

HERPES VIROSE B :

GESTION DU RISQUE INFECTIEUX CHEZ LE MACAQUE ET L'HOMME

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Edwin, Laurent COUTROT
Né, le 20 juin 1981 à RENNES (Ille-et-Vilaine)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Jacques DUCOS de LAHITTE

JURY

PRESIDENT :

M. Antoine BLANCHER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

M. Jacques DUCOS de LAHITTE
M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

M. Bruno MARCHOU

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur Antoine BLANCHER

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Immunologie (Option Biologique)

Pour m'avoir confié ce travail et avoir activement dirigé cette thèse et sans qui celle-ci ne serait pas ce qu'elle est.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur Jacques DUCOS de LAHITTE

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Parasitologie et Maladies parasitaires

Pour avoir accepté de diriger cette thèse.

Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

Maître de conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie infectieuse

Pour avoir accepté de participer à ce jury et pour ses précieux conseils rédactionnels qui faciliteront la lecture de ma thèse.

Monsieur le Professeur Bruno MARCHOU

Professeur des Universités

Chef de service - Praticien Hospitalier

Maladies infectieuses et tropicales

Pour avoir accepté de participer à ce jury et avec qui nous avons collaboré au cours de ce projet.

Au Docteur Marie Blancher-Sardou qui m'a confié les résultats de ses travaux qui m'ont permis de réaliser une grande partie des études présentés dans cette thèse. Je la remercie, ainsi que les techniciennes de son laboratoire, pour leur aide précieuse et leur disponibilité.

A Eric André, pour ses conseils et son aide précieuse. J'ai largement bénéficié de son expertise concernant la gestion des macaques en captivité.

A Béatrice, Pol-André et Stéphanie, pour leur aide tout au long de mes travaux et pour tout le reste.

A mes parents, pour leur amour et leur soutien.

A mes grands parents, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

A mon frère et à ma sœur, pour tout ce bonheur partagé lors de notre enfance.

A toute ma famille.

A tous mes amis du passé et du présent, pour tous les merveilleux moments passés en votre compagnie et pour votre soutien le plus souvent sans faille.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
LISTE DES ABBREVIATIONS	13
INTRODUCTION.....	14
CHAPITRE I: HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DE L'AGENT RESPONSABLE DE L'HERPES VIROSE B.....	15
CHAPITRE II : LA BIOLOGIE DU <i>CERCOPITHECINE HERPESVIRUS 1</i>....	22
1. CLASSIFICATION DES ALPHAHERPESVIRINAE.....	22
2. PHYLOGENESE DES HERPESVIRIDAE	24
3. LE VIRUS <i>CEHV-1</i>, SA STRUCTURE, SON GENOME, SA VARIABILITE.....	26
3.1. Les caractéristiques structurales du virion.	26
3.2. Le génome.	27
3.4. La variabilité génétique du <i>CeHV-1</i>	32
3.5. Les autres virus du genre <i>Simplexvirus</i> chez les primates.	35
4. NATURE ET ORIGINE DES BARRIERES D'ESPECE DES VIRUS DU GENRE <i>SIMPLEXVIRUS</i> CHEZ LES PRIMATES.....	37
4.1. Les infections d'espèces de primates non humains par des virus humains du genre <i>Simplexvirus</i>	37
4.2. Les infections humaines par des virus d'espèces de primates non humaines du genre <i>Simplexvirus</i>	39
4.3. Contournement des barrières d'espèce des virus du genre <i>Simplexvirus</i> chez les primates.	42
5. LE CYCLE DE LA REPLICATION VIRALE.....	46
5.1. Récepteurs viraux.	46
5.2. L'entrée du virus dans la cellule.	46
5.3. La réplication du virus.	46
6. CYCLE INFECTIEUX CHEZ L'HOTE NATUREL	47
6.1. La Primo-infection par le <i>CeHV-1</i>	47
6.2. Phase de latence virale après mise en place de la réponse immunitaire	48
6.3. La réactivation endogène de l'infection : herpès de sortie.	49
7. LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-<i>CEHV-1</i>.....	51
7.1. Réponse immunitaire innée	51
7.2. Réponse humorale :	53
7.2.1. Evolution des titres en fonction de la maladie et du temps.	53
7.2.2. Protection par les anticorps	54
7.2.3. L'importance des épitopes glycosylés dans la spécificité des anticorps	55
7.3. Réponse cellulaire :	56
7.4. L'évasion du <i>HSV</i> vis-à-vis du système immunitaire	57
8. LE RESERVOIR ANIMAL NATUREL DU <i>CEHV-1</i>.....	57
8.1. Les espèces concernées naturellement	57
8.2. Les espèces sensibles en captivité ou expérimentalement	59
8.3. L'infection des primates africains par les virus herpès du genre <i>Simplexvirus</i>	60
CHAPITRE III : LA MALADIE CHEZ L'ANIMAL : SES SYMPTOMES, SON DIAGNOSTIC ET SON TRAITEMENT.....	62
1. LES ESPECES DE PRIMATES HOTES DU <i>CEHV-1</i> :	62
2. DESCRIPTION CLINIQUE DE LA MALADIE ANIMALE	63
2.1. Les signes cliniques de la forme classique chez le macaque.....	63
2.1.1. La primo-infection	63
2.1.2. La latence virale et les récurrences par réinfection endogène	63
2.2. Aspect lésionnel.....	64

2.2.1.	Sur le plan macroscopique :	64
2.2.2.	Sur le plan microscopique :	64
2.3.	Les formes cliniques atypiques.....	65
2.3.1.	Chez les hôtes naturels du virus : les macaques d'Asie	65
2.3.1.1.	La forme généralisée :	65
2.3.1.2.	La forme encéphalitique :	65
2.3.1.3.	La forme ophtalmique grave :	66
2.3.1.4.	Les formes aggravées par une immunodépression :	67
2.3.2.	Les formes cliniques dans les autres espèces de primates sensibles (en dehors de l'homme).....	70
2.3.3.	Les formes cliniques chez les animaux de laboratoire en dehors de primates.....	72
3.	L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE L'HERPES VIROSE B CHEZ LES MACAQUES	73
3.1.	Le réservoir de virus	73
3.2.	La prévalence de l'infection.....	73
3.3.	Transmission du virus	75
3.4.	Saisonnalité des récurrences et des transmissions.....	76
3.5.	Parallèle avec l'épidémiologie de l'infection par les HSV chez l'homme.....	77
4.	LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES MACAQUES MALADES ET PORTEURS.....	78
4.1.	Sérologie	78
4.1.1.	Tests de neutralisation, RIA, Western Blot et ELISA	78
4.1.1.1.	Tests de neutralisation.....	78
4.1.1.2.	Dosages radio-immunologiques.....	78
4.1.1.3.	Le Western Blot.....	79
4.1.1.4.	Les tests ELISA	79
4.1.2.	Problèmes posés par la sérologie :.....	83
4.1.2.1.	Les sérologies faussement négatives.....	83
4.1.2.2.	Les sérologies faussement positives.....	85
4.2.	Polymérisation en chaîne (PCR).....	86
4.2.1.	Le prélèvement.....	86
4.2.2.	Les techniques	86
4.3.	L'étude du pouvoir infectieux in vitro	88
4.4.	Les tests d'inhibition du pouvoir pathogène in vitro.....	89
5.	LE TRAITEMENT DE L'HERPES VIROSE B CHEZ L'ANIMAL	90
5.1.	Le traitement médical.....	90
5.2.	La vaccination anti-CeHV-1	90

CHAPITRE IV : LE CEHV-1 CHEZ L'HOMME..... 92

1.	HISTORIQUE DES CAS DE CONTAMINATION HUMAINE.....	92
2.	LA CLINIQUE	101
2.1.	Voie d'infection.....	101
2.1.1.	Inoculation directe par des singes	101
2.1.2.	Inoculation directe par transmission interhumaine	101
2.1.3.	Autres modes de contamination.....	101
2.2.	Incubation de la maladie.....	101
2.3.	La primo-infection.....	101
2.3.1.	Premiers symptômes	101
2.3.1.1.	L'atteinte cutanéomuqueuse	102
2.3.1.2.	Le syndrome général.....	102
2.3.1.3.	L'atteinte du système nerveux.....	102
2.4.	L'évolution de la primo-infection.....	103
2.4.1.	Évolution de la maladie non traitée.....	103
2.4.2.	Évolution de la maladie traitée par antiviral.....	103
2.4.3.	Durée d'évolution de la maladie.....	104
2.5.	Récurrence de la maladie.....	104
3.	LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	105
3.1.	La mise en évidence du virus :	105
3.1.1.	Isolement viral par culture ou inoculation au lapin	106
3.1.2.	Détection par PCR.....	107
3.2.	La sérologie anti-CeHV-1 chez l'homme.....	107
3.2.1.	Les difficultés posées par le diagnostic sérologique anti-CeHV-1 chez l'homme	107
3.2.2.	Les méthodes de détections des anticorps dirigés contre le CeHV-1 chez l'homme.....	108
3.2.3.	Discussion de l'effet protecteur des anticorps humains anti-HSV vis-à-vis de l'infection par le CeHV-1	110
3.3.	Traitements de la maladie humaine	111
3.3.1.	Les molécules disponibles et leur mode d'action	111
3.3.1.1.	L'Acyclovir	111
3.3.1.2.	Le Valaciclovir.....	112
3.3.1.3.	Le Ganciclovir.....	112
3.3.1.4.	Les autres molécules antivirales.....	113
3.3.2.	Traitement préventif chez l'homme.....	113
3.3.3.	Traitement curatif.....	114

4. COMPARAISON ENTRE L'ENCEPHALITE HUMAINE A CeHV-1 ET AUX ENCEPHALITES DUES AUX HERPES VIRUS HUMAINS	114
---	-----

CHAPITRE V : LA REGLEMENTATION ACTUELLE EN FRANCE, EN EUROPE ET DANS LE MONDE..... 116

1. LA REGLEMENTATION ACTUELLE SUR LA MANIPULATION DU VIRUS.....	116
2. LA REGLEMENTATION ACTUELLE SUR L'IMPORTATION DES MACAQUES CONCERNANT LE CeHV-1.....	117
3. LES MESURES A PRENDRE EN CAS DE DECOUVERTE D'ANIMAL POSITIF.....	118

CHAPITRE VI : LES MESURES PREVENTIVES 119

1. CHEZ L'ANIMAL :	119
1.1. Quarantaine clinique	119
1.2. La sérologie anti-CeHV-1 chez le macaque :	120
1.3. La PCR CeHV-1 chez le macaque :	120
2. CHEZ L'HOMME :	121
2.1. Protection et information des personnes.....	121
2.2. Conduite à tenir en cas d'accident d'exposition à un macaque :	123

CHAPITRE VII : ÉVALUATION D'UN TEST SEROLOGIQUE..... 128

1. INTRODUCTION :	128
1.1. Les tests mis en œuvre par les laboratoires de référence :	128
1.2. Sérologie herpès réalisée à Toulouse par réactivité croisée vis-à-vis de HSV-1 et HSV-2.....	129
2. MATERIELS ET METHODES.....	131
2.1. Origine des sérums testés :	131
2.2. Techniques sérologiques :	131
2.2.1. Prélèvement et préparation des échantillons de sérum :	131
2.2.2. Test ELISA Cobas Core II anti-HSV-1/-2 :	131
2.2.3. Test ELISA « microplaque » anti-HSV-1 :	133
2.2.4. Sérologie anti-CeHV-1 réalisée par un laboratoire de référence :	133
2.2.5. Isoélectrofocalisation	134
2.3. Analyse statistique des données :	134
2.3.1. Détermination du seuil de positivité du test chez le macaque :	134
2.3.2. Évaluation la sensibilité et de la spécificité du test :	134
2.3.3. Évaluation des valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) :	135
2.3.4. Évaluation la reproductibilité du test :	136
2.4. Tests d'inhibition de la réactivité des sérums dans le test Cobas Core II.....	136
2.5. Autopsie des animaux.....	136
2.6. Extraction de l'ADN et protocoles de polymerase chain reaction (PCR).....	137
2.6.1. La PCR conventionnelle prenant pour cible la glycoprotéine G du CeHV-1 et nommée « gGS4 ».....	138
2.6.2. La PCR nichée prenant pour cible la glycoprotéine C du CeHV-1 et nommée « gC ».....	138
2.6.3. Les PCR conventionnelles prenant pour cible la polymérase du CeHV-1 et nommée « Herpès-Polymerase ».....	139
2.6.4. La PCR quantitative prenant pour cible la glycoprotéine G du CeHV-1 et nommée « gG ».....	140
2.6.5. La PCR quantitative prenant pour cible la glycoprotéine B du CeHV-1 et nommée « gB ».....	140
3. RESULTATS.....	141
3.1. Reproductibilité du test sérologique Cobas Core II.....	141
3.1.1. Reproductibilité intra-essais.....	141
3.1.2. Reproductibilité inter-essais	141
3.2. La réactivité croisée des anti-immunoglobulines G humaines avec les immunoglobulines G de macaque.....	142
3.3. Analyse statistique des résultats de sérologie obtenus avec le test ELISA Cobas Core II.	143
3.4. Comparaison des résultats obtenus avec ceux des laboratoires de référence.....	149
3.5. Sensibilité et spécificité du test en fonction du seuil	149
3.6. Valeurs prédictives du test du test Cobas Core II	150
3.7. Analyse du test « microplaque »:	151
3.8. Titrage du test Cobas Core II et « microplaque ».....	155
3.9. Corrélation entre les kits Cobas Core II et « microplaque »	159
3.10. Cas de discordance entre les résultats rendus par les laboratoires de référence.	160
3.11. Tests d'inhibition de la réactivité des sérums dans le test Cobas Core II par des antigènes viraux issus de HSV-1 et HSV-2.	161
3.11.1. Les anticorps anti-CeHV-1 de macaque détectés par le test Cobas Core II sont inhibables par les antigènes solubles de HSV-1 et de HSV-2.	161
3.11.2. Expertise d'un sérum de macaque crabier positif en Cobas Core II, négatif dans le test microplaque et positif pour les anticorps anti-CeHV-1.....	162
3.12. Autopsie de deux macaques séropositifs.	164

3.13.	<i>Résultats obtenus par PCR</i>	165
3.13.1.	<i>La PCR conventionnelle « gGS4 »</i>	165
3.13.2.	<i>La PCR nichée « gC »</i>	165
3.13.3.	<i>Les PCR conventionnelles « Polymerase »</i>	165
3.13.4.	<i>La PCR quantitative « gG »</i>	166
3.13.5.	<i>La PCR quantitative « gB »</i>	167
3.13.6.	<i>Contrôle de spécificité vis-à-vis des virus humains</i>	170
4.	DISCUSSION	171
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		178
ANNEXES		179
BIBLIOGRAPHIE		220

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1 : Classification des <i>Alphaherpesvirinae</i>	22
Tableau 2 : Comparaison de la taille et de la richesse en G+C des régions génomiques des virus CeHV-1, HSV-1 et HSV-2.....	29
Tableau 3 : Séquences des amorces pour la détection spécifique de l'ADN du CeHV-1.....	87
Tableau 4 : Cas cliniques d'infections humaines par le CeHV-1	93
Tableau 5 : Description des tests sérologiques pratiqués par les laboratoires de référence... ..	128
Tableau 6 : Séquences et couples d'amorces employés pour les PCR « Herpès-Polymerase »	139
Tableau 7 : Comparaison des titre en anticorps anti-HSV-1 obtenus dans le test microplaque avec sept sérums de macaque, un sérum de babouin (A à H) et un pool de sérum humain positif (SHP).....	157
Tableau 8 : Comparaison de la hauteur des plateaux de saturation dans le test microplaque en fonction de l'espèce de primate dont sont issus les sérums.	158
Tableau 9 : récapitulatif des résultats discordants rendus par les laboratoires de référence et comparaison avec les résultats obtenus avec les test ELISA Cobas Core II et « microplaque »	160
Tableau 10: Résultats de PCR. Ces PCR ont été réalisés avec l'ADN extrait à partir de différents échantillons prélevés chez des macaques de statut sérologique connu.....	168
Figure 1 : Arbre phylogénétique des <i>Herpesviridae</i> aviaires et mammifères basée sur la glycoprotéine gB	25
Figure 2 : Herpès simplex virus.	27
Figure 3 : Analyse phylogénétique des séquences codantes US4, US5, US6.....	33
Figure 4 : Relation phylogénétique des <i>Simplexvirus</i>	35
Figure 5 : Représentation schématique de l'évolution des principaux gènes de téta défensines de primates.	45
Figure 6 : image de l'analyse par isoélectrofocalisation d'échantillons humains et simiens.	142
Figure 7 : Distribution en fréquence des résultats obtenus sur les sérums de macaques avec le test ELISA Cobas Core II.....	143
Figure 8a : Distribution des fréquences des logarithmes des résultats ELISA Cobas Core II obtenus avec des animaux séronégatifs.....	144
Figure 8b : Droite de Henry.	144
Figure 9: Résultats obtenus pour 1728 sérums de macaque avec le test ELISA Cobas Core II.	145
Figure 10 : Distribution pour différentes populations des fréquences des logarithmes des résultats ELISA Cobas Core II obtenus avec des macaques fascicularis séronégatifs.	146
Figure 11 : Distribution pour différentes populations des fréquences des logarithmes des résultats ELISA Cobas Core II obtenus avec des macaques fascicularis séronégatifs nouvellement importés.	147
Figure 12 : Distribution pour les deux sexes des fréquences des logarithmes des résultats ELISA Cobas Core II obtenus avec des macaques fascicularis séronégatifs.....	148
Figure 13 : Distribution des fréquences des logarithmes des résultats ELISA Cobas Core II obtenus avec des macaques rhesus séronégatifs.	148
Figure 14 : Répartition des résultats obtenus avec le test Cobas Core II sur des sérums de macaques de statut sérologique connu	149
Figure 15 : Diagrammes de ROC du test ELISA Cobas Core II.....	150
Figure 16: Résultats obtenus pour 588 sérums de macaque avec le test ELISA « microplaque »	151
Figure 17: Répartition des résultats obtenus avec le test « microplaque » sur des sérums de macaques de statut sérologique connu (voir Matériels et Méthodes).	152
Figure 18 : Diagrammes de ROC du test ELISA « microplaque »	152

Figure 19 : Distribution pour différentes populations des fréquences des logarithmes des résultats ELISA « microplaque » obtenus avec des macaques fascicularis séronégatifs.....	154
Figure 20 : Titrage d'un pool de sérums humains avec le test Cobas Core II.	155
Figure 21 : Comparaison du plateau de saturation théorique dans les tests Cobas Core II et microplaque.....	156
Figure 22 : Comparaison des plateaux de saturation théorique dans le test microplaque avec sept sérums de macaque, un sérum de babouin (A à H) et un pool de sérum humain positif (SHP).....	157
Figure 23 : Corrélation entre l'inverse de la Dil(max/2) déterminé en test « microplaque » et les résultats bruts Cobas Core II pour les mêmes sérums.	159
Figure 24 : Réactivité relative des sérums de macaque entre les tests ELISA Cobas Core II et « microplaque ».....	159
Figure 25 : Comparaison des courbes d'inhibition par les antigènes HSV-1 et HSV-2 des anticorps anti-HSV humains (pool de 4 sérums humains anti-HSV positifs) et des anticorps anti-CeHV-1 d'un macaque Tonkean porteur du virus (PCR positive).	161
Figure 26 : Courbes d'inhibition du sérum de macaque crabier particulier par les antigènes issus de VERO, HSV-1 et HSV-2.....	163
Figure 27 : Résultats de PCR conventionnelle « gGS4 ».....	165
Figure 28 : Résultats de PCR nichée « gC ».	165
Figure 29 : Courbe standard de la PCR quantitative.....	167
Figure 30 : Résultats de PCR quantitative « gB ».....	170
Annexe 1 : Génome de l'herpès virus B et comparaison.....	180
Annexe 2 : Laboratoires de référence.....	184
Annexe 3 : Répartition géographique de différentes espèces de primate.....	185
Annexe 4 : Textes réglementaires.....	187
Annexe 5 : Procédure d'envoi d'échantillons de primates potentiellement infectieux.....	197
Annexe 6 : Plaquette d'information du CNRS sur le CeHV-1.....	206
Annexe 7 : CAT en cas d'accident d'exposition à un macaque.....	212
Annexe 8 : Photographies d'autopsie de macaques séropositifs.....	217

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
CCR : CC chemokine receptor
CeHV: Cercopithecine herpesvirus
CHO : chinese hamster ovary
CMV : cytomegalovirus
CXCR : CXC chemokine receptor
Da : dalton
EBV : Epstein-Barr virus
ELISA : enzyme linked immunosorbent assay ou test immunoenzymatique
HSV : herpes simplex virus
ICP : infected cell protein
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
kb : kilobases
KO : knock out
LAT : latency-associated transcript
ORF : open reading frame ou cadre ouvert de lecture
pb : paire de base
PCR : polymerase chain reaction ou amplification génique
SA8 : simian agent 8
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SIV : simian immunodeficiency virus
SV40 : simian virus 40
TAP : transporter associated with antigen processing
TLR : toll like receptor
TNF : tumor necrosis factor

INTRODUCTION

Le virus de l'herpès virose B du macaque appartient à la famille *Herpesviridae*, plus précisément à la sous-famille *Alphaherpesvirinae* et au genre *Simplexvirus*. Ce virus, endémique chez les macaques asiatiques à l'état sauvage, est très proche phylogénétiquement des virus Simian Agent 8 des singes verts africains et Herpes Papio Virus des babouins. Ce virus est également très proches des herpès simplex virus 1 et 2 infectant l'homme.

