analyser les processus d'infection *ex vivo*. Mathilde Couteaudier (INRA UMR 1282 ISP, Centre INRA de Tours, Nouzilly) a développé un modèle d'infection reposant sur l'utilisation de kératinocytes dérivant de cellules souches embryonnaires pluripotentes de poule. Les cellules obtenues s'avèrent permissives à l'infection par le virus de Marek, ce qui ouvre la voie à une analyse *ex vivo* de la réplication virale dans un tissu reconstitué proche des follicules plumeux.

L'autophagie, un processus physiologique de renouvellement des composants cellulaires, est modulée dans de nombreuses infections virales où elle pourrait intervenir comme une nouvelle voie de défense antivirale. L'équipe d'Audrey Esclatine (INSERM UMR-S-984, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud) a caractérisé plusieurs protéines virales susceptibles de moduler cette voie chez les *Herpesviridae*. Les travaux présentés démontrent notamment que deux protéines homologues (TRS1 et IRS1) du cytomégalovirus humain (CMV) sont capables de bloquer indépendamment l'autophagie lors du cycle productif. Cette activité, partiellement redondante, résulterait de l'interaction des protéines TRS1 et IRS1 avec beclin-1, une protéine cellulaire impliquée dans les premières phases du processus autophagique. L'identification des protéines modulant l'autophagie chez les herpesvirus reste un objectif prioritaire pour replacer ce processus complexe dans le cadre général des infections à *Herpesviridae*, et plus largement de la réponse immunitaire antivirale dont elle pourrait moduler certains aspects.

Vincent Vieillard (ERL8255, CIMI-Paris, UPMC, INSERM, CNRS, Paris) a rappelé le rôle étonnant, quoiqu'encore mal défini, que pourrait jouer le CMV dans l'expansion clonale des cellules NK. En effet, son équipe et d'autres ont établi qu'une infection aiguë ou une réactivation du CMV peut provoquer l'expansion de cellules NK fonctionnelles spécifiques exprimant le récepteur activateur NKG2C. Ces cellules sont notamment capables de reconnaître spécifiquement des cellules infectées par l'intermédiaire d'une liaison entre le récepteur KIR et certaines molécules du CMH-I. De façon surprenante, l'expansion de ces cellules a été également détectée au cours d'autres infections virales actives (VIH, hantavirus, chikungunya, virus des hépatites B et C), mais uniquement chez des patients séropositifs pour le CMV. Ces données, confortées par les résultats obtenus dans un modèle murin, soutiennent l'hypothèse d'une mémoire immunitaire « NK » dont l'établissement et la régulation restent à définir.

Trois présentations ont été consacrées à des développements méthodologiques récents susceptibles d'améliorer le diagnostic, la prise en charge ou le suivi des patients.

Les receveurs d'allogreffes de cellules souches hématopoïétiques sont exposés à diverses infections virales. Maud Salmona (Laboratoire de microbiologie de l'Hôpital St Louis, Université Paris Diderot, Paris) a évalué une nouvelle technique de PCR couplée à une analyse par spectrométrie de masse (PLEX-ID, Abbott Ibis Biosciences) qui permet la recherche simultanée d'un spectre élargi de virus : HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, adénovirus, entérovirus, polyomavirus BK et JC, et parvovirus B19. Cette approche, mise en place dans le cadre du suivi virologique des patients allogreffés, permet un diagnostic semi-quantitatif et rapide. L'étude présentée a été conduite sur 569 prélèvements séquentiels issus de 99 patients allogreffés. Elle a permis d'identifier une ou plusieurs infections virales chez 59% des patients (principalement associées aux virus Epstein-Barr, HHV-6, -7 et CMV). Près de 21% des patients montraient une réactivation de plusieurs virus. Cette approche complète le panel des techniques innovantes qui autorisent une surveillance élargie des infections virales chez les patients greffés.

Sylvie Pillet (Laboratoire des agents infectieux et hygiène, CHU de Saint Etienne) a proposé un test moléculaire fiable et rapide pour détecter HSV-1 et HSV-2 dans le liquide céphalorachidien, et utilisable pour le diagnostic d'urgence par des personnels non spécialisés. Celui-ci a été mis en place sur la plateforme automatisée BD MAX (Becton Dickinson) qui couple les étapes d'extraction et d'amplification par PCR en temps réel et autorise la mise au point de tests « maison ». La procédure standard inclut un contrôle interne qui valide l'ensemble du processus. Elle fait appel à une cartouche qui contient l'ensemble des réactifs et des consommables d'extraction, ainsi qu'à un mélange réactionnel qui peut-être préparé à l'avance et congelé (stable pendant au moins 13 semaines). Ce protocole a pu être validé sur 16 échantillons de référence et 212 prélèvements cliniques. Il permet une détection sensible des HSV-1 et -2 et s'avère applicable en urgence par du personnel non qualifié en biologie moléculaire.