Ce virus est un agent de zoonose. Le virus de l'herpès virose B du macaque est le seul herpès virus de primate connu à l'heure actuelle pour être pathogène pour l'homme. Le virus présente un neurotropisme marqué chez l'homme et est responsable d'une encéphalomyélite le plus fréquemment mortelle en l'absence de traitement. Ce virus dont la séquence entière est parfaitement connue demeure encore mystérieux, entre autre en ce qui concerne les facteurs favorisant le franchissement de la barrière d'espèce entre le macaque et l'homme, mais aussi en ce qui concerne ses facteurs de virulence chez l'homme.

La maladie animale induite par ce virus, bien que bénigne chez son hôte naturel le macaque, pose le problème du risque de transmission du virus à l'homme. Ce dernier n'est pas protégé contre le virus du macaque bien que les anticorps humains anti-HSV-1 – et anti-HSV-2 – réagissent fortement avec les virus du macaque. Il existe encore de nombreux problèmes concernant cette maladie animale. En effet, le diagnostic de cette maladie chez le macaque n'est pas toujours aisé. L'absence de vaccin et de traitement efficace chez l'animal pose également des problèmes dans la gestion du risque infectieux chez l'homme et constituent encore à l'heure actuelle des pistes intéressantes pour la recherche.

Nous détaillerons donc dans cette thèse tout d'abord la biologie du virus de l'herpès virose B et la maladie animale et humaine qu'il induit. Puis nous nous intéresserons à la législation actuelle concernant la gestion du risque infectieux lié à ce virus ainsi qu'aux mesures préventives qui doivent être envisagée pour le contrôle de cette zoonose. Enfin nous présenteront nos travaux personnels qui ont consisté d'une part en l'analyse statistique des résultats de sérologie herpès sur des sérums de macaque obtenus dans un laboratoire d'analyse médical et d'autre part en l'analyse par PCR de divers échantillons d'ADN à la recherche du virus de l'herpès virose B du macaque.

CHAPITRE I : HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DE L'AGENT RESPONSABLE DE L'HERPES VIROSE B

1932 : À cette époque Albert B. Sabin commençait à travailler sur le vaccin contre la poliomyélite. Les macaques rhésus et crabiers étaient très utilisés dans la recherche sur la poliomyélite. Ils étaient très utiles en tant que modèle animal pour l'infection par le virus de la poliomyélite et leurs cellules rénales étaient utilisées pour cultiver le virus afin de développer un vaccin. Les travaux de Sabin permirent en 1954 de mettre au point un vaccin par voie orale contenant une souche de virus atténué de la poliomyélite. En 1956, il administra avec succès son vaccin à environ 9 000 petits singes, principalement des macaques, et 150 chimpanzés puis à 133 jeunes adultes d'un pénitencier de l'Ohio. En 1959 la souche vaccinale mise au point par Sabin fut utilisée en URSS pour vacciner une centaine de millions de personnes finissant de valider les preuves de l'efficacité de son vaccin. Les souches vaccinales développées par Sabin sont encore à l'heure actuelle utilisées pour la vaccination de millions d'enfants.

Au cours de ses travaux, Sabin eu donc à cultiver le virus de la poliomyélite sur des cellules de rein de macaques rhésus ou crabiers et à expérimenter l'infection par ce même virus chez des macaques rhésus et crabiers. La production de la souche vaccinale de virus atténué fut également réalisée par culture sur ces mêmes cellules. Tous ces travaux nécessitèrent la manipulation de centaines d'animaux qui furent importés d'Asie. Mais en 1934, Sabin publia un article décrivant le premier cas d'infection humaine par le virus de l'herpès virose B qui s'était produit deux ans plus tôt. Ainsi le Docteur W. B., âgé de 29 ans, est engagé dans le cadre de travaux expérimentaux sur le virus de la poliomyélite. Jusqu'en 1932, aucun cas d'infection humaine par le virus de l'herpès virose B n'avait été décrit et personne ne soupçonnait l'existence d'un tel virus chez le macaque ou les risques induits par la manipulation d'animaux infectés par ce virus. Le 22 octobre 1932, le Docteur B. est mordu au niveau des dernières jonctions articulaires de l'annulaire et de l'auriculaire de sa main gauche par un macaque rhésus (*Macaca mulatta*) cliniquement normal. Les plaies, qui étaient superficielles, ont été badigeonnées avec une solution iodée puis avec de l'alcool et le Docteur B. repris son travail. Le macaque mordeur décède ensuite durant une opération et aucun signe pathologique n'est remarqué. Trois jours plus tard, le Docteur B. présente une douleur, une rougeur et des petites vésicules au niveau des plaies de morsure. Une lymphangite se développe ensuite et rapidement les noeuds lymphatiques épitrochléaire et axillaires gauches deviennent hypertrophiés. Dans l'après-midi du 28 octobre, le Docteur est admis à l'hôpital Bellevue, Washington. Sa température était de 38,6°C, sa fréquence cardiaque de 90

battements par minute et son examen clinique ne révéla qu'une inflammation des dernières phalanges de l'annulaire et de l'auriculaire gauche toujours associée à une lymphadénopathie régionale. Le jour même le Docteur B. reçoit une injection prophylactique antitétanique. Durant les jours qui suivirent son état sembla s'améliorer considérablement, de petites vésicules contenant un liquide trouble apparurent au niveau des sites des morsures, mais la lymphangite disparut et l'hypertrophie des noeuds lymphatiques diminua.

Le 1er Novembre 1932, soit sept jours après les premiers signes d'infection au niveau des doigts, le Docteur B. développa des crampes abdominales généralisées qui disparurent en deux jours sans défense abdominale ni nausée ni vomissement ni diarrhée. Le 4 novembre, le patient développa une hyperesthésie marquée au niveau des membres inférieurs associée à une rétention urinaire. L'examen clinique, à ce moment là, révélait une hyperalgie généralisée de toute la partie du corps située sous l'ombilic ; une absence des réflexes abdominaux et rotuliens ; les réflexes achilléens et crémasteriens étaient quant à eux toujours présents. Le signe de Babinski était absent, il n'y avait aucun signe d'irritation méningée et les membres supérieurs étaient indemnes de toute symptomatologie. A la propre demande du patient, il reçut 20 cc. de sérum de patient poliomyélitique convalescent. Le jour suivant, le 5 novembre, le Docteur B. présenta une paralysie flasque des membres inférieurs. Une ponction de liquide céphalorachidien, réalisée ce jour là, donna un liquide clair contenant 112 cellules par millilitre, toutes des monocytes, de l'albumine et des globulines ; les étalements et cultures du liquide étaient négatifs. Ce jour là, un examen neurologique révéla de nombreux signes cliniques pathognomoniques d'une lésion médullaire des cornes antérieures d'étiologie inconnue, mais probablement liée à l'infection récente des doigts. Le 7 novembre, les paresthésies atteignent les membres supérieurs, on note un léger nystagmus horizontal mais les nerfs crâniens sont indemnes. Ce soir là la température du patient était de 40,5°C. Le matin du 8 novembre, la température était descendue à 37,2°C et le patient souffrait de douleurs des membres supérieurs. Au cours de la journée, le patient développa un hoquet et sa respiration devient lente et irrégulière. Le Docteur B. décéda au cours de la nuit après des épisodes de cyanose, de convulsion et d'atteinte pulmonaire, 18 jours après la morsure inoculatrice.

Toutes les cultures bactériennes tentées durant la maladie du Docteur B. à partir de sang, de liquide céphalorachidien et d'écouvillonnages réalisés au niveau des lésions cutanées au niveau des doigts furent négatives. Les tentatives d'inoculation intrapéritonéale de sang prélevé chez le patient à des souris, des rats, des cobayes et des lapins ne donnèrent aucun résultat significatif (Sabin 1934).

1933 : L'isolement d'un agent infectieux a été tenté par Albert Sabin et Arthur Wright à partir d'échantillons de cerveau, de moelle épinière, de rate et de noeuds lymphatiques obtenus lors de l'autopsie du Docteur B. réalisée 5 heures après son décès. Les échantillons ont été conservés en glycérine à 50% et ont été utilisés de quelques jours à plusieurs semaines après leur prélèvement. Il a été tenté sans succès de transmettre la maladie à des macaques rhésus, des chiens, des souris et des cobayes, en utilisant les échantillons d'organes glycerinés provenant du patient. Les inoculations au lapin ont, par contre, révélé la présence d'un agent ultrafiltrable dans les échantillons de cerveau, de moelle épinière et de rate glycerinés. La maladie développée par les lapins suite à une injection intradermique était alors extrêmement proche de la maladie humaine. Les animaux infectés présentèrent ainsi des lésions vésiculeuses et nécrotiques au niveau du site d'inoculation, une rétention urinaire et une paralysie flasque progressive ascendante. La mort des lapins intervient enfin par arrêt respiratoire. L'agent ultrafiltrable présenta donc un neurotropisme marqué chez le lapin.

Lorsque les auteurs tentèrent d'établir l'identité du virus incriminé, la prise en considération de ses propriétés biologiques leur permit d'exclure les virus de la poliomyélite, de la rage, de la vaccine. La localisation du virus dans le système nerveux central et les lésions nécrotiques des glandes surrénales suite à une inoculation intradermique du virus au lapin mais aussi la présence de corps d'inclusions intranucléaires dans les cellules épithéliales situées au niveau des lésions, ont permis aux auteurs de suspecter l'appartenance de cet agent au groupe herpès. L'agent est alors nommé « virus B ». Dans le même temps, Sabin démontra que ce virus B ou virus de l'« herpès virose B » présentait une forte relation antigénique avec les virus herpès simplex humains tout en présentant des propriétés propres, en effet les sérums d'origine humaine contenant des anticorps anti-herpès simplex étaient en partie capables de neutraliser le pouvoir infectieux du virus de l'herpès virose B¹. Sabin étudia alors par une méthode de séroneutralisation puis inoculation au lapin, la prévalence des anticorps spécifiques du virus de l'herpès virose B chez des macaques rhésus. Seul un animal sur les treize étudiés présentait de tels anticorps dans son sérum (Sabin 1934).

1936 : Hurst, qui travaille sur le virus de la maladie d'Aujeszky (un herpès virus inféodé au porc) étudie l'infectiosité de ce virus chez le macaque rhésus. Il démontra que les macaques présentant une immunité contre le virus B étaient plus résistants à l'infection par le virus de la maladie d'Aujeszky, démontrant encore une fois la proche parenté qui existe entre le virus B et les autres herpès virus. Il démontra également que la séroprévalence anti-virus B chez le macaque pouvait être très élevée, ainsi dans un lot de sérums d'un groupe de macaque provenant des Indes, 85% contenaient des anticorps contre le virus B (Hurst 1936).

¹ La réactivité croisée en test de séroneutralisation sera traitée dans le chapitre 4 (page 112)

1954 : Jusqu'à cette date, seuls deux cas de contamination humaine par le virus B avaient été rapportés, tous les deux par Sabin (Sabin 1934, 1949), et ces cas faisaient suite à un contact avec de la salive de macaque rhésus orientant l'origine de cette maladie vers ces animaux. Différentes études montrèrent également que les macaques rhésus et crabiers pouvaient, suivant une prévalence variable, posséder des anticorps neutralisants dirigés contre le virus B amenant les chercheurs à suspecter les macaques rhésus et crabiers comme hôtes naturels de cet agent. Cependant aucun isolement direct du virus B chez l'animal n'avait été rapporté.

La même année 1954, Melnick et Banker, au cours d'une étude menée sur l'infectiosité du virus de la poliomyélite chez le macaque rhésus, ont découvert, lors d'un passage d'une souche de ce dernier virus sur un macaque rhésus, la présence d'un autre virus dans le système nerveux central de cet animal induisant des signes cliniques et histologiques de méningo-encéphalite chez le rhésus, le macaque crabier, le rat du coton et non de poliomyélite. De fortes doses infectieuses de ce virus inoculées par voie intracérébrale engendraient de manière inconstante une méningo-encéphalite chez les macaques rhésus et crabiers. La souris fut peu réceptive à l'infection par ce virus et même après plusieurs passages chez cet animal, seuls 5 à 25% des animaux succombèrent d'une inoculation par voie intracérébrale. La maladie observée chez ces souris était également une méningo-encéphalite. L'inoculation intracérébrale de ce virus à des rats du coton ou à des cobayes engendra de manière inconstante chez ces animaux une méningo-encéphalite fatale. Enfin l'inoculation de ce virus à des lapins amena les auteurs à retrouver toutes les caractéristiques de la maladie observée par Sabin lors de l'inoculation du virus B à des lapins en 1933 (Melnick 1954). Les épreuves de séroneutralisation réalisées sur le virus ont montré que les anticorps dirigés contre le virus B permettaient une neutralisation efficace du pouvoir infectieux du virus isolé par Melnick et Banker, tout comme dans une moindre mesure les anticorps dirigés contre les herpès virus simplex humains. C'est ainsi que Melnick et Banker isolèrent pour la première fois le virus B à partir du système nerveux central d'un macaque rhésus apparemment sain. Ils montrèrent également qu'un certain nombre, au moins 20%, des macaques rhésus mais aussi crabiers de leur laboratoire possédaient des anticorps naturels neutralisant le virus de l'herpès virose B (Melnick 1954).

Toujours en 1954, Krech et Lewis étudièrent la propagation du virus de l'herpès virose B sur culture cellulaire de rein de singe. Cette étude fit directement suite à la découverte du Dr Wood qui isola ce virus à partir de milieu de culture de cellules de rein de macaques. Ce virus a ainsi pu être propagé sur ce type cellulaire avec une grande efficacité. Le virus de l'herpès virose B démontra également une grande stabilité dans un milieu de culture cellulaire conservé à +4°C pendant plus de 8 semaines. L'infectiosité du virus fut également conservée

dans ce même milieu à -72°C pendant plus de 8 semaines et à +40°C pendant près de 10 jours (Krech 1954). Les auteurs réalisèrent également une étude sérologique qui démontra que 23% des macaques rhésus et crabiers testés présentèrent des anticorps spécifiques de le virus B, ces mêmes macaques servant à la préparation des cultures de cellules de rein de singe. Toutes ces considérations firent craindre par la suite une contamination de masse des cultures cellulaires de rein de singe servant à fabriquer les vaccins antipoliomyélitiques¹.

1958 : Vingt-cinq ans après la description du premier cas humain d'infection par le virus B et quatre ans après le premier isolement de ce même virus chez un macaque rhésus, la première description de la maladie naturelle chez le macaque rhésus a enfin été réalisée. Ainsi en 1958, Keeble, Christofinis et Wood ont décrit pour la première fois le tableau clinique associé avec l'infection par le virus B chez le macaque rhésus. Des lésions vésiculeuses sur la langue et les lèvres furent les signes cliniques prépondérants. Des lésions du système nerveux central furent également décrites, elles se situaient dans la racine des nerfs trijumeaux et faciaux. L'analyse histologiques des lésions cutanéomuqueuses et nerveuses montra la présence de corps d'inclusion intranucléaires éosiniphiliques dits Cowdry type A, typiques des infections par herpès virus.

Il fut démontré que 2,3% des animaux présentaient des signes cliniques d'infection par le virus B. Il apparut également que la prévalence des cas clinique était plus élevée chez les animaux jeunes et chez les animaux importés depuis peu de leur pays d'origine. Il fut remarqué par les auteurs de grandes similitudes entre l'infection naturelle des macaques par le virus B et l'infection de l'homme par les herpès virus simplex humains. L'existence d'une infection par le virus B inféodée aux macaques rhésus² a ainsi été pour la première fois décrite dans l'article publié par Keeble *et al.* en 1958. L'importance de l'utilisation de macaques exempts d'infection par le virus B, dans la recherche biomédicale et plus particulièrement dans la production des vaccins contre la poliomyélite, a également été pour la première fois indiquée dans cet article (Keeble 1958). Depuis cette époque la crainte de la dissémination de

¹ Aujourd'hui on n'emploie plus de culture primaire de rein de macaque pour la production du vaccin contre la poliomyélite. Les souches virales sont cultivées sur des cultures de cellules de rein de singe vert (*Chlorocebus aethiops*), originaire des Iles de la Barbade en particulier. Ces animaux introduits artificiellement par l'homme sur cette île sont exempts de très nombreuses viroses et parasitoses très communes dans les populations africaines dont ils dérivent. Les singes verts de la Barbade sont ainsi exempts du SA8 (proche du virus B), du SIV et du SV40 ce qui garantit aujourd'hui l'absence de ces virus dans les cultures de souches vaccinales de la poliomyélite. Nous verrons plus loin que l'isolat génétique de macaques crabiers de l'île Maurice est indemne de virus B (voir page 58). Dans le cas de la Barbade et de Maurice, il semble que la fondation de ces populations par des importations d'animaux juvéniles ait permis l'expansion de populations indemnes de virus transmis tardivement (SIV pour les singes verts de la Barbade et virus B pour les macaques crabiers de Maurice).

² Il a depuis été également démontré la présence d'une infection enzootique par le virus B chez d'autres espèces de macaques d'origine asiatique : le macaque crabier (*Macaca fascicularis*), le macaque à face rouge ou macaque brun (*Macaca arctoides*), le macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*), le macaque japonais (*Macaca fuscata*), le macaque bonnet chinois (*Macaca radiata*), et le macaque de Formose (*Macaca cyclopis*) (Weigler 1992) mais également le macaque du Tibet (*Macaca thibetana*), le macaque à queue de lion (*Macaca silenus*) et le macaque de Tonka (*Macaca tonkeana*).

virus animaux à l'homme par l'intermédiaire de vaccins s'est étendue à d'autres virus : le SV40 et le SIV en particulier. Des mesures ont été prises afin que ces deux virus, tout comme le virus de l'herpès virus B ne puissent plus être présents dans les vaccins vivants utilisant des souches atténuées.

1993 : l'apparition de la PCR comme moyen rapide et sensible de mise en évidence du génome viral a incité les chercheurs à développer cette technique pour la détection de l'infection par le virus de l'herpès virus B. Scinicariello, Eberle et Hilliard ont ainsi décrit en 1993 une méthode d'amplification spécifique par PCR de l'ADN de l'herpès virus B. Ils détectèrent ainsi, avec une grande sensibilité, l'ADN du virus de l'herpès virus B dans des prélèvements provenant d'un patient infecté par ce même virus (cas 26 décrit dans le chapitre 4) et de macaques séropositifs pour le virus B. La spécificité pour le virus B fut obtenue soit par Southern Blot utilisant une sonde ADN spécifique de la séquence nucléotidique du virus B, soit par digestion enzymatique du produit de PCR et analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction. Dans cette étude 9 prélèvements autopsiques de patient infecté et 12 écouvillonnages de macaques séropositifs pour le virus B furent étudiés, l'ADN viral fut détecté pour 16 échantillons (76%) par PCR alors que seulement 11 (52%) étaient positifs par culture virale (Scinicariello 1993). Ainsi la mise au point d'une méthode de diagnostic par PCR est apparue comme une grande avancée pour la détection du virus B chez les patients infectés mais surtout chez l'animal¹ en raison de la grande sensibilité et spécificité que présente cette technique. De plus la recherche de l'ADN viral par PCR ne nécessite que l'intégrité de l'ADN et pas la préservation du pouvoir infectieux, de plus au niveau des neurones le génome viral peut être présent sous forme d'épisome et non de virion infectieux. L'absence d'emploi de prélèvements ayant conservés leur pouvoir infectieux potentiel présente un gain de sécurité lors de la manipulation et du transport des prélèvements, mais également un prélèvement et un stockage des échantillons plus aisés. La détection par PCR du génome viral du virus B peut permettre enfin d'obtenir un résultat plus rapide que la culture.

1998 : L'existence de différents génotypes de virus B était soupçonnée depuis 1989. Les études menées par Wall *et al.* à cette époque, qui ont porté sur vingt isolats de HVB provenant de singes adultes, ont permis de différencier, par l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction issus de l'ADN viral, le génome de virus B infectant des macaques crabiers de celui de macaques rhésus (Wall 1989). Grâce à des techniques modernes, Smith, Black et Eberle ont pu réaliser la comparaison de séquences dans une région variable du

¹ Il a depuis été démontré la possibilité d'une excrétion virale asymptomatique au niveau des muqueuses buccales et génitales chez des macaques rhésus. Cette excrétion asymptomatique était alors indétectable par les méthodes classiques d'isolement viral sur cellules Vero mais fut détectée par PCR. La prévalence de l'excrétion virale détectée par PCR fut dès lors de près de 15% des macaques séropositifs. Ce chiffre est beaucoup plus élevé que ce qui était décrit jusque là en raison de la faible sensibilité des autres techniques de détection du virus B.

génomique de onze isolats de virus B (4 de macaques rhésus, 3 de macaques crabiers, 2 de macaques à queue de cochon et 2 de macaques japonais). La comparaison des séquences et leur analyse phylogénétique confirment que les 11 isolats sont des souches de virus B et qu'il existe trois génotypes distincts. Les trois génotypes de virus B ont été associés aux espèces de macaque qu'ils infectent ; un groupe d'isolats viraux issus de macaques rhésus et de macaques japonais (deux espèces phylogénétiquement très proches), un groupe d'isolats viraux issus de macaques crabiers et enfin un groupe d'isolats viraux issus de macaques à queue de cochon. Cette étude démontre donc l'existence de différents génotypes de virus B liés aux différentes espèces hôtes de macaque auxquelles elles sont inféodées (Smith 1998).

2003 : Deux équipes publièrent en 2003 des techniques de PCR quantitative permettant de quantifier l'ADN du virus B dans un échantillon (Huff 2003, Perelygina 2003). L'intérêt de la PCR quantitative réside dans sa grande spécificité du fait de l'emploi de deux amorces et d'une sonde, sa grande sensibilité (10 à 50 copies par échantillon) et enfin dans sa possibilité de quantifier de l'ADN viral.

Toujours en 2003, la séquence complète du génome du virus B a été publiée (Perelygina 2003). Cette séquence correspond à la souche E2490 isolée chez un macaque rhésus. L'étude de cette séquence a révélé la forte homologie entre le génome du virus B et ceux des herpès simplex humains 1 et 2. La publication de la séquence complète du génome du virus B facilite également toutes les études génétiques sur ce virus et l'analyse des mécanismes moléculaires utilisés par le virus pour échapper au système immunitaire chez son hôte naturel ou des mécanismes impliqués dans la neurovirulence marquée chez l'homme. Nous verrons plus loin que les mécanismes de neurovirulence chez l'homme du virus B et des herpès simplex humains 1 et 2 sont différents.

Depuis les séquences nucléotidiques complètes d'autres virus proches comme le CeHV-2 et le CeHV-16 ont été publiées.

CHAPITRE II : LA BIOLOGIE DU *CERCOPITHECINE HERPESVIRUS 1*

1. Classification des *Alphaherpesvirinae*

La taxonomie internationale désigne le virus responsable de l'herpès virose B du macaque sous le nom *Cercopithecine herpesvirus 1* « CeHV-1 ». Son numéro d'identification taxonomique dans Genbank est le [10325](#), son nom anglais commun est « B virus ». Le CeHV-1 appartient au genre *Simplexvirus* de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* et est membre de la famille des *Herpesviridae*. Les autres noms (synonymes) du CeHV-1 sont « simian herpes B », virus SHBV, « herpes virus B », « herpes B virus », « Simian herpesvirus B », « Simian herpes B virus », « Herpesvirus simiae », « Cercopithecoid herpesvirus 1 », « monkey B virus ».

Dans la suite de cette thèse, le virus sera désigné sous l'acronyme **CeHV-1**.

Les *Alphaherpesvirinae* regroupent de nombreux agents viraux de grande importance médicale et économique chez l'homme et l'animal (tableau 1). Membres de la famille des *Herpesviridae*, ces virus se caractérisent dans leur structure par un génome, constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire, entouré d'un tégument de nature protéique. L'ensemble est enveloppé d'une bicouche lipidique où viennent s'ancrer des glycoprotéines virales. Les *Alphaherpesvirinae* se distinguent des sous-familles *Beta-* et *Gammaherpesvirinae* par un cycle de multiplication court, une propagation rapide de l'infection en culture cellulaire, une lyse efficace des cellules infectées et la capacité d'établir des infections latentes au niveau des neurones des ganglions des racines postérieures médullaires sensibles. Au sein de cette sous-famille, quatre genres sont identifiés (voir tableau 1).

La sous-famille des *Betaherpesvirinae*, aussi nommée groupe des cytomégalovirus, comprend les genres *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus* et *Roseolovirus*. La sous-famille des *Gammaherpesvirinae* comprenant les genres *Lymphocryptovirus* et *Rhadinovirus* est également décrite sous le terme de groupe des virus lymphoprolifératifs.

Tableau 1 : Classification des *Alphaherpesvirinae*

Genre	Espèce (nom commun)	Espèce hôte
-------	---------------------	-------------

<i>Iltovirus</i>	<i>Gallid herpesvirus 1</i> (Infectious laryngotracheitis virus)	<i>Gallus spp.</i>
<i>Mardivirus</i>	<i>Gallid herpesvirus 2</i> (Marek's disease virus type 1)	<i>Gallus domesticus</i>
	<i>Gallid herpesvirus 3</i> (Marek's disease virus type 2)	<i>Gallus domesticus</i>
	<i>Meleagrid herpesvirus 1</i> (Turkey herpesvirus)	<i>Meleagris gallopavo</i>
<i>Simplexvirus</i>	<i>Ateline herpesvirus 1</i> (Spider monkey herpesvirus)	<i>Ateles spp.</i>
	<i>Bovine herpesvirus 2</i> (Bovine ulcerative mammillitis virus)	<i>Bos spp.</i>
	<i>Cercopithecine herpesvirus 1</i> (CeHV-1)	<i>Macaca spp.</i>
	<i>Cercopithecine herpesvirus 2</i> (SA8 ou CeHV-2)	<i>Chlorocebus aethiops</i>
	<i>Cercopithecine herpesvirus 16</i> (Herpesvirus papio 2 ou CeHV-16)	<i>Papio spp.</i>
	<i>Chimpanzee herpesvirus</i> (nouveau virus isolé et caractérisé en 2005)	<i>Pan troglodytes</i>
	<i>Human herpesvirus 1</i> (HHV1 ou HSV-1)	<i>Homo sapiens</i>
	<i>Human herpesvirus 2</i> (HHV2 ou HSV-2)	<i>Homo sapiens</i>
	<i>Macropodid herpesvirus 1</i> (Parma wallaby herpesvirus)	<i>Macropus spp.</i>
	<i>Macropodid herpesvirus 2</i> (Dorcopsis wallaby herpesvirus)	<i>Macropus spp.</i>
	<i>Saimiriine herpesvirus 1</i> (Marmoset herpesvirus)	<i>Saimiri sciureus</i>
<i>Varicellovirus</i>	<i>Bovine herpesvirus 1</i> (Bovine rhinotracheitis virus)	<i>Bos spp.</i>
	<i>Bovine herpesvirus 5</i> (Bovine encephalitis herpesvirus)	<i>Bos spp.</i>
	<i>Bubaline herpesvirus 1</i> (Water buffalo herpesvirus)	<i>Bubalus bubalis</i>
	<i>Canid herpesvirus 1</i> (Canine herpesvirus)	<i>Canis spp.</i>
	<i>Caprine herpesvirus 1</i> (Goat herpesvirus)	<i>Capra spp.</i>
	<i>Cercopithecine herpesvirus 9</i> (Simian varicella virus)	<i>Erythrocebus patas</i>
	<i>Cervid herpesvirus 1</i> (Red deer herpesvirus)	<i>Cervus spp.</i>
	<i>Equid herpesvirus 1</i> (Equine abortion virus)	<i>Equus spp.</i>
	<i>Equid herpesvirus 3</i> (Equine coital exanthema virus)	<i>Equus spp.</i>
	<i>Equid herpesvirus 4</i> (Equine rhinopneumonitis virus)	<i>Equus spp.</i>
	<i>Equid herpesvirus 6</i> (Asinine herpesvirus 1)	<i>Equus asinus</i>
	<i>Equid herpesvirus 8</i> (Asinine herpesvirus 3)	<i>Equus asinus</i>
	<i>Equid herpesvirus 9</i> (Gazelle herpesvirus 1)	<i>Gazella spp.</i>
	<i>Felid herpesvirus 1</i> (Feline rhinotracheitis herpesvirus)	<i>Felis spp.</i>
	<i>Human herpesvirus 3</i> (Varicella-zoster virus)	<i>Homo sapiens</i>
	<i>Phocid herpesvirus 1</i> (Harbor seal herpesvirus)	<i>Phoca vitulina</i>
	<i>Suid herpesvirus 1</i> (Pseudorabies, Aujeszky's virus)	<i>Sus scrofa</i>

Parmi la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, le genre *Simplexvirus* nous intéresse ici particulièrement. Le CeHV-1 appartient en effet à ce genre tout comme d'autres virus avec lesquels il partage de nombreuses caractéristiques génétiques, moléculaires et antigéniques. Les caractéristiques physiopathologiques de l'infection par ces différents virus chez leurs hôtes naturels respectifs sont également très proches.

2. Phylogénèse des *Herpesviridae*

Les caractéristiques biologiques des virus de la famille des *Herpesviridae*, à laquelle appartient le CeHV-1, ont permis très tôt de subdiviser cette famille en trois sous familles, les *Alpha*, *Beta* et *Gammaherpesvirinae*. L'étude phylogénétique des séquences génomiques a confirmé cette subdivision (Roizman 1992). Les génomes de *Herpesviridae* présentent une forte diversité de longueur, la taille de leur génome variant de 125 à 230 kpb avec comme corollaire une diversité du nombre de gènes variant de 70 à 200 (McGeoch 1989, 1992, Roizman 1992). Certains gènes tels que la glycoprotéine B sont bien conservées chez les *Herpesviridae* et permettent des alignements de séquences autorisant la construction d'arbres phylogénétiques (voir figure 1).

Les *Herpesviridae* ont été découverts chez un large éventail de vertébrés et chez au moins un invertébré (l'huître). Les similitudes génomiques entre les herpès virus suggèrent leur évolution à partir d'un ancêtre commun. Dans les conditions naturelles, chaque virus est étroitement associé à une espèce hôte ou quelques espèces géographiquement et taxonomiquement proches. Il est certain que les quelques 120 espèces virales constituant actuellement la famille *Herpesviridae* ne représentent qu'une petite partie des virus de cette famille existants. La longue coévolution des virus de cette famille avec leurs espèces hôtes est attestée par la divergences de leurs séquences, leur faible pathogénicité pour l'hôte électif (contrastant souvent avec une forte pathogénicité pour d'autres espèces), la capture de gènes de l'hôte (gène de l'interleukine 10 de l'EBV, gènes de récepteurs de chémokines du CMV), et l'adaptation de nombreux gènes viraux (ou capturés chez l'hôte) permettant au virus de contourner les défenses immunitaires de l'hôte. Cette coévolution des *Herpesviridae* et des vertébrés est attestée par les correspondances entre les arbres phylogénétiques des virus des différents genres et l'arbre phylogénétique des espèces animales hôtes.

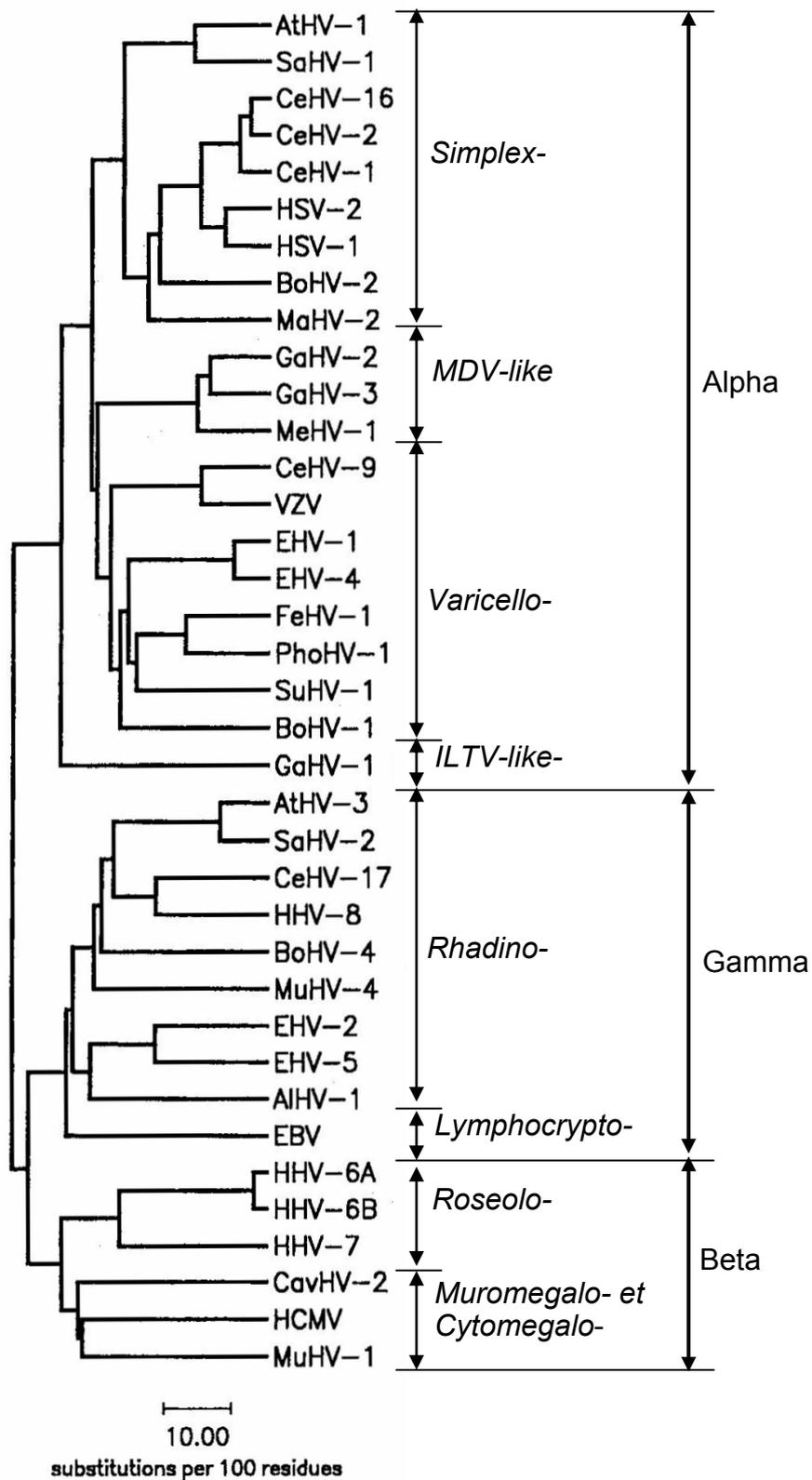


Figure 1 : Arbre phylogénétique des *Herpesviridae* aviaires et mammifères basée sur la glycoprotéine gB (Roizman)

3. Le virus CeHV-1, sa structure, son génome, sa variabilité.

3.1. Les caractéristiques structurales du virion.

Comme tous les *Herpesviridae*, le CeHV-1 qui appartient au genre *Simplexvirus*, tout comme les virus humains *Herpes simplex 1* et *2*, consiste en un nucléoïde renfermé dans une capsidie entouré d'un tégument lui-même enrobé dans une enveloppe.

- Le nucléoïde ou core, mesure 40 nm, et correspond à l'assemblage toroïdal de l'ADN viral et de protéines. Il montre une symétrie rotatoire et présente des fibres protéiques, sur lesquels est enroulé l'ADN viral, dont les extrémités sont ancrées à la surface interne de la capsidie. L'ADN viral est double brin et linéaire. Son poids moléculaire est d'environ $107 \pm 8,1 \times 10^6$ Da et sa taille de 156 789 paires de bases.
- La capsidie protéique, d'un diamètre de 100 nm environ, contient le nucléoïde. Elle est constituée de 162 capsomères, dont 12 pentamériques et 150 hexamériques et présente une symétrie icosaédrique.
- Le tégument, structure située entre la capsidie et l'enveloppe, est réparti de façon asymétrique autour de la nucléocapsidie.
- La structure la plus externe, l'enveloppe, confère une morphologie sphérique au virus. Elle présente l'apparence d'une bicouche lipidique trilamellaire typique des membranes cellulaires. Elle est en fait arrachée à la cellule hôte lors du bourgeonnement viral. Des glycoprotéines virales sont ancrées dans l'enveloppe formant de nombreuses protubérances ou spicules d'environ 8 nm. La taille des particules virales enveloppées peut varier de 160 à 180 nm.