Les techniques de séquençage à haut débit ont ouvert une nouvelle ère dans l'investigation génétique des virus. Néanmoins, ces méthodes sont mal adaptées au suivi épidémiologique des virus dans le cadre d'une activité hospitalière de routine. Sonia Burrel (Equipe *Persistent Viral Infections (PVI)*, CIMI -Paris) a démontré la faisabilité et l'intérêt d'une technique d'épidémiologie moléculaire reposant sur l'analyse des séquences microsatellites de souches HSV-2. Cette approche serait particulièrement pertinente dans l'analyse des infections nosocomiales, des cas de transmission mère-enfant, pour l'étude des infections récurrentes et des réinfections. Elle a d'ores et déjà permis de caractériser et de

préciser l'épidémiologie d'un nouveau variant du HSV-2 (HSV-2v) isolé par cette équipe.

Ainsi que l'ont démontré plusieurs exposés, la recherche de pathologies associées aux virus HHV-6 reste très active, même si elle est limitée notamment par l'absence de modèles animaux et le peu de données mécanistiques et/ou physiopathologiques. La responsabilité de ces virus dans les atteintes du système nerveux (encéphalites, méningites, sclérose en plaques) a été évoquée mais n'est pas clairement démontrée. Cette question pourrait être abordée dans des modèles animaux susceptibles à l'infection, qui restent à établir. Joséphine Reynaud (Centre international de recherche en infectiologie, INSERM U1111, Lyon ;) a analysé la sensibilité de souris transgéniques exprimant la molécule CD46 (le récepteur du virus HHV-6A) aux virus HHV-6A et 6B. Des cellules gliales issues de ces souris sont sensibles à l'infection par le variant HHV-6A, mais pas par le variant HHV-6B. L'infection chez la souris n'a pas permis de mettre en évidence de pathologie, mais les auteurs rapportent une persistance cérébrale du virus HHV-6A pendant plus de huit mois chez les souris transgéniques, phénomène associé à la présence de lymphocytes B et T infiltrants. La même équipe, dirigée par Branka Horvat, s'est attachée à fournir de nouveaux éléments en faveur d'une association entre réactivation des rétrovirus endogènes humains (HERV) et infections à HHV-6, notamment lors de la sclérose en plaques (SEP). Les auteurs décrivent l'expression d'ARN d'origine endorétroviral dans plusieurs lignées et dans des cellules de sang de cordon exposées au virus HHV-6A. Ces processus, qui pourraient relever de l'activation du récepteur CD46 par HHV-6A, apportent des éléments en faveur d'un rôle de ce virus comme co-facteur de pathologies neurologiques comme la SEP, ou dans d'autres pathologies à forte composante inflammatoire.

Agnès Gautheret-Dejean (Equipe *Persistent Viral Infections (PVI)*, CIMI –Paris ; Université Paris Descartes, UFR de Pharmacie, Paris) s'intéresse aux conséquences physiopathologiques potentielles des formes intégrées du HHV-6, qui sont détectées dans près de 1% de la population humaine. Le projet présenté ouvre la question d'un rôle potentiel de ces formes intégrées chez des patients suivis pour des problèmes d'infertilité. Une étude conduite sur 179 échantillons de sperme a permis de détecter 3 échantillons contenant des charges virales HHV-6 élevées, dont deux pourraient être associées à une intégration chromosomique du virus. Ces travaux préliminaires ouvrent la voie à une analyse plus large de l'impact éventuel de ces événements d'intégration sur la viabilité des spermatozoïdes et le devenir des produits de fécondation, ce qui pourrait avoir un intérêt notable dans le cadre de la procréation médicalement assistée.

Cette journée a permis de souligner la diversité thématique et le dynamisme des équipes françaises impliquées dans la recherche sur les herpèsvirus humains et animaux. Henri Gruffat, président de l'association, s'est félicité de ce constat et a souligné l'importance du réseau dans l'animation d'une recherche qui reste notoirement sous-dotée, constat surprenant au regard de l'importance de ces virus en virologie humaine et de leurs multiples apports conceptuels dans le domaine de la virologie fondamentale et médicale et de ses ramifications multiples dans les domaines de l'oncologie et de l'immunologie notamment.

Contact : <http://assos-herpas.ens-lyon.fr/>