Certaines capsides apparaissent vides, d'autres contiennent un nucléoïde dense aux électrons de forme toroïdale et correspondent à des nucléocapsides.

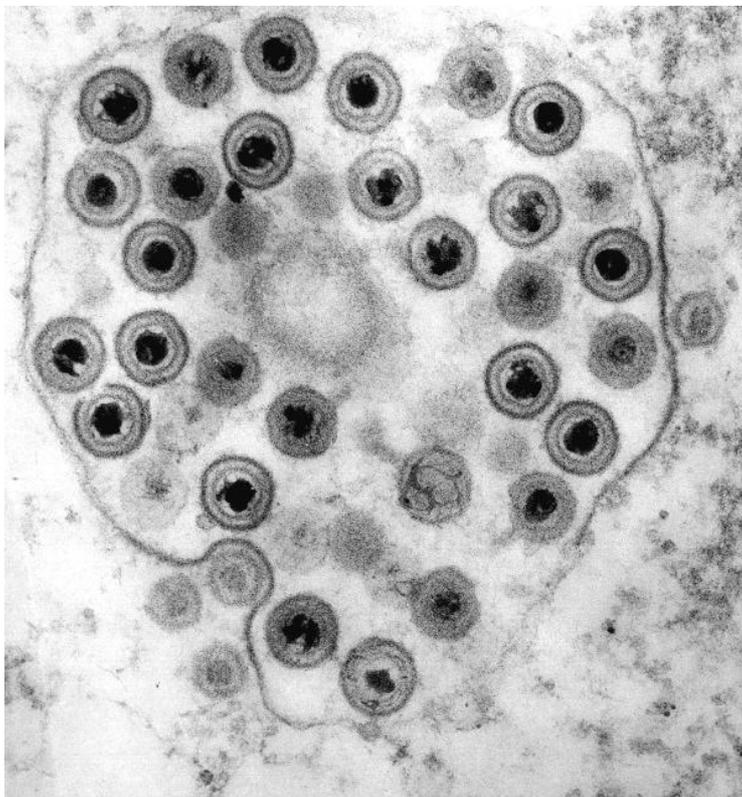


Figure 2 : Herpès simplex virus.

Coupe fine montrant des virions autour du noyau d'une cellule infectée. Grossissement approximatif x40000. Micrographie de F.A. Murphy, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis.

Le virus demeure viable dans la salive du singe, dans le tissu nerveux central et dans les cultures de cellules de rein de singe 7 jours à 37°C. Le virus est stable dans un milieu de culture cellulaire d'un pH 7,2 à 4°C pendant au moins 8 semaines et sur une longue période à -80°C sans chute significative du titre infectieux. Une congélation du virus à -20°C ou à -72°C induit une diminution du titre infectieux d'environ 2 log (Krech 1954).

Le pouvoir infectieux du virus requiert l'intégrité de l'enveloppe qui est très sensible à la dégradation par les solvants des lipides et par les solutions de détergents. Le virus est sensible également aux ultraviolets, à l'exposition à un pH acide ou basique, à l'hypochlorite de sodium 1% (eau de Javel dilué au 1/10), à l'éthanol à 70%, au glutaraldéhyde à 2%, au formaldéhyde. Par ailleurs le virus est inactivé par la chaleur (50-60°C pendant 30 minutes). En conclusion, la décontamination de tout matériel souillé par le virus est relativement aisée du fait de la fragilité du virus qui sera détruit par désinfection chimique ou par la chaleur (vapeur, incinération).

3.2. Le génome.

Perelygina et de ses collaborateurs (Perelygina, 2003), ont caractérisé pour la première fois la séquence complète du génome du CeHV-1 (156.789 paires de bases accessible dans Genbank

sous le numéro d'accès [NC_004812](#)) ce qui a permis l'analyse comparative avec les séquences des HSV humains de type 1 et 2 et facilite toutes les études génétiques et moléculaires menées sur le CeHV-1. La connaissance du génome facilite également l'analyse moléculaire des mécanismes physiopathologiques de l'infection animale ou humaine.

Le génome du CeHV-1 présente une longueur de 156.789 paires de bases. La taille des segments génomiques est comparable à celle des autres *Simplexvirus* exceptée la région RS, qui dans le génome du CeHV-1 est environ 1.5 kb plus longue (voir tableau 2). La table 2 présente une comparaison de la longueur et de teneur en G+C du CeHV-1, du HSV-1 et du HSV-2 par région génomique.

La composition en bases G+C du génome du CeHV-1 est de 74.5% contre 67-68% pour les virus herpès simplex humains (HSV). La composition en G+C est plus élevée dans toutes les régions du CeHV-1 en comparaison des HSV de type 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2). Le CeHV-1 démontre la teneur la plus élevée en G+C parmi les herpèsviridés connus. Cette grande richesse du génome en bases guanines et cytosines aura de fortes répercussions sur toutes les réactions de PCR tentées sur l'ADN viral. Tout d'abord la conception d'amorces spécifiques sera plus difficile en raison de la présence de nombreux enchaînements de guanines ou cytosines tout au long du génome viral mais aussi en raison de la haute température de fusion des deux brins de l'ADN viral (fort TM). L'adjonction de produits, comme la bétaïne, capables de favoriser la fusion des deux brins, est le plus souvent nécessaire (Hirano 2000).

En dehors de ces répercussions sur la manipulation *in vitro* du génome viral (PCR, séquençage), la richesse en G et C a pour conséquence une richesse en motifs CpG. Cette richesse est responsable de la forte affinité des fragments de génome viral pour le récepteur TLR9. Cette propriété fait que les virus du groupe herpès simplex sont parmi les virus les plus forts inducteurs de la synthèse d'interféron alpha par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Hochrein 2004, Lund 2003).

Tableau 2 : Comparaison de la taille et de la richesse en G+C des régions génomiques des virus CeHV-1, HSV-1 et HSV-2 (Perelygina, 2003)

Région	Virus	Taille (pb)	% G+C
UL	CeHV-1	107,815	72.9
	HSV-1	107,947	66.9
	HSV-2	109,689	68.9
US	CeHV-1	14,687	73.2
	HSV-1	12,980	64.3
	HSV-2	14,329	66.2
TRL	CeHV-1	9,021	79.4
	HSV-1	9,912	71.6
	HSV-2	9,297	74.4
TRS	CeHV-1	8,234	80.4
	HSV-1	6,677	79.5
	HSV-2	6,711	80.1
Génome entier	CeHV-1	156,789	74.5
	HSV-1	152,261	68.3
	HSV-2	154,746	70.4

Tous les gènes du CeHV-1 sauf un (UL53A) présentent une homologie de séquence et sont les orthologues de gènes identifiés dans les génomes des virus humains HSV-1 et HSV-2. Ces gènes ont reçu la même dénomination. L'annexe 1 récapitule leur emplacement dans le génome, les tailles prévues, les pourcentages d'identités avec les produits des gènes de HSV-1 et HSV-2 correspondants et leurs caractéristiques et fonctions prédites. Le gène UL53A n'a pas d'équivalent dans les virus humains. Dans le génome du CeHV-1 on retrouve soixante-douze gènes en copie unique, tandis que deux gènes, ICP0 et ICP4 sont dupliqués. Bien que ces deux gènes soient dupliqués en totalité, il n'existe pas aujourd'hui de donnée expérimentale permettant d'affirmer que les deux copies de ces gènes sont fonctionnelles (Perelygina 2003).

3.3. Les protéines virales.

Les protéines du CeHV-1 ont été caractérisées par des techniques classiques (Western blot en particulier) avant que la connaissance du génome viral ne permette l'étude de leur structure primaire. L'identification structurale et fonctionnelle des protéines du CeHV-1 a été déduite de la comparaison avec les protéines homologues des virus herpès simplex humains (voir annexe 1). L'étude fonctionnelle de ces protéines n'étant connue que par analogie avec les travaux menés sur les Herpès simplex humains nous renvoyons le lecteur à des revues générales sur la description fonctionnelle de ces protéines. Nous ne détaillerons ici que la comparaison des protéines du CeHV-1 avec celles des herpes simplex humains.

L'identité de séquence en acides aminés entre les polypeptides du CeHV-1 et des HSV varie de 30% (US5) à 87.5% (UL15). Des niveaux semblables de conservation ont été décrits pour

les protéines homologues dans beaucoup d'autres virus herpès de mammifères.

Les séquences protéiques suivantes sont parmi les plus conservées entre les herpès simplex humains et le CeHV-1 du macaque :

- les protéines de clivage et d'empaquetage de l'ADN (UL15, UL28, UL32, et UL33) ;
- les protéines de capsid (UL18, UL19, et UL38) ;
- les protéines concernées dans la réplication de l'ADN (UL2, UL5, UL29, et UL30) ;
- la glycoprotéine B, qui est parmi toutes les glycoprotéines d'enveloppe la plus conservées de toutes.

Les trois séquences protéiques les moins conservées dans le CeHV-1 sont US4 (glycoprotéine G), US5 (glycoprotéine J) et US12 (protéine ICP47).

Les protéines du CeHV-1 peuvent être divisées en trois groupes selon leur degré de similitude aux protéines du HSV-1 ou du HSV-2. Le plus grand groupe (46 protéines) montre une plus grande similitude aux protéines du HSV-2, ce sont par exemple les protéines de clivage et d'empaquetage d'ADN. Le deuxième groupe (20 protéines) comprenant les protéines de capsides entre autres, montre des niveaux plus élevés de similitude aux protéines du HSV-1. Le troisième groupe, est constitué de sept protéines qui diffèrent très peu de leurs homologues chez les HSV-1 ou HSV-2. Les HSV humains présentent un tropisme préférentiel pour une région donnée chez l'homme, en effet le HSV-1 présente un tropisme buccal et cutané préférentiel alors que le HSV-2 est en général inféodé aux muqueuses génitales. Or le CeHV-1, qui présente de grandes similitudes avec chacun des deux virus humains, présente quant à lui une affinité identique pour les muqueuses buccales, génitales. Les protéines qui conditionnent chez l'homme le tropisme du HSV-1 pour les muqueuses oro-faciales et le tropisme du HSV-2 pour les sites génitaux restent inconnues. Dans ce contexte, il faut remarquer que suivant les protéines, la plus forte similitude entre CeHV-1 et les Herpès simplex humains est observée soit avec le HSV-1 soit avec le HSV-2. Ces propriétés hybrides du CeHV-1 soulèvent par ailleurs beaucoup de questions au sujet d'évolution des virus du genre *Simplexvirus* (Perelygina, 2003).

Depuis la caractérisation du génome du CeHV-1, il a été remarqué que ce virus comme le HSV-2, est dépourvu de quatre gènes spécifiques du HSV-1 sont UL20.5, γ_1 34.5, UL43.5 et UL27.5 (Chang 1998, Randall 1997, Ward 1996, Ward 2000).

Nous insisterons sur le gène γ_1 34.5 (RL1) du HSV-1, car il est reconnu comme un facteur de neurovirulence du HSV-1 chez la souris. L'absence du gène γ_1 34.5 a été confirmé dans toutes les souches de CeHV-1 y compris une souche issue d'un isolat clinique obtenu post-mortem chez un patient humain décédé d'une encéphalite herpétique due au CeHV-1 (Davenport, 1994). On connaît deux activités fonctionnelles à la protéine ICP34.5 (infected-cell protein

34.5) facteur de neurovirulence codé par le gène $\gamma_134.5$ du HSV-1 (Chou 1995, 1990a, 1992, 1994, 1990b, Taha 1989, Thompson 1989). Le domaine carboxylique-terminal, conditionne l'inhibition de l'effet antiviral de la protéine kinase R (PKR). L'expression de cette protéine est induite par l'interféron alpha lui-même synthétisé après activation par le virus du TLR9, TLR7 et TLR8. L'activation de la PKR entraîne la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α et par conséquent l'interruption des synthèses protéiques dans les cellules infectées et donc également de la réplication virale. Or ICP34.5 se lie à une phosphatase cellulaire pour déphosphoryler le facteur eIF2, contrecarrant les effets de la PKR (Chou 1995, Chou 1994, Chou 1992, He 1997, Lieb 2000). Une autre fonction, dépend des domaines amino-terminal et carboxylique-terminal de la ICP34.5, permet au virus de se multiplier efficacement dans les systèmes nerveux centraux et périphériques de souris expérimentalement infectées (Chou 1990, Taha 1989). La délétion du gène $\gamma_134.5$ du HSV-1 entraîne la suppression de la neurovirulence des souches de HSV-1 hautement neurovirulentes chez la souris. En l'absence du gène homologue au $\gamma_134.5$ du HSV-1, le caractère neuropathogène important du CeHV-1 chez l'homme mais également chez les singes du nouveau monde et le lapin doit donc dépendre d'autres gènes encore inconnus (Melnick 1954, Sabin 1934).

Il a été démontré également deux différences principales de séquence entre le CeHV-1 et les HSV-1 et -2 :

- Par rapport aux virus HSV-1 et 2, la région RS du CeHV-1 contient une séquence d'environ 1.5kb supplémentaire entre le S terminus et l'homologue du gène ICP4, alors que la région de RL est plus courte dans le CeHV-1 et est dépourvue des régions flanquant le gène ICP0 dans le génome des HSV. Cependant, dans les zones additionnelle ou manquante, aucun gène potentiel n'a pour l'instant été identifié (Perelygina, 2003).
- Précédemment, nous avons déjà signalé que le génome du CeHV-1 renferme un gène sans équivalent dans les génomes des HSV1 et 2. Il s'agit en fait d'un gène potentiel identifié par analyse informatique dans la région UL du CeHV-1 sur le brin complémentaire (positions 112186 à 112495 et 112755 à 113344). Il comporterait deux exons (UL53A) et montre une configuration d'utilisation de codons compatibles avec ceux des autres gènes du CeHV-1. La protéine déduite du gène UL53A serait une protéine hydrophile (pI 11.9) avec une composition en acides aminés riche en résidus proline et arginine. Les 21 premiers résidus correspondraient à un peptide signal et les résidus 222 à 240 à un domaine transmembranaire sans pour autant que cela permette de classer avec certitude cette protéine comme protéine de membrane. Il a été

montré une similitude de séquence avec des domaines de trois protéines neuronales codées par des gènes de mammifères : la molécule neuronale NCAM-180, la *calcineurin inhibitor cabin 1* et la sous unité $\alpha 1A$ du canal à calcium du cerveau (Perelygina, 2003). Il demeure à démontrer que la protéine codée par ce gène prédit est réellement produite et qu'elle joue éventuellement un rôle dans la neurovirulence du CeHV-1 chez certains hôtes particuliers.

En conclusion, il existe une grande similitude entre les protéines du CeHV-1 et celles des virus herpès simplex humains. Cette similitude est le miroir moléculaire des similitudes observées entre les maladies humaines induites par les HSV et la maladie induite par le CeHV-1 chez le macaque. Les différences observées entre les différentes maladies font s'interroger sur les bases moléculaires du tropisme électif de ce virus pour certains territoires cutanéomuqueux. Par ailleurs, les bases moléculaires de la restriction du pouvoir infectieux à certains espèces hôtes reste à identifier (voir plus loin). En effet, il ne semble pas, que les macaques soient naturellement sensibles à l'infection par les herpes simplex humains et le CeHV-1 semble peu infectieux pour l'homme (voir partie 4. de ce chapitre). Par ailleurs les bases moléculaires de la neurovirulence du CeHV-1 chez ses hôtes non naturels, comme l'homme, les singes d'Amérique du Sud et le lapin demeurent inconnues.

3.4. La variabilité génétique du CeHV-1.

Comme nous l'avons vu dans l'historique de la découverte du CeHV-1 décrit dans le chapitre 1, l'existence de différents génotypes de CeHV-1 était soupçonnée depuis la fin des années 1980. Les études menées par Wall *et al.* à cette époque, sur vingt isolats de CeHV-1 provenant de singes adultes de deux espèces différentes (rhésus et crabier), ont permis de différencier, par l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction issus de l'ADN viral, les souches de CeHV-1 infectant des macaques crabiers de celles infectant des macaques rhésus (Wall 1989). Cette variabilité génétique amena alors à envisager qu'il pouvait exister différents génotypes de CeHV-1 inféodés aux différentes espèces. C'est à partir de ces constatations, et sur la base de l'implication quasi systématique de macaques rhésus dans les différents cas de contamination humaine, qu'il a été envisagé que les variétés CeHV-1 retrouvées chez les macaques rhésus soient plus virulentes pour l'homme que celle retrouvée chez les macaques crabiers.

Plus récemment afin de confirmer ces différences entre les souches de CeHV-1 isolées chez différentes espèces de macaque, Smith *et al.* ont étudié les séquences de US4 à US6 et de UL27 obtenues dans le génome de onze isolats de CeHV-1 différents. Quatre de ces isolats provenaient de macaques rhésus (*Macaca mulatta*), trois de macaques crabiers (*Macaca*

fascicularis), deux de macaques à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) et deux de macaques japonais (*Macaca fuscata*). La comparaison de ces séquences avec celles de l'herpès virus papio 2 et montre que toutes les séquences de ces isolats étaient regroupées sur une même branche dans l'arbre phylogénétique. Au sein de ce groupe il existait trois sous-groupes distincts. Les trois groupes de CeHV-1 dénommés A, B et C dans la figure 1 referment respectivement :

- le groupe A toutes les séquences correspondant aux virus de macaques rhésus et de macaques japonais, ainsi qu'une séquence de virus découvert dans une culture de cellules de rein de macaque crabier (souche 9400371).
 - le groupe B deux virus de macaques crabiers,
 - le groupe C un groupe d'isolats issus de macaques à queue de cochon (voir figure 1).
- Cette étude démontre donc l'existence de différents génotypes de CeHV-1 inféodés aux différentes espèces hôte de macaque (Smith 1998).

On note qu'en dehors de l'exception constituée par la souche 9400371, toutes les séquences de virus inféodés à une espèce donnée forment dans l'arbre un groupe homogène. La séquence discordante de macaque crabier a été interprétée par les auteurs comme une contamination *in vitro* de la culture de cellules de rein de macaque crabier par un virus provenant d'un macaque rhésus (ou de culture de cellules de macaque rhésus). Cependant il est possible que le macaque crabier ait été infecté *in vivo* par un virus provenant d'un macaque rhésus. Il faut en effet noter que dans certaines zones d'Asie du Sud-est (Cambodge, Vietnam, Laos), les aires de répartitions du macaque crabier et du macaque rhésus se recouvrent (voir les cartes en annexe 3).

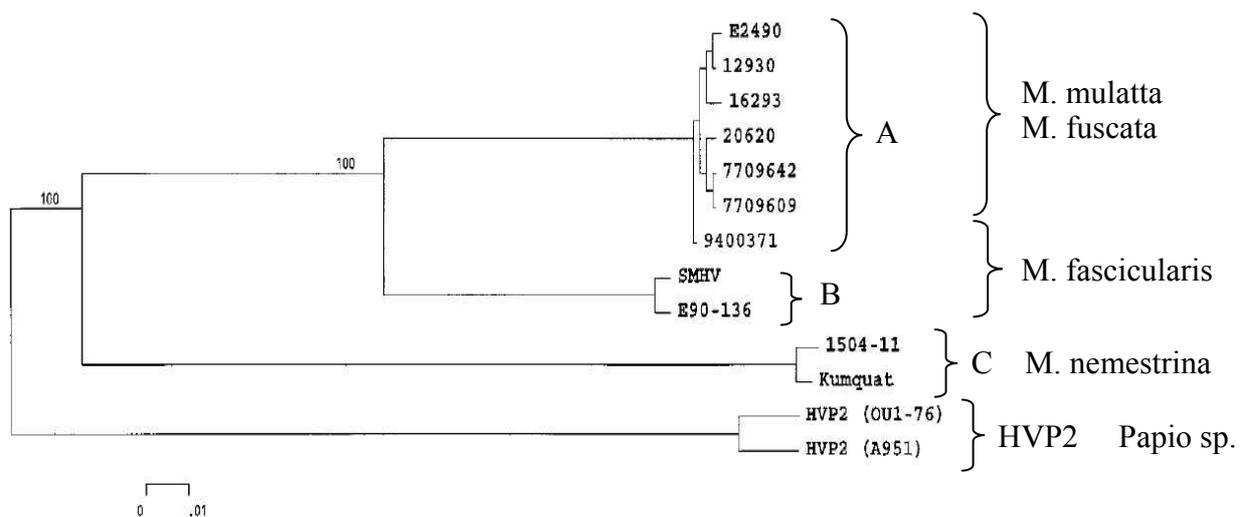


Figure 3 : Analyse phylogénétique des séquences codantes US4, US5, US6 (Smith 1998)

Dans ce contexte il faut remarquer que la proximité phylogénétique des virus du macaque du Japon avec les virus du macaque rhésus n'est pas surprenante puisque le *Macaca fuscata* a dérivé récemment du *Macaca mulatta*. Il est donc probable que les macaques qui ont envahi l'archipel Nippon ont emporté avec eux le virus qui sévit de nos jours au Japon.

En conclusion, jusqu'à présent le nombre de séquences virales étudiées a été faible et les sources géographiques des animaux infectés ne sont pas décrites. Ce dernier point est crucial car les aires de répartition de chaque espèce sont vastes et les études de génétique des populations ont permis de démontrer que pour une espèce donnée les populations sont souvent très distantes sur le plan génétique laissant supposer que leur séparation est souvent ancienne (près de 400.000 ans entre deux populations de macaques crabiers telles que la population des Philippines et celle du Vietnam, sources : Blancher, soumis en 2006). Chez le macaque rhésus les études du polymorphisme de l'ADN mitochondrial et celle du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) démontrent que les populations de macaque rhésus (Chine, Vietnam, Inde) sont elles aussi très distantes phylogénétiquement (Doxiadis 2003). Au total il est très possible que ces diverses populations soient porteuses de souches virales différenciées puisqu'elles ont pu diverger dans les populations séparées pendant de longues périodes (de 2 millions d'années pour les *M. mulatta* d'Inde et de Chine à 0,4 millions d'années pour le *M. fascicularis*). Ainsi à l'heure actuelle aucune étude exhaustive des différentes souches qui pourraient être inféodées aux diverses populations de macaques rhésus, crabiers ou à queue de cochon n'a été produite ; une telle étude serait pourtant essentielle. En effet, les populations humaines où vivent ces diverses populations de macaque sont régulièrement et naturellement exposées à des contacts avec les macaques et les blessures ne sont pas rares. Or les encéphalites humaines par transmission du CeHV-1 paraissent suffisamment rares pour n'avoir jamais été décrites dans ces pays. On ne peut pas évoquer le faible niveau de médicalisation de certains de ces pays (Japon, Vietnam et Inde) qui aurait pu faire ignorer ces contaminations. Au Japon, le taux de sérologie positive chez les macaques adultes est d'environ 80% (Nakamura communication personnelle au Pr. Blancher). De façon remarquable malgré cette forte infection, les macaques vivent à proximité des hommes et dans certains lieux très visités par les touristes où les griffures et morsures ne sont pas rares. Là encore, malgré un niveau médical d'une qualité indiscutable, aucun cas de zoonose avec encéphalite chez l'homme n'a été rapporté jusqu'à présent. C'est dire que dans le contexte naturel l'infectiosité du CeHV-1 pour l'homme doit être très faible voire nulle.

Il est donc clair qu'il existe différents génotypes de CeHV-1 au sein de la population de macaque répartis suivant les espèces de macaque. Cependant actuellement il n'existe aucune preuve scientifique en faveur d'une corrélation entre la virulence des différentes souches virales, vis-à-vis de l'homme ou de l'animal, et leur génotype. Dans le doute, et en l'état

actuel des connaissances, la gestion du risque infectieux liée à la manipulation des macaques, de leurs fluides ou de leurs tissus devra donc être la même que l'espèce de macaque soit le rhésus ou une toute autre espèce.

Dans le milieu naturel en cas de côtoiement de deux espèces, un même virus peut se retrouver dans deux espèces différentes. D'autant qu'un animal d'une espèce de macaque donnée peut tout à fait s'être contaminé au près d'un membre d'une autre espèce.

Dans le cas des zoos et animaleries de primates, le côtoiement d'espèces de primate d'origines diverses peut amener à des contaminations d'une espèce de macaque par une souche de CeHV-1 qu'elle ne côtoie pas dans la nature. Il faut surtout noter que d'autres espèces de primates que les macaques peuvent, dans ce contexte, être contaminées par le virus, en particulier les singes du nouveau monde chez lesquels le virus est pathogène avec des méningo-encéphalites mortelles.

3.5. Les autres virus du genre *Simplexvirus* chez les primates.

Dans ce genre *Simplexvirus*, un groupe de virus constitué des herpès simplex 1 et 2, du CeHV-1, du SA8, de l'herpesvirus papio 2 et du virus récemment isolé chez le chimpanzé, le *Chimpanzee herpesvirus* ou ChHV (Luebcke 2006) est phylogénétiquement très lié (voir figure 4).

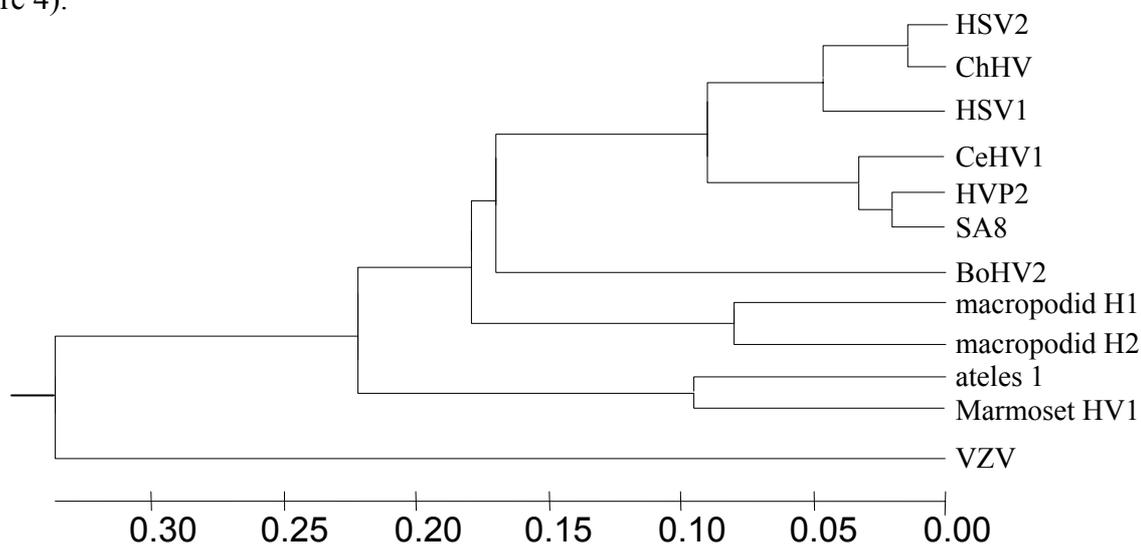


Figure 4 : Relation phylogénétique des *Simplexvirus*.

Arbre phylogénétique construit à partir des séquences publiées de la glycoprotéine B chez les différents virus du genre *Simplexvirus* en prenant pour référence le virus varicelle-zona humain (HSV1 et HSV2 désignent respectivement les Herpes Simplex Virus 1 et 2, ChHV désigne le *Chimpanzee herpesvirus*, HVP2 désigne l'herpès virus papio 2 ou CeHV-16 et SA8 désigne le Simian agent 8 ou CeHV-2, BoHV2 désigne le *Bovine herpesvirus 2*, macropodid H1 et H2 désignent les *Macropodid herpesvirus 1* et 2, ateles 1 désigne l'*Ateline herpesvirus 1* et VZV désigne le virus varicelle-zona humain ou HHV-3).

Ce lien phylogénétique très fort entre ces différents virus se retrouve au niveau antigénique. Ainsi l'herpès virus papio 2, virus inféodé au babouin, aura été longtemps confondu avec le SA8, inféodé au singe vert africain, ou avec le CeHV-1, inféodé aux macaques asiatiques.

En réalité ces trois virus sont très proches phylogénétiquement (voir figure 4) et très voisins sur le plan de leurs propriétés antigéniques. Dès son isolement en 1958, le SA8 fut relié au CeHV-1 grâce à la relation antigénique étroite qu'ils montrèrent lors de tests de séroneutralisation. La forte similitude antigénique entre ces virus a rendu difficile la caractérisation sérologique de ces virus. Il a fallu attendre la caractérisation moléculaire pour découvrir chez le singe vert africain ce que l'on avait initialement identifié, par sérologie, comme une infection par le CeHV-1 était en fait un virus proche qui leur est inféodé (Palmer 1987). L'étude de la séquence de ce virus, appelé depuis SA8, démontre qu'il s'agit d'un virus apparenté sur le plan phylogénétique. Cependant la publication de la séquence complète du virus SA8 (Tyler 2005) a révélé que les différences sont trop importantes avec le CeHV-1 pour qu'il s'agisse d'un simple variant du virus CeHV-1. De même, on pensait initialement que les babouins étaient infectés par le CeHV-1. La découverte du virus SA8 du singe vert africain a fait alors suspecter que cette souche virale africaine pouvait aussi infecter les babouins. Ce n'est que l'étude récente du génome d'un virus isolé chez le babouin qui a permis de révéler de claires différences entre les virus CeHV-1, SA8 et ce que l'on appelle depuis sa caractérisation, herpès papio 2 (Eberle 1995). Depuis la séquence complète du génome du virus herpès papio 2 a été caractérisée (Tyler 2006)

En dehors des *Cercopithecinae*, la sérologie a permis de révéler dans d'autres espèces de primates la présence d'anticorps capables de réagir avec les virus humains HSV1 et HSV2 (Hilliard 1989, Sakulwira 2002, Heldstab 1981, Landolfi 2005). Fait remarquable, parmi tous les singes phylogénétiquement les plus proches de l'homme (chimpanzé, gorille, orang-outang, gibbon), seule une espèce semble indemne de toute infection par les virus du genre herpes simplex : l'orang-outang (Hilliard 1989) (voir plus loin pour plus de précisions). L'autre hypothèse serait que les virus herpes simplex inféodés à cette dernière espèce seraient antigéniquement trop éloignés des virus humains pour que le dépistage des anticorps qu'ils suscitent chez l'orang-outang soit détectés par les tests ELISA qui utilisent des antigènes de HSV-1/HSV-2.

Jusqu'en 2005 chez le chimpanzé, les tests ELISA compétitifs avaient permis de penser que le virus du chimpanzé était plus proche de HSV-2 que de HSV-1 (Hilliard 1989). Des résultats similaires ont été retrouvés chez des gorilles (Eberle 1992). D'autre part l'isolement des gorilles étudiés par Eberle *et al.* permettait d'écarter toute possibilité de contamination de ces

animaux par l'homme. De plus, tant chez le chimpanzé que chez le gorille, le mode de transmission du HSV-2 rend improbable l'hypothèse d'une transmission de l'homme vers l'animal. Tous ces arguments ont amené les auteurs à évoquer l'existence de virus du genre herpes simplex différents de HSV-1 ou HSV-2 et inféodés à chaque espèce de grand singe (chimpanzé, gorille) ou bien inféodés au gibbon en Asie. Cependant, la caractérisation moléculaire de tous ces virus animaux demeure à réaliser en dehors du virus du chimpanzé dont la séquence génomique vient d'être partiellement caractérisée (Luebcke 2006). Rien n'est connu pour l'instant de sa capacité à infecter l'homme voir d'autres espèces de primates (macaques, singes du Nouveau Monde etc.).

Il semble donc que l'inventaire des virus du genre *Simplexvirus* inféodés aux primates ne soit que très partiel. La forte proximité antigénique de ces virus rend précaire leur identification sérologique. Seule l'étude des séquences de génome entier permet de caractériser définitivement les différents espèces virales.

4. Nature et origine des barrières d'espèce des virus du genre *Simplexvirus* chez les primates

Le fait que chaque herpès virus ne soit inféodé qu'à une seule ou quelques espèces hôtes et leur très grande adaptation à ces espèces hôtes suggère donc qu'il puisse exister de fortes barrières d'espèce. Ces barrières d'espèce ne sont cependant pas totale, il existe ainsi des cas d'infection d'individus d'une espèce donnée par un herpès virus inféodé à une autre espèce, comme par exemple les cas d'infection humaine par le CeHV-1.

*4.1. Les infections d'espèces de primates non humains par des virus humains du genre *Simplexvirus**

Les transmissions naturelles des herpès virus entre les humains et les animaux sont rares. En effet cette transmission nécessite des contacts étroits et réguliers entre le contaminant et le contaminé. Des contacts étroits sont nécessaires en raison de la grande fragilité des virions dans le milieu extérieur et ces contacts doivent être réguliers car les hôtes des herpès virus ne sont excréteurs qu'à l'occasion des récurrences virales.

Il est toutefois important de noter que les individus infectés par les herpès virus seront porteurs à vie de ces virus et pourront présenter tout au long de leur existence des récurrences virales régulières. De plus la susceptibilité *in vitro* des cellules de nombreuses espèces à différents herpès virus d'autres espèces est bien connue.

Les herpès virus humains peuvent infecter de nombreux primates non humains. Ainsi, en

captivité, il a été rapporté des cas d'infection souvent fatale par le HSV-1 chez des grands singes anthropomorphes, des singes Douroucouli, des gibbons, des lémurs, des tupaïes et des mouffettes.

L'épidémie la plus importante à HSV-1 chez des primates non humains a été enregistrée par Melendez *et al.* en 1969. Une colonie de 50 singes Douroucouli (*Aotus trivirgatus*) a été transportée de Barraquilla en Colombie à destination du National Center of Primate Biology de Davis, Californie. Dans un délai de 2 semaines suivant leur arrivée, 30 animaux étaient morts puis 15 animaux de plus dans les 4 semaines suivantes. Les animaux ont présenté des symptômes de type coryza, une conjonctivite et de la léthargie. Un herpès virus simplex humain a été isolé en post-mortem dans les yeux, le nez, les orifices anaux et le foie.

Une famille de trois Saki à tête pâle (*Pithecia pithecia*) est décédée en 24–96 heures après les premiers signes cliniques observés, le jeune décéda en l'espace de 24 heures, la femelle en 48 et le mâle en 4 jours. Les animaux ont présenté de l'anorexie, du jetage nasal, de l'hyperthermie ainsi que des ulcérations dans la cavité buccale. Les lésions observées post-mortem comprenaient des ulcères oraux et oesophagiens, de la nécrose hépatique et intestinale, une méningo-encéphalite avec nécrose neuronale sporadique. Le HSV-1 a été identifié comme agent étiologique de la maladie par isolement du virus, PCR, ou hybridation *in situ* dans la langue, le foie et le sérum de chacun des trois animaux (Schrenzel 2003).

D'autres études ont également rapporté des cas d'encéphalite à HSV chez des gibbons (Emmons 1970, Ramsay 1982). Il a enfin été rapporté des infections fatales à HSV chez d'autres primates comme des dermoptères (lémurs) (Kemp 1972) et chez des animaux appartenant à des groupes phylogéniques proches des primates comme des tupaïs (musaraigne arboricole) (McClure 1972).

Des singes rhésus, hôtes naturels du CeHV-1, sont traditionnellement considérés réfractaires à l'infection par les HSV-1 et -2 humains même au décours d'inoculations expérimentales. Il a été possible de démontrer un effet cytopathique local lors d'une infection expérimentale mais l'augmentation des titres de HSV-2 utilisés expérimentalement n'induit pas de maladie généralisée ou de morbidité détectable (Skinner 1982). Il s'avérerait donc que des macaques rhésus puissent être infectés par HSV2 avec l'induction d'une lésion locale autolimitatrice ; ce qui est compatible avec l'observation *in vitro* d'une croissance limitée des herpès virus simplex humains de type 1 et 2 dans diverses lignées de cellules de macaques rhésus (Yamada 1983). Dans les conditions normales, les macaques rhésus ne peuvent pas contracter le HSV-1 et le HSV-2 au contact de l'homme.

Chez les grands singes anthropomorphes, il a été décrit de nombreuses infections naturelles par différentes souches de virus d'herpès simplex humains. C'est le cas chez les deux espèces de chimpanzé (*Pan paniscus* et *Pan troglodytes*) (McClure 1980) ainsi que chez le gorille des plaines de l'ouest (*Gorilla gorilla gorilla*) (Heldstab 1981). On a longtemps cru que les chimpanzés et les gorilles aient pu être infectés par le HSV-2 humain en raison de la présence dans leur sérum d'anticorps spécifique de ce dernier virus. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, il apparaît peu probable que ces animaux puissent être infectés naturellement par ce virus d'origine humaine. Ces animaux seraient en réalité infectés par un virus du genre *Simplexvirus* qui leur serait spécifique. Chez le chimpanzé ceci vient d'être confirmé récemment par la découverte d'un alphaherpèsvirus inféodé à cette espèce, le ChHV (Luebcke 2006). On soupçonne également la présence d'un virus homologue chez le gorille (Luebcke 2006).

Le seul grand singe anthropoïde qui semble réfractaire à l'infection par les alphaherpèsvirus est l'orang-outang. En effet les quelques études de séroprévalence menées chez les orangs-outangs pour les herpès virus de type herpès simplex montrent que cette espèce est la seule espèce de grand singe qui soit séronégative pour les alphaherpèsvirus (Eberle 1989). L'orang-outang ne posséderait donc pas d'herpès virus du genre *Simplexvirus* spécifique et ne serait pas non plus sensible à l'infection par les alphaherpèsvirus inféodés à d'autres espèces, comme l'homme.

Il est clair que dans les espèces naturellement infectées par les virus du genre simplex, les maladies graves sont exceptionnelles. Par contre, Le passage d'un virus à une autre espèce entraîne souvent des maladies sévères. Les maladies induites par les virus humains chez les autres primates vont de l'infection quasi asymptomatique, comme dans le cas du gorille ou du chimpanzé, à une méningo-encéphalite mortelle chez certains singes du Nouveau Monde. La faible pathogénicité des HSV chez l'homme est le reflet de leur adaptation à l'espèce hôte naturelle. On voit clairement l'homologie avec le portage le plus souvent asymptomatique du CeHV-1 chez les macaques et maladie sévère observée lors d'une infection humaine par ce virus animal.

4.2. Les infections humaines par des virus d'espèces de primates non humaines du genre *Simplexvirus*.

Le CeHV-1 est actuellement le seul herpès virus de primates non humains connu pour être pathogène pour l'homme. Ainsi comme indiqué dans le chapitre 1, le premier cas d'infection humaine par le CeHV-1 a été décrit en 1932 après le décès du docteur W.B. des suites d'une encéphalomyélite, après que celui-ci ait été mordu par un macaque rhésus. Depuis une quarantaine de cas de maladie humaine due au CeHV-1 ont été rapportés, le taux de mortalité

observé dépassant les 75% en l'absence de traitement. Les modes de transmission du virus à l'homme sont variés mais la voie traumatique par morsure ou griffure est la plus fréquemment décrite. Le virus est présent de manière endémique chez les macaques des régions d'Asie du Sud-Est. La contamination de l'homme par le CeHV-1 provenant des macaques peut induire une maladie grave et le plus souvent fatale par méningo-encéphalite. On retrouve ici une homologie avec ce qui a pu être observé chez des singes du Nouveau Monde dans le cas d'infection par le virus HSV-1.

Il est toute fois intéressant de noter que le nombre de cas de transmission interspécifique, de l'animal vers l'homme, est là encore très faible (voir page 34). D'après une étude sérologique poussée (détaillée plus loin), il apparaît également qu'il n'y ait pas d'infection asymptomatique par le CeHV-1 chez l'homme (Freifeld 1995), renforçant le caractère exceptionnel des circonstances de l'infection humaine par le CeHV-1.

Il est important de noter également que seul le CeHV-1 a été rapporté pour être pathogène pour l'homme et cela exclut donc le SA8 et l'herpès virus papio 2, pourtant les deux virus les plus proches phylogénétiquement du CeHV-1. Ces deux virus sont inféodés à des espèces de singes d'Afrique, respectivement le singe vert africain et le babouin. Il n'a en effet jamais été rapporté de cas d'infection humaine par les virus SA8 et herpès papio 2. Il doit donc exister une particularité propre au CeHV-1 qui expliquerait sa virulence chez l'homme. Le fait qu'aucun cas n'est été rapporté n'exclut cependant pas que ces deux virus ne puissent pas être pathogènes pour l'homme dans certaines conditions.

La transmission naturelle des herpès virus entre l'humain et les autres espèces de primates est peu fréquente. Il apparaît donc que la contagiosité de l'homme à l'animal ou de l'animal à l'homme soit faible par rapport aux contaminations potentielles, mais lorsque cette contamination à lieu, l'infection qui en découle est en général grave voire fatale pour l'hôte occasionnel.

La transmission des herpès virus entre les mammifères nécessite donc des contacts étroits entre l'animal excréteur et le contaminé en raison principalement de la fragilité des virions. Cependant cela n'explique pas totalement la rareté des transmissions interspécifiques des herpès virus et en particulier du CeHV-1. En effet chez les hôtes naturels des herpès virus, le portage latent systématique du virus et les récurrences chez les sujets contaminés amènent à de très fréquentes contaminations intraspécifiques montrées par la séroprévalence de ces infections (70% chez l'homme pour l'herpès simplex de type 1, plus de 80% chez le macaque dans la nature pour le CeHV-1). Or les accidents potentiellement contamineurs, morsures ou griffures, sont nombreux entre les hommes et les macaques par exemple. Il existe donc une apparente contradiction entre les possibilités de contaminations interspécifiques et le nombre de contaminations réellement observées.

Une étude sérologique a été menée à la suite de quatre cas d'infection humaine par le CeHV-1 en Floride, cette étude impliquant 159 personnes potentiellement exposées au virus n'a pas permis de découvrir de nouveaux cas d'infections humaines passées inaperçues sur le plan clinique, ni par culture du virus, ni par recherche sérologique en utilisant un test ELISA compétitif (Holmes 1990). De même suite à l'infection par le CeHV-1 de trois employés d'une même animalerie du Michigan, la présence d'anticorps dirigés contre le CeHV-1 ont été recherchés par Western blot et ELISA compétitif chez 119 employés de cette même animalerie, tous à l'exception des trois malades étaient séronégatifs (Davenport 1994). Enfin une étude de séroprévalence chez des animaliers en contacts de primates a mis en évidence l'absence totale de personne séropositive pour des anticorps spécifiques du CeHV-1 (recherchés dans le sérum des individus par Western blot et ELISA compétitif) mettant en évidence l'absence de contamination asymptomatique par le CeHV-1 (Freifeld 1995).

Les auteurs ont ici utilisé une technique ELISA compétitif associée le plus souvent au Western blot ce qui laisse penser que leurs tests sérologiques étaient spécifiques. Dans le cas contraire, près de 70% des adultes testés auraient été séropositifs car infectés par les HSV humains.

Une étude menée à Bali en Indonésie, zone de très forte endémie d'herpès virose B chez les macaques, a montré que parmi 105 personnes ayant été en contact avec des macaques, 30% avaient été mordus au moins une fois et près de 50% avaient déjà été mordus ou griffés par un macaque. Une étude sérologique menée chez les macaques responsables des morsures rapporta que 25% des juvéniles et 100% des adultes étaient séropositifs pour le CeHV-1 pour une séroprévalence totale de la population de macaques de plus de 80%. Pourtant aucun cas de l'infection CeHV-1 humaine n'a été enregistré à Bali (Engel 2002).

Toutes ces études suggèrent que l'infectiosité du CeHV-1 chez l'homme serait relativement faible. Les modalités de transmission efficace du CeHV-1 à l'homme ne sont donc pas clairement identifiées, ni surtout les phénomènes qui amènent à une infection grave chez l'homme. Cependant, on pourrait émettre une autre hypothèse qui serait que l'infectiosité du CeHV-1 chez l'homme n'est pas si faible mais la présence d'anticorps anti-HSV-1/2 chez l'homme rend difficile la détection d'anticorps spécifiques de CeHV-1. Il existerait dans cette hypothèse des formes cliniques asymptomatiques de la maladie chez l'homme. Il est donc difficile à l'heure actuelle de connaître la séroprévalence pour le CeHV-1 dans les populations humaines à risque (manipulateurs au quotidien d'animaux infectés)

4.3. Contournement des barrières d'espèce des virus du genre *Simplexvirus* chez les primates.

Il a été démontré à de nombreuses reprises que les singes du Nouveau Monde pouvaient s'infecter tant expérimentalement que accidentellement par le CeHV-1 s'ils étaient mis en contact direct ou indirect avec des macaques d'origine asiatique porteurs du virus (nous invitons le lecteur à se reporter au chapitre 3 pour plus de détails). Dans la nature, si les singes d'Amérique du sud ne sont pas infectés par le CeHV-1 c'est qu'ils ne sont jamais en contact avec lui du fait de la barrière géographique infranchissable. Leur sensibilité au virus en captivité fait conclure que ces animaux, pourtant assez éloignés phylogénétiquement de l'hôte naturel du CeHV-1, possèdent bel et bien les récepteurs indispensables à l'infection virale. Cela n'est pas surprenant étant donné la nature biochimique de ces récepteurs, des héparane-sulfates des protéoglycanes (ce point sera développé ci-dessous dans la partie 5.1 de ce chapitre).

Si on analyse le mode de transmission des herpes virus dans leurs espèces hôtes naturelles respectives, on observe que cette transmission requiert des contacts rapprochés entre l'individu contaminant et le contaminé :

- Chez l'homme, l'infection par HSV-1 se transmet par contact direct avec un sujet excréteur du virus lors d'une primo-infection, d'une récurrence ou d'une excrétion virale asymptomatique présente aussi dans la salive. La transmission de HSV-2 se fait par contact génital. C'est une maladie uniquement sexuellement transmissible. L'infectiosité des lésions est majeure, en particulier lors d'une primo-infection, mais l'excrétion virale asymptomatique est un facteur épidémiologique capital dans la transmission de HSV-2. La transmission de ces deux virus entre individus ne peut donc se produire qu'en cas de contacts étroits principalement en raison de la grande fragilité des virions (Laurent 2005).
- Les voies de transmission du CeHV-1 entre les macaques sont variées mais nécessitent toutes un contact étroit entre les animaux. La voie sexuelle est responsable d'un quart des transmissions du CeHV-1 entre les macaques pubères. La voie traumatique par griffure et surtout morsure serait prépondérante. L'augmentation de la séroprévalence chez les animaux pubères serait donc également due à l'augmentation des contacts, ainsi que les bagarres, entre les animaux au moment puis après la puberté (l'épidémiologie de l'infection par le CeHV-1 chez le macaque sera développée dans le chapitre 3 de cette thèse).

La transmission naturelle des herpès virus chez les primates (et chez les mammifères en général¹) nécessite donc des contacts étroits entre l'animal excréteur et le contaminé en raison principalement de la fragilité des virions, ce qui en soit constitue déjà une barrière d'espèce importante. Cette fragilité des virions ne peut cependant pas expliquer entièrement la relativement faible transmissibilité interspécifique des herpès virus.

Les barrières d'espèce ne sont donc pas aussi strictes que ce que permettrait d'évoquer les arbres phylogénétiques des virus. Ces barrières ne résultent pas de l'incompatibilité ou de l'absence de récepteurs viraux, mais plus de l'isolement comportemental ou géographique des espèces, du mode de contamination et de la fragilité des virus qui limitent leur champ infectieux.

La meilleure prévention de l'infection de l'homme ou d'autres espèces animales par le CeHV-1 reste donc d'isoler totalement les espèces de primates non infectées des macaques d'origine asiatique et de prendre le maximum de mesures de prévention lors de la manipulation de ces mêmes macaques par des hommes.

En dehors des barrières déjà évoquées, certains moyens de lutte spécifiques contre certains virus pourraient être responsables de la résistance de certaines espèces à l'infection par les virus du genre *Simplexvirus*. Par exemple chez les primates on note de fortes différences entre les différentes espèces pour l'expression des « défensines » (peptides antimicrobiens de moins de 100 acides aminés présentant une activité antimicrobienne de large spectre, pour plus de précisions nous invitons le lecteur à consulter la très bonne revue générale écrite par Ganz en 2003).

Parmi les défensines, celles de la sous-classe que l'on nomme thêta, ou rétrocyclines,

¹ Dans le cas du Bov-HV1, virus appartenant au genre *Simplexvirus* et responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR), la contamination entre bovins se fait surtout par contact direct car le virus ne survit pas plus d'une dizaine de minutes à l'air libre et sous l'action des UV : léchage, saillie et inhalation des aérosols produits par les animaux malades. Dans quelques rares cas, une transmission par le matériel a été mise en cause.

Le virus félin, FHV-1, responsable de la rhinotrachéite infectieuse féline ou "coryza" est un virus fragile qui ne peut survivre dans le milieu extérieur. La transmission par contact direct est largement prépondérante. La source de virus est représentée par les sécrétions nasales, oculaires et buccales de chats infectés, pendant les 10 premiers jours de l'infection puis lors de réexcrétion virale survenant naturellement à la faveur d'un stress, comme la mise en pension, l'hospitalisation, le transport, la mise bas ou la lactation, la période de sevrage chez le chaton de cinq à sept semaines d'âge, les interventions chirurgicales, la corticothérapie. La transmission par aérosol produit lors de l'éternuement a été écartée (Gaskell 1982), de même que la transmission indirecte par les fèces. Ces auteurs concluent qu'un contact étroit et d'une durée de plusieurs jours est nécessaire pour la transmission du FHV.

consistent en des peptides cycliques, qui occupent une position particulière dans la lutte antivirale, identifiés primitivement avec le VIH et le SIV (virus d'immunodéficience humaine et simienne), d'où le nom de rétrocycline (Cole 2002, Munk 2003). Des expériences récentes ont permis de démontrer que les thêta-défensines, synthétisées par les cellules épithéliales et les leucocytes de certaines espèces de primates présentaient des capacités anti-herpès particulières (Yasin 2004). Les thêta-défensines protègent *in vitro* les cellules épithéliales humaines contre l'infection par HSV-1 et HSV-2 en se liant à la glycoprotéine B (gB), ce qui prévient la fixation du virus à la membrane des cellules hôtes et empêche la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule cible. La fixation des rétrocyclines à la glycoprotéine B dépend des propriétés lectine des rétrocyclines. On a dès lors beaucoup de mal à comprendre comment ces peptides pourraient jouer un rôle *in vivo* puisque les glycosaccharides de la protéine virale gB sont en fait produits par la machinerie de la cellule hôte. Si les rétrocyclines se fixent à ces glycosaccharides, elles devraient également pouvoir se lier à toutes les glycoprotéines autologues. On comprend par contre que ce type de liaison puisse donner lieu *in vitro* à une inactivation des virus. En fait *in vitro* tout doit dépendre de la qualité des cellules cibles utilisées et en particulier des glycosaccharides qu'elles expriment. Les thêta-défensines, découvertes pour la première fois dans les leucocytes et la moelle du macaque rhésus (*Macaca mulatta*), sont des octadeca-peptides circulaires (Tang 1999). Les thêta-défensines sont constituées par la ligature de deux nona-peptides produits par le clivage de prédéfensines thêta. Un processus post-traductionnel particulier permet la ligation des deux peptides aboutissant à la formation d'un peptide cyclique stabilisé par trois ponts disulfures intramoléculaires (Leonova 2001).

Le gène précurseur des gènes de thêta-défensines est apparu chez les primates et est retrouvé (fonctionnel ou non) chez plusieurs singes de l'ancien monde et tous les grands singes anthropomorphes alors qu'il est absent chez les singes du Nouveau Monde et les prosimiens (Nguyen 2003). On peut retrouver jusqu'à six copies de ces gènes précurseurs de thêta-défensines dans le génome des primates, l'hypothèse phylogénétique la plus probable est que ce gène ait connu des vagues de duplication indépendantes dans plusieurs espèces (voir figure 5). Chez les macaques le gène fonctionnel s'est dupliqué en donnant naissance à quatre gènes fonctionnels dont trois codant des prédéfensines thêta qui présentent de nombreuses mutations non synonymes dans la zone correspondant au peptide précurseur. Chez l'ancêtre commun de l'homme et des singes anthropoïdes il est apparu une mutation ponctuelle responsable d'un codon stop prématuré au niveau du peptide signal du propeptide (Cole 2002). Ce gène non fonctionnel (mais toutefois transcrit) s'est dupliqué plusieurs fois donnant naissance à six pseudogènes chez l'homme. L'orang-outang possède quatre gènes fonctionnels et un pseudogène dont la mutation inactivatrice est identique à celle observée dans les gènes

humains. Cette dernière observation laisse à penser que l'orang-outang aurait hérité le gène non fonctionnel ancestral. Chez l'orang-outang, ce gène ancestral non fonctionnel se serait dupliqué et l'un des deux gènes serait alors redevenu fonctionnel par une nouvelle mutation au niveau du codon stop prématuré. Ce gène, redevenu fonctionnel, se serait alors à nouveau dupliqué donnant naissance aux quatre gènes fonctionnels de l'orang-outang. Le siamang n'aurait gardé qu'un seul gène fonctionnel.

Le macaque rhésus et l'orang-outang, deux espèces insensibles à l'infection par le HSV-1, possèdent des thêta-défensines fonctionnelles. D'autres espèces de primates sensibles à l'infection par le HSV-1, comme le chimpanzé, le gorille, les singes du Nouveau Monde et l'homme, sont dépourvus de thêta-défensines fonctionnelles. Les thêta-défensines des macaques et des orangs-outangs pourraient donc être à l'origine de l'apparente résistance de ces animaux à l'infection par les herpès simplex humains contrastant avec la grande sensibilité à l'infection par ces HSV humains de l'homme lui-même mais aussi des singes du Nouveau Monde dépourvu de défensine thêta. Cet exemple montre que des espèces phylogénétiquement proches peuvent différer fonctionnellement pour un mécanisme de résistance vis-à-vis d'un virus donné. Cependant, cette résistance vis à vis des HSV humains, ne s'étend pas au CeHV-1, puisque le macaque en est l'hôte naturel et est donc sensible à son infection tandis que l'homme semble en fait peu réceptif à ce virus. Il n'existe pas non plus de données quand à la sensibilité de l'orang-outang à l'infection par le CeHV-1.

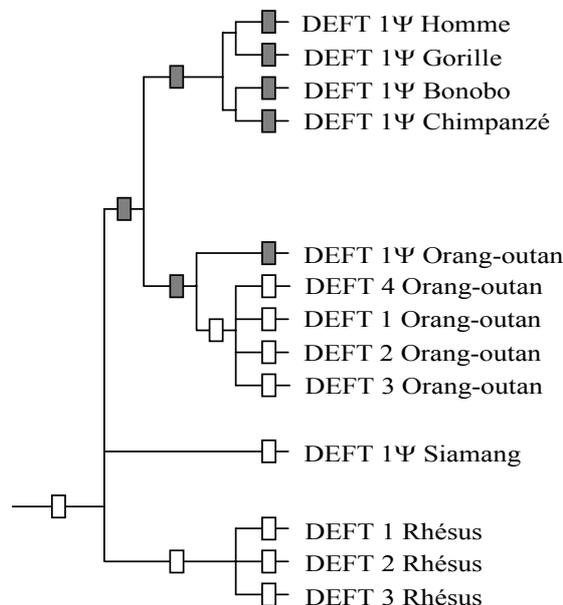


Figure 5 : Représentation schématique de l'évolution des principaux gènes de téta défensines de primates.

■ Gène non fonctionnel

□ Gène fonctionnel

5. Le cycle de la réplication virale.

5.1. Récepteurs viraux.

Les récepteurs viraux permettant l'entrée du CeHV-1 dans les cellules hôtes n'ont pas été étudiés pour le moment. Cependant du fait de la grande parenté entre les glycoprotéines du CeHV-1 et des HSV humains, on peut supposer que le CeHV-1 utilise les mêmes récepteurs que les HSV humains. Nous allons donc prendre ici l'exemple des HSV humains. Il a été clairement identifié trois glycoprotéines mises en jeu lors de l'entrée du HSV dans la cellule hôte. La liaison du virus enveloppé à la membrane cellulaire se fait tout d'abord grâce à la glycoprotéine gC (homologie CeHV-1/HSV-2 = 51.5%) qui se lie aux héparane-sulfates des protéoglycanes de surface. Cette liaison n'est pas nécessaire *in vitro* mais permet une liaison du virus à la membrane cellulaire dix fois supérieure. La glycoprotéine gD (homologie CeHV-1/HSV-2 = 59.0%) se lie ensuite aux HVEM (herpesvirus entry mediator), molécules membre de la famille des TNF récepteurs ; à deux nectines, les nectin-1 et nectin-2, deux membres de la superfamille des immunoglobulines ; et à des sites spécifiques d'héparane-sulfate générés par certains isoformes de la 3-O-sulfotransférases (pour revue générale voir Garner 2003). L'importance des 3-O-sulfotransférases a été démontrée grâce à un modèle *in vitro* utilisant des cellules de hamster (CHO), les cellules CHO étant naturellement résistantes à l'infection par le HSV-1. Ces cellules CHO deviennent sensible à l'infection par le HSV-1 lorsqu'elles sont transfectées par le gène de la 3-O-sulfotransférase (isoforme 4 ou 6) (Xu 2005, Tiwari 2005).

Lors de l'infection de cultures cellulaires par le CeHV-1, le virus s'adsorbe à la surface des cellules hôtes en 30 à 60 minutes après l'infection.

5.2. L'entrée du virus dans la cellule.

Les glycoprotéines gB, gH et gL (respectivement homologie CeHV-1/HSV-2 = 80.4%, 60.9% et 53.4%) induisent la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique de la cellule hôte et ainsi permettent la pénétration de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule hôte (Garner 2003, Spear 2003).

5.3. La réplication du virus.

Toujours suivant l'exemple du HSV, après la pénétration de la nucléocapside virale dans le cytoplasme de la cellule hôte, la protéine UL34 (homologie CeHV-1/HSV-2 = 71.3%), en collaboration avec l'appareil microtubulaire de la cellule, participe au transport et à l'adressage de la nucléocapside vers les pores nucléaires (Ye 2000), l'ADN du virus pénètre ensuite dans le noyau. Les protéines très précoces (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47) sont alors exprimées peu de temps après l'entrée des virions dans la cellule hôte. Certaines, comme ICP0

et ICP4, sont nécessaires aux événements ultérieurs de la réplication. Une autre protéine exprimée très précocement, la protéine ICP47, est un inhibiteur de l'activité des protéines TAP 1 et 2 impliquées dans le transport et la présentation des antigènes par les molécules HLA de classe I. Le HSV est donc capable d'inhiber très précocement la présentation des antigènes aux lymphocytes CD8⁺. Ce qui explique l'absence de réponse efficace des lymphocytes CD8 chez l'homme¹.

Les protéines très précoces activent à leur tour la transcription des gènes précoces indispensables à l'initiation la réplication de l'ADN. Le gène précoce UL29 codant pour la protéine ICP8 est nécessaire à l'initiation de la réplication de l'ADN et à l'expression des gènes tardifs. Le produit du gène UL5 est également nécessaire à la réplication de l'ADN viral.

La réplication de l'ADN viral peut mettre en jeu la thymidine kinase virale (UL23) pour la production des nucléotides phosphates précurseurs de l'ADN². Ce mécanisme n'est pas nécessaire à la réplication virale dans les cellules qui se multiplient comme les cellules épithéliales. La thymidine kinase virale est par contre nécessaire à la réactivation du HSV depuis un état de latence établi dans les neurones des racines sensibles de l'hôte.

Les gènes tardifs sont généralement exprimés après la réplication de l'ADN viral. Ces gènes codent pour les protéines structurales du virus et sont impliqués dans l'assemblage et la sortie du virus.

Lors de l'infection de cultures cellulaires par le CeHV-1, on observe un arrêt du fonctionnement de la machinerie cellulaire une fois que le virus a pénétré dans la cellule. Aucune activité virale ou cellulaire ne sont ensuite détectée pendant 2 à 3 heures, puis la synthèse des protéines virales précoce commence. Quatre heures après l'infection, la synthèse en ADN viral augmente énormément tout comme celle les protéines virales. Du virus infectieux est enfin détectable dans le milieu de culture 6 à 10 heures après l'infection.

6. Cycle infectieux chez l'hôte naturel

6.1. La Primo-infection par le CeHV-1

La primo-infection par le CeHV-1 chez le macaque est similaire à celle qui est décrite pour

¹ On notera que la protéine ICP47 n'inhibe pas le complexe TAP1-2 de la souris. Si bien que dans l'infection murine expérimentale à HSV-1 il apparaît une réponse efficace des lymphocytes CD8.

² Ce mécanisme revêt une importance particulière dans le domaine de la lutte antivirale. En effet les drogues antivirales disponibles à ce jour pour la lutte anti-herpès sont des analogues de bases puriques, qui lorsqu'elles sont métabolisées de manière spécifique par les thymidines kinases virales deviennent inhibitrices pour la réplication de l'ADN viral. Ce mécanisme n'étant pas absolument nécessaire à la réplication virale, des souches virales résistantes peuvent apparaître par mutation inactivatrice de cette thymidine kinase. D'autres molécules comme le Foscarnet sont directement inhibitrices de l'ADN polymérase virale.

les HSV chez l'homme. Lors d'un premier contact avec le virus (primo-infection symptomatique ou asymptomatique), le virus pénètre la muqueuse buccale ou génitale à la faveur d'une microabrasion, à la suite d'un contact direct avec des sécrétions infectées ou avec une surface muqueuse. D'après une étude menée par Gosztonyi, l'infection par le CeHV-1 chez la souris est suivie d'un cheminement centripète du virus vers le système nerveux central qui est tout au long de ce parcours strictement restreint aux structures nerveuses. Pendant l'infection primaire, les particules virales infectent les terminaisons nerveuses sensibles correspondantes au territoire tissulaire impliqué lors de l'infection. Le virus, sous la forme de capsides virales, gagne enfin par cette voie rétro-axonale le corps neuronal des ganglions sensitifs (trigéminals, sacrés) où se produit une multiplication virale dans certains neurones permissifs (Gosztonyi 1992). Le virus peut aussi se propager d'un neurone à l'autre grâce aux connexions naturelles du neurone infecté c'est à dire grâce aux synapses de celui-ci. Ce transport trans-synaptique se produit d'une manière antérograde et rétrograde. Le transport rétrograde se produit lors des récurrences de la maladie. Le transport antérograde lorsqu'il affecte le système nerveux central peut aboutir au développement d'une encéphalomyélite.

6.2. Phase de latence virale après mise en place de la réponse immunitaire

Suite à l'infection primaire, il va s'établir une infection latente qui commence environ dix jours après le début de l'infection et va durer toute la vie : le ganglion trigéminal et les ganglions sacrés en sont les sites les plus fréquents (Vizoso 1975, Weigler 1995). Cet état de latence caractérisé par une persistance du génome viral dans certains neurones représente pour le virus l'avantage d'échapper à la réponse immune et aux drogues antivirales qui n'agissent que sur la réplication virale (par voie de conséquence le traitement antiviral est bien incapable d'éradiquer les virus tapis dans les neurones où ils ne se multiplient pas).

Le cycle de multiplication du virus dans les cellules neuronales reste très mal connu, car l'étude de l'interaction virus – neurone se heurte à la difficulté d'établir des modèles expérimentaux, *in vitro* aussi bien que *in vivo*. Il est cependant connu qu'il s'établit une latence au niveau des neurones des ganglions sensitifs, caractérisée par la persistance du génome du HSV sous la forme d'épisome, sans qu'il n'y ait d'expression virale ou de réplication. La latence donne au virus un avantage majeur : il s'échappe à la réponse immune humorale et cellulaire de l'hôte infecté et reste persistant à vie chez tous les hôtes infectés. Il échappe ainsi également à l'action des drogues anti-virales qui, à ce jour, agissent uniquement sur la réplication.

Dans le cas de HSV, la latence requiert une interaction unique entre le virus et le neurone qui l'héberge. En effet, une multiplication virale incontrôlée aurait des effets irréparables du fait

de la destruction de cellules hautement spécialisées non renouvelables, tandis qu'une répression complète de l'expression virale par le neurone empêcherait toute réactivation, donc toute possibilité de récurrence.

L'expression virale au cours de la latence se restreint à une famille d'ARN transcrits à partir d'une courte portion du génome viral, les «transcrits associés à la latence» ou LAT, tandis qu'aucune protéine virale n'a été mise en évidence dans les neurones hébergeant le virus latent. La présence abondante des LAT dans les noyaux des neurones suggère fortement leur implication dans les mécanismes d'établissement et/ou de maintien de la latence, et/ou dans la réactivation, mais des controverses existent encore actuellement sur leur rôle exact. Le promoteur de LAT est activé dans les neurones sensoriels, contrairement aux autres promoteurs des gènes de HSV-1 (Jones 2003). Lors de l'infection du ganglion sensitif, des populations de neurones reconnaissables par l'expression de leurs molécules de surface, suivent des voies divergentes : soit l'entrée dans le cycle de réplication lytique, soit l'établissement immédiat en latence. Il existe donc probablement une régulation de l'expression virale dépendant des spécificités fonctionnelles des neurones infectés, mais la relation entre la latence et les propriétés biologiques de ces neurones demeure inconnue. Des facteurs cellulaires spécifiques des neurones sont très vraisemblablement impliqués dans l'établissement de la latence, son maintien, et la réactivation (pour revue générale voir Rozenberg 2002).

Il a été envisagé que les ARN de LAT puissent inhiber l'expression de la protéine ICP0, protéine essentielle à l'initiation du cycle de réplication du virus HSV dans la cellule hôte. LAT, qui est un antisens des gènes codant pour les protéines ICP0 et γ 34.5, pourrait agir sur ICP0 de plusieurs manières. Les hypothèses avancées, LAT pourrait agir sur la transcription du gène ICP0 ou sur la traduction des ARNm de ICP0 par un mécanisme mettant en jeu le fait que LAT soit un antisens de ICP0. LAT pourrait également coder pour une protéine (non identifiée) régulatrice de l'expression de ICP0. Il existerait donc une sorte de balance entre l'expression de LAT et de ICP0 dans les cellules infectées qui aboutirait à l'entrée et au maintien de la latence ou alors à la reprise du cycle réplicatif.

En dehors des cellules neuronales, les cellules porteuses du virus réplicatif sont détruites par la réponse immunitaire (la réponse immunitaire sera décrite plus loin dans ce chapitre).

6.3. La réactivation endogène de l'infection : herpès de sortie.

Il a été montré qu'il existait, dans certaines circonstances, une possibilité de réactivation d'une infection ganglionnaire latente qui est à l'origine des récurrences herpétiques cutané-

muqueuses. Chez la souris, il a été démontré que la migration du virus CeHV-1 s'effectue le long de l'axone et que sa réplication au niveau de la peau et des muqueuses peut produire des lésions vésiculo-pustuleuses contenant du virus infectieux (Gosztonyi 1992). Ces réactivations virales sont accompagnées de réexcrétion du CeHV-1, comme dans le cas du HSV.

Chez le macaque, les réactivations ont lieu à la faveur de divers stress comme la mise bas (Anderson 1994), la quarantaine et les manipulations des animaux en captivité (Zwartouw 1984), lors du pic d'activité sexuelle lors de la période de reproduction. La réactivation virale est particulièrement rythmée par le cycle reproductif chez les macaques rhésus et ceux du Japon avec un pic d'activité en novembre (Huff 2003).

Chez le macaque crabier qui présente une activité reproductrice moins rythmée, ce pic est moins facile à mettre en évidence. En milieu expérimental, les immunodépressions thérapeutiques ou virales (SIV) augmentent fortement le risque de réactivation du CeHV-1. De ce point de vue, on peut ici faire un parallèle avec ce qui est observé chez l'homme. En effet il a été montré que les patients atteints de SIDA peuvent présenter des lésions herpétiques cutanées chroniques et/ou disséminées dues à HSV (Erlich 1989). De la même manière il a été rapporté des cas d'infection disséminée sévère à HSV-2 avec virémie positive chez des patients transplantés hépatiques ou rénaux et subissant donc un traitement immunosuppresseur (Basse In : 5^{ème} Congrès Annuel de la Société Francophone de Transplantation, Tours 2005).

Dans le cas du CeHV-1, les réactivations chez les macaques, peuvent être symptomatiques avec apparition de lésions de type herpétique, une étude (Keeble 1960) montre que ces réactivations symptomatiques touchent 2,3% (332/14400) des macaques rhésus. Il existe également des réactivations virales asymptomatiques. Une étude (Huff 2003) également menée chez des macaques rhésus a démontré l'existence d'une excrétion virale au niveau des muqueuses buccales ou génitales en l'absence totale de toute lésion détectable, la prévalence de cette excrétion asymptomatique atteignant 15% (21/144) en période de reproduction des animaux.

Chez l'homme, l'exposition au soleil peut parfois constituer un stress suffisant pour induire des réactivations virales lors d'infection par le HSV-1 (Rozenberg 2002). Dans le cas des herpès virozes humaines, sous l'effet de stimuli mal caractérisés, le virus peut être périodiquement réactivé, reprendre un cycle de réplication complet dans la cellule neuronale, migrer le long de l'axone dans le sens antérograde pour réapparaître à la surface cutanée ou muqueuse. On connaît les situations cliniques favorisant la réactivation chez l'homme : fièvre,

stress, facteurs hormonaux, ultraviolets, déficit immunitaire cellulaire ; souvent asymptomatiques, ces épisodes de réactivation jouent un rôle essentiel dans la diffusion de l'infection. En revanche, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la capacité des *Simplexvirus* à des réactivations périodiques demeurent en grande partie mystérieux.

Il a récemment été montré dans le cas du HSV-1 que divers stimuli comme l'irradiation par des UV ou des chocs hyperthermiques induisent *in vivo* l'activation du promoteur de ICP0 (Loiacono 2003). On peut également envisager qu'il puisse se produire une rupture de l'équilibre qui existe entre LAT et ICP0 qui existe durant la phase de latence du virus.

La réactivation aboutit à la production de virus infectieux, pourtant le ganglion sensitif semble résister à des épisodes répétés de réactivation sans perdre sa fonction, ce qui a fait supposer initialement que les cellules neuronales étaient douées d'une propriété de résistance spécifique vis-à-vis de la réplication de HSV. L'hypothèse qui prévaut actuellement est que la latence ne concerne qu'un très petit nombre de neurones (1% des cellules ganglionnaires), et qu'une réplication à bas bruit dans quelques cellules suffit à entraîner une réactivation clinique.

Des données récentes suggèrent la présence de facteurs à demi-vie brève, capables d'exercer un effet inhibiteur sur la réactivation : le facteur de croissance neuronal (Nerve Growth Factor ou NGF) serait l'un des éléments essentiels au maintien de la latence. Les mécanismes permettant la réactivation sont eux aussi mal compris (Rozenberg 2002). Au cours du cycle lytique, l'expression initiale des gènes viraux très précoces est contrôlée par un complexe multi-protéique contenant à la fois des facteurs viraux (protéine VP16) et cellulaires (oct-1, facteur C1). Le rôle de ces protéines dans la réactivation à partir des neurones hébergeant le virus à l'état latent commence à être exploré (pour revue générale voir Rozenberg 2002).

7. La réponse immunitaire anti-CeHV-1

7.1. Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée des macaques contre l'infection par le CeHV-1 n'a pas été étudiée jusqu'à présent. Nous prendrons donc dans ce paragraphe l'exemple des HSV humains dont la pertinence devra être parfois nuancé en raison des différences existant entre ces virus proches.

L'interaction des virions des HSV humains avec certains acteurs de la réponse immunitaire innée que sont les mononucléaires et les cellules dendritiques plasmacytoïdes aboutit à la

production par ces cellules d'interféron alpha. Il a été démontré que cette production d'interféron alpha peut être induite simplement par la présence de glycoprotéine D (gD) recombinante du HSV-1 ou par la présence de l'ADN de ce même virus. La stimulation cellulaire par la gD passe par l'interaction de cette glycoprotéine avec les récepteurs aux chémokines CCR3 et CXCR4 et aboutit donc à la production d'interféron alpha par les cellules (Katz 2002).

La stimulation de la production d'interféron alpha par l'ADN viral passe par le TLR9. La capacité du génome des HS à stimuler le TLR9 découle de la richesse en îlots CpG non méthylés. Ces motifs CpG non méthylés sont reconnus par le récepteur Toll TLR9. L'activation de TLR9 induit une cascade transductionnelle qui aboutit à l'induction de l'expression d'interféron alpha par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (seules cellules dendritiques à exprimer le TLR9) (Lund 2003).

L'activité antivirale de l'interféron alpha est bien connue, cependant les HSV présentent des moyens de lutte efficace contre l'activité de cet interféron :

- Ainsi la protéine ICP0 produite par le HSV interrompt la voie de réponse par l'interféron alpha en bloquant les voies de signalisation par JAK-STAT et en inhibant directement l'expression des gènes stimulés par l'interféron alpha (Katz 2002).
- La protéine virale US11 du HSV est également capable d'inhiber la protéine kinase PKR, protéine impliquée dans la voie de signalisation de la réponse à l'interféron alpha (Katz 2002).
- Nous avons déjà mentionné au début de ce chapitre un autre mécanisme d'évasion virale vis à vis de l'action de l'interféron alpha. L'activation de la PKR entraîne la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α et par conséquent l'interruption des synthèses protéiques dans les cellules infectées et donc également de la réplication virale. La protéine virale ICP34.5 (absent chez le CeHV-1) se lie à une phosphatase cellulaire pour déphosphoryler le facteur eIF2, contrecarrant les effets de la PKR (Chou 1995, 1994, 1992, He 1997, Lieb 2000). Une autre fonction, dépend des domaines amino-terminal et carboxylique-terminal de la ICP34.5, permet au virus de se replier dans les systèmes nerveux centraux et périphériques de souris expérimentalement infectées (Chou 1990, Taha 1989). La délétion du gène $\gamma_134.5$ du HSV-1 entraîne la suppression de la neurovirulence des souches de HSV-1 hautement neurovirulentes chez la souris. Comme nous l'avons déjà indiqué dans la partie 3.3. de ce chapitre, en l'absence du gène homologue au $\gamma_134.5$ du HSV-1 la neurovirulence du CeHV-1 doit donc dépendre d'autres gènes encore inconnus.

Les HSV humains sont donc reconnus de manière efficace par les acteurs du système immunitaire inné et induisent une production d'interféron alpha. Cependant, comme nous venons de le voir, ces virus ont mis en place plusieurs moyens de lutte contre cette réponse par l'interféron alpha. Il est toute fois important de noter que toutes les cellules infectées par les HSV, à l'exclusion des neurones, sont tout de même rapidement détruites par le système immunitaire.

Le récepteur Toll TLR2 est l'un des récepteurs de PAMPS impliqué dans la reconnaissance du HSV. Ce récepteur peut interagir avec la membrane des virions de HSV-1 et induit la production par les cellules d'interleukine 6 (IL6). Cette réponse en cytokine s'avérer délétère pour l'hôte lorsque celle-ci est trop importante. Chez la souris l'hyperproduction d'IL6 aboutit à une encéphalite mortelle qui ne survient jamais chez les souris KO pour le gène TLR2 (Morrison 2004, Kurt-Jones 2005). La transposition de ces observations chez les primates attend une démonstration expérimentale. Chez les nouveaux nés humains on notera cependant que la production d'IL6 est plus forte que chez les adultes. De manière corrélée, les nouveaux nés développent plus souvent des méningo-encéphalites herpétiques que les adultes (Kurt-Jones 2005).

7.2. Réponse humorale :

7.2.1. *Evolution des titres en fonction de la maladie et du temps.*

L'évolution dans le temps de la production quantitative et qualitative d'anticorps anti-CeHV-1 a été étudiée au décours d'infections expérimentales de macaques crabiers par inoculation du CeHV-1 dans les lèvres et la langue, (Lees 1991) :

- La quantification de la production d'anticorps anti-CeHV-1 a été réalisée par des techniques de dosage radio-immunologique. Les fractions en anticorps IgM et IgG de sérum de ces macaques crabiers infectés expérimentalement ont été capturées sur des billes de polystyrène recouvertes d'anticorps anti-immunoglobulines humaines spécifiques des classes M ou G. Des antigènes issus du CeHV-1 ont été ajoutés, puis après lavage, la réaction a été révélée par un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le CeHV-1 et un anticorps anti-immunoglobulines de souris radiomarqué. Ainsi les anticorps de la classe IgM apparaissent rapidement, des IgM sont détectables dès le 6^{ème} jour post-infection. Le pic d'IgM est atteint généralement au 12^{ème} jour avant de décliner sur une trentaine de jours. Les anticorps de la classe IgG apparaissent à partir du 12^{ème} jour post-infection et augmentent ensuite progressivement (Lees 1991).

- La qualité de ces anticorps a été étudiée par des techniques de dosage radio-immunologique compétitif vis-à-vis de sérum de souris hyperimmunisées et de séroneutralisation du CeHV-1 sur cellules Vero. Les dosages radio-immunologiques compétitifs ont été réalisés en utilisant des billes de polystyrènes recouvertes d'antigène de CeHV-1, puis un mélange des anticorps de souris hyperimmunisées et des sérums à tester a été ajouté à la réaction. L'inhibition de la fixation des anticorps de souris par les anticorps contenus dans les sérums a été mesurée en utilisant un anticorps anti-immunoglobulines de souris radiomarqué. Des anticorps réagissant en dosage radio-immunologique compétitif apparaissent dès les 8^{ème} à 12^{ème} jours post-infection puis augmentent progressivement avec un pic entre le 30^{ème} et le 40^{ème} jour. Des anticorps neutralisants ont été détectés dès le 8^{ème} jour (Lees 1991).

Les anticorps neutralisants apparaissent donc rapidement chez les macaques infectés expérimentalement, les titres sériques d'anticorps neutralisant atteignant 1:64 à 1:128 en une vingtaine de jours. Ces anticorps persistent mais déclinent au cours du temps atteignant un titre de 1:8 vers 24 mois après l'inoculation (Palmer 1987). On notera que par contre, les anticorps que l'on dépiste par technique ELISA (et qui ne sont pas tous neutralisants) persistent à des titres parfois élevés beaucoup plus longtemps que les anticorps neutralisants. Cette observation a été remarquée dans le cadre d'autres infections virales (Zinkernagel communication au congrès de la SFI, Novembre Toulouse 2005.).

7.2.2. *Protection par les anticorps*

Lors de cette même étude (Lees 1991), aucune lésion n'a été détectée chez les quatre animaux infectés expérimentalement mais le virus aura été détectable dans la cavité orale des animaux sur une période allant généralement de 2 à 8 jours après l'infection, chez un animal le virus a été encore isolé au 20^{ème} jour, cette excrétion n'est ensuite plus détectable. Ainsi on peut observer que chez le macaque l'infection par le CeHV-1 induit une réponse humorale rapide relativement efficace puisque celle-ci évite l'apparition de lésion chez celui-ci sans pour autant éviter totalement l'excrétion locale de virus.

Cette réponse humorale ne protège cependant pas contre la latence du virus dans les ganglions nerveux des macaques infectés. En effet il a été montré qu'il était possible de retrouver du CeHV-1 infectieux dans les ganglions trijumeaux de macaques rhésus qui s'étaient infectés naturellement 6 mois plus tôt et qui ne présentaient plus aucun signe clinique au moment de cette recherche (Vizoso 1975). Une étude menée chez des lapins infectés expérimentalement par le CeHV-1 a permis de retrouver chez des lapins présentant de fort taux en anticorps

neutralisants la présence de CeHV-1 infectieux dans le cerveau et la moelle épinière 6 mois après l'infection et dans les ganglions des racines postérieurs plus de 2 ans après l'infection (Vizoso 1975).

Ainsi comme dans le cas du HSV chez l'homme, le CeHV-1 peut entrer en latence dans le système nerveux des macaques malgré la mise en place d'une immunité humorale neutralisante contre le virus. D'autant plus qu'il a été démontré que le CeHV-1, une fois qu'il est entré dans le système nerveux, migre et entre en latence sans plus jamais le quitter sauf lors des réactivations (Gosztanyi 1992).

7.2.3. *L'importance des épitopes glycosylés dans la spécificité des anticorps*

Différentes études menées sur le HSV-1 ont montrées l'importance de la glycosylation des protéines dans les propriétés antigéniques de ces dernières. La glycoprotéine D présente trois sites de glycosylation. Sodora *et al.* ont produit en 1989 des mutants de la glycoprotéine gD par mutagenèse dirigée. Trois protéines mutantes ont été construites en changeant un des emplacements N-CHO. Une quatrième protéine mutante a été produite en changeant chacun des trois emplacements. L'absence d'une ou des trois glycosylations a induit une réduction de l'affinité, jusqu'à 95%, de différents anticorps monoclonaux pour toutes ces protéines mutantes par rapport à la protéine de type sauvage. Cette réduction d'affinité suggère l'importance de la glycosylation de cette glycoprotéine pour la fixation des anticorps qui la reconnaissent naturellement (Sodora 1989). Une autre étude a obtenu des résultats comparables, plusieurs mutants de la glycoprotéine D produits par substitutions de cystéines amenant à des protéines mutées sans oligosaccharide ont montré une diminution voire une perte totale de reconnaissance de la part de différents anticorps monoclonaux spécifiques de la glycoprotéine D de type sauvage (Wilcox 1988).

Ainsi la glycosylation des glycoprotéines de HSV-1 apparaît essentielle pour la reconnaissance des anticorps spécifiques de ces protéines. Cet état de fait prend une grande importance pour la production d'extraits antigéniques de CeHV-1 ou de glycoprotéines recombinantes de ce dernier en vue d'une utilisation à des fins de diagnostic sérologique. La glycosylation des protéines virales est sous la dépendance des glycosyltransférases de la cellule dans laquelle le virus se réplique (en effet, en dehors de l'herpès virus des bovins aucun gène de glycosyltransférase n'existe chez les herpès virus). En sérologie, il sera nécessaire d'utiliser un type cellulaire le plus proche possible de l'espèce chez la quelle on souhaite rechercher des anticorps afin de disposer d'antigènes viraux glycosylés à la manière de l'espèce concernée. Par exemple des cellules Vero (dérivées de singe vert africain) voire des cellules de rein de macaque seront très adaptées pour la production du virus destiné au

diagnostic sérologique sur des sérums de macaques. Pour la production de virus destiné au dépistage sérologique humain, on pourrait proposer les cellules HeLa sur lesquelles il a été montré que le virus se répliquait de manière très efficace.

7.3. Réponse cellulaire :

La réponse cellulaire mise en jeu lors de la réponse immunitaire du macaque infecté par le CeHV-1 est peu connue. Ces mécanismes sont par contre bien étudiés chez le HSV humain dont la physiopathologie est très proche. Les études disponibles suggèrent que les immunités innée et adaptative contribuent au contrôle initial de la réplication de HSV-1 dans les ganglions sensoriels et à l'établissement d'une infection latente (Khanna 2004).

Les lymphocytes T CD4⁺ sont fortement stimulés *in vivo* lors d'une infection par HSV. La réponse de ces lymphocytes T CD4⁺ consiste en une production d'interféron gamma et d'interleukine 2 et 12. Les lymphocytes T CD8⁺ ne sont quant à eux que faiblement stimulés *in vivo*. En effet, le HSV possède un moyen de lutte efficace contre la réponse des lymphocytes T CD8⁺. Une protéine, l'ICP47, produite très précocement par le HSV montre la capacité d'inhiber l'activité des protéines TAP 1 et 2 impliquées dans le transport et la présentation des antigènes par les molécules HLA de classe I¹. Cette inhibition de la présentation par les molécules HLA de classe I est capable d'inhiber quasiment totalement la réponse anti-HSV des lymphocytes T CD8⁺. Les cellules infectées par le HSV ne sont donc pas détruites *in vivo* et *in vitro* par les lymphocytes T CD8⁺. La réponse des lymphocytes T CD4⁺ est donc ici largement prépondérante et essentielle dans le contrôle de l'infection des cellules par le HSV (Koelle 2003).

Les HSV possèdent un autre moyen de lutte contre la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺. La protéine US5 est en effet capable d'inhiber l'activation de la caspase 3 induite par le granzyme B sécrété par les lymphocytes T CD8⁺. Une seconde protéine virale US3 est également capable de bloquer la voie d'activation des caspases induite par le granzyme B. US3 a en effet la capacité d'inhiber le clivage de la protéine Bid par le granzyme B, inhibant précocement l'activité proapoptotique de cette molécule chez les cellules infectées par le HSV

¹ Remarque importante : Il est faut noter que les nombreuses données concernant la réponse immunitaire anti-HSV accumulées chez la souris doivent être tempérées, en effet les protéines TAP 1 et 2 d'origine murine sont beaucoup moins sensibles à l'action de la protéine virale ICP47 que les TAP d'origine humaine. Ainsi il avait été décrit chez la souris une forte activité cytotoxiques des lymphocytes T CD8⁺ contre les cellules infectées par HSV alors que chez l'homme cette activité est absente. De ce point de vue, ICP47 est capable d'inhiber en plus des TAP humaines, les TAP d'origine porcine, bovine et canine mais pas celles de souris, de rat, de lapin ou de cobaye. Ce fait renforce bien, d'une manière générale, l'importance de bien choisir son modèle expérimental lors d'étude d'une maladie humaine chez une espèce animale.

(Cartier 2003).

L'activité des lymphocytes T CD4⁺ est donc essentielle dans le contrôle de la réponse immunitaire anti-HSV alors que la réponse CD8⁺ est ici marginale.

La réponse cellulaire de l'hôte vis-à-vis de l'infection par HSV-1 est donc essentielle dans l'entrée en latence du virus et également dans la prévention de la réactivation de celui-ci. Cependant de nombreuses stratégies parfois complexes de contournement du système immunitaire ont été mises en place par ces virus, expliquant que cette réponse ne parvient pas à inhiber totalement les réactivations virales.

7.4. L'évasion du HSV vis-à-vis du système immunitaire

Nous avons signalé plus haut les nombreux moyens dont dispose les *Simplexvirus* pour contourner les défenses immunitaires tant innées (interféron) que adaptatives (inhibition de la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺). Nous ne reprendrons pas ici ces notions. Nous développerons par contre les moyens de contourner l'action des IgG et du complément. Le HSV est en effet également capable d'inhiber l'effet des anticorps et du complément *in vivo*. La glycoprotéine C (gC) inhibe l'activité des protéines C3, C5 et properdine du complément (Wakimoto 2003). Par ailleurs la gE est capable d'inhiber la fixation de la sous unité C1q au fragment Fc des IgG et inhibe la voie classique d'activation du complément par les IgG (Wakimoto 2003).

De plus la glycoprotéine E (gE) en se fixant sur le fragment Fc des IgG bloque la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (Lubinski 2002).

Les HSV présentent donc de nombreuses stratégies d'inhibition de la réponse immunitaire, aussi bien innée que adaptative. Toutes les protéines virales du HSV précédemment citées trouvent leurs homologues chez le CeHV-1, laissant supposer que ce dernier utilise les mêmes moyens pour contourner les défenses immunitaires du macaque, son hôte électif.

8. Le réservoir animal naturel du CeHV-1

8.1. Les espèces concernées naturellement

L'infection par le CeHV-1 a été décrite principalement chez les macaques rhésus (*Macaca mulatta*) et les macaques crabiers (*Macaca fascicularis*), deux espèces particulièrement utilisées dans la recherche biomédicale.

Le CeHV-1 a été également isolé chez le macaque à face rouge ou macaque brun (*Macaca arctoides*), le macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*), le macaque japonais (*Macaca fuscata*), le macaque bonnet chinois (*Macaca radiata*), et le macaque de Formose

(*Macaca cyclopis*) (Weigler 1992). Il a également été montré l'infection de macaques du Tibet (*Macaca thibetana*), de macaques à queue de lion (*Macaca silenus*) et de macaques de Tonkean (*Macaca tonkeana*). Il est à noter que la comparaison des séquences et l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction des génomes viraux ont démontrés l'existence de différentes souches entre les isolats de CeHV-1 des différentes espèces de macaques (Smith 1998). L'infection par le CeHV-1 a été décrite principalement chez les macaques rhésus (*Macaca mulatta*) et les macaques crabiers (*Macaca fascicularis*), deux espèces particulièrement utilisées dans la recherche biomédicale (voir plus haut les problèmes de souches virales en fonction des espèces de macaques et voir annexe 3 pour la description des aires de répartition des différentes espèces animales).

Il existe toute fois une colonie de macaques crabiers indemne de toute infection par le CeHV-1. La colonie de macaques crabiers isolée sur l'île Maurice est en effet indemne de toute infection par le CeHV-1, à tel point qu'il n'est pas nécessaire de réaliser de test sérologique anti-CeHV-1 avant l'importation de ces animaux en France. Il faut toutefois être prudent une fois ces animaux arrivés en France et éviter tout contact entre ces animaux et des macaques d'une autre origine car ces animaux sont tout à fait sensible à l'infection par le CeHV-1.

Le fait que les macaques crabiers de l'île Maurice soient indemnes peut s'expliquer par la façon dont cette colonie a été formée. Cet isolat provient de la fondation d'une population par importation par l'homme il y a 400 ans d'une quarantaine d'animaux fondateurs (Lawler 1995). Il s'agissait d'animaux en provenance de Java (d'après des critères génétiques Kondo 1993). Ces animaux ont été transportés comme animaux de compagnie par des marins (Portugais ou peut-être Hollandais selon certains). Les animaux adultes à bord d'un bateau son très difficiles à maîtriser tandis que les animaux juvéniles se laissent manipuler sans grand risque pour les hommes. Les animaux juvéniles étaient très certainement exempts du virus ce qui explique l'absence du virus dans la population actuelle qui comprend plus de 40 000 animaux revenus à l'état sauvage. Il est par contre difficile d'évoquer qu'en 400 ans (soit 100 générations) la population soit parvenue à devenir totalement résistante au virus. En effet le virus CeHV-1, peu pathogène chez le macaque exerce peu ou pas d'effet sélectif¹.

¹ Remarque : On retrouve ici un parallélisme avec le SIV et les cercopithèques de St Kiddy et de la Barbade. Comme à l'île Maurice, des animaux juvéniles ont été introduits il y a 3 à 4 siècles et contrairement aux populations africaines indigènes, les animaux de ces isolats génétiques insulaires sont indemnes des virus SA8, SIV et SV40. Comme dans le cas de la production du virus polio atténué pour le vaccin où il a été choisit d'utiliser des singes verts africains provenant d'une colonie totalement indemne de toute infection par le SIV, il est plus sûr d'utiliser des macaques provenant de colonies totalement indemnes d'infection par le CeHV-1. Cela n'est cependant pas toujours possible car il n'existe qu'une seule espèce de macaque à l'île Maurice (*Macaca fascicularis*) et les animaux y présentent un très faible polymorphisme génétique préjudiciable à certaines études scientifiques. Il faut toutefois se garder de généraliser et souligner que tous les isolats génétiques ne sont pas forcément indemnes de toute infection. La colonie de macaques rhésus de l'isolat artificiel de Cayo Santiago de Porto Rico n'est en effet absolument pas indemne d'infection par le CeHV-1, bien au contraire la séroprévalence

Actuellement il n'a jamais été diagnostiqué de séropositivité vis-à-vis du CeHV-1 chez les singes africains. Ainsi le *Macaca sylvanus*, connu en français sous le nom vernaculaire de macaque de Gibraltar ou magot (et en anglais sous le nom de barbary macaque), ne semble ne pas être naturellement porteur du CeHV-1. Cependant l'aire de répartition géographique de cet animal est vaste puisqu'elle comprend non seulement la localisation précaire sur le rocher de Gibraltar (artificiellement maintenu par renforcement des effectifs par importation récente d'animaux d'origine nord africaine) mais surtout les territoires algériens et marocains (Atlas). Toutes les populations de magot sont loin d'avoir été étudiées. C'est en effet surtout les animaux de Gibraltar qui du fait de la proximité avec les touristes ont été étudiés. Nous avons recherché sans succès des publications scientifiques relatant la recherche, au moins sérologique, du virus dans les diverses populations de cette espèce. Seuls certains sites Internet signalent que des études récentes auraient été menées sur la population de Gibraltar qui serait indemne (autant que la sérologie réalisée permette de le dire) d'infection par le CeHV-1. Par ailleurs les rares animaux saisis en France par les douanes et en provenance du Maghreb ont été soumis à des tests sérologiques qui se sont tous révélés négatifs pour le CeHV-1.

Encore à propos de l'Afrique, il est important de noter que certains singes africains sont porteurs d'alphaherpèsvirus proches du CeHV-1. Ainsi le babouin est naturellement porteur de l'herpès virus papio 2, le singe vert africain du SA8 et le chimpanzé d'un herpès virus récemment décrit et appartenant au genre *Simplexvirus*, le ChHV. Dans ce contexte il est étrange de constater que de nombreuses espèces de *Cercopithecinae* africains sont porteurs de virus du genre *Simplexvirus* et que le seul macaque africain serait indemne de tout herpes simplex alors qu'il dérive de la même espèce ancestrale qui a donné naissance aux macaques asiatiques qui sont eux tous porteurs du CeHV-1.

8.2. Les espèces sensibles en captivité ou expérimentalement

Il a cependant été décrit de nombreuses infections par le CeHV-1 chez d'autres espèces de singes, pour lesquelles cette infection est fréquemment fatale. Une infection accidentelle a ainsi été décrite chez huit cercopithèques de Brazza (*Cercopithecus neglectus*) probablement contaminés par des macaques à queue de lion (Thompson 2000), chez trois singes patas ou singes rouges (*Erythrocebus patas*) et chez un colobe à épaules blanches (*Colobus abyssinicus*) ayant été en contact avec des macaques rhésus dans des zoos nord-américains (Loomis 1981). Enfin il a été décrit l'infection accidentelle d'une autre espèce de singes du Nouveau-Monde des singes capucins sajou apelle (*Cebus apella*) probablement contaminés par des macaques rhésus dans un laboratoire de recherche allemand (Coulibaly 2004).

de l'infection y dépasse les 70% (Jensen 2004).

Il a également été étudié l'infection expérimentale par le CeHV-1 chez ces espèces de singes du Nouveau Monde. Cette infection expérimentale aura induit une maladie neurologique fatale chez au moins deux espèces de singes du Nouveau Monde, des singes capucins sajou appelée (*Cebus apella*) et des ouistitis (*Callithrix jacchus*) (Weigler 1992).

Il a enfin été étudié l'infection expérimentale par le CeHV-1 chez les animaux de laboratoire. Il en ressort que l'animal de laboratoire le plus sensible décrit jusqu'à présent est le lapin, en effet l'injection intradermique, intrapéritonéale, ou intracérébrale de cet agent, mais aussi l'exposition à des aérosols contenant celui-ci, induit une maladie neurologique fatale et reproductible chez le lapin. Chez d'autres espèces comme la souris, le rat, le cobaye ou le chien, l'injection intracérébrale ou intrapéritonéale et l'exposition à des aérosols infectieux n'induit aucune maladie (Sabin 1934, Chapell 1960).

8.3. L'infection des primates africains par les virus herpès du genre *Simplexvirus*.

Comme décrit dans le paragraphe 8.1 ci-dessus, il a donc été clairement établi qu'il existe une infection endémique par le CeHV-1 chez les macaques d'origine asiatique et que cette endémie ne semble toucher que l'Est et au Sud Est asiatique, épargnant naturellement les primates vivants sur les continents africains et américains.

Il existe cependant une infection naturelle des primates africains par des *Simplexvirus* simiens très proches du CeHV-1. Il existe en effet une infection naturelle des singes verts africains (*Chlorocebus aethiops*) par le *Cercopithecine herpesvirus 2* (simian agent 8, SA8) et une infection également naturelle des babouins (*Papio sp.*) par le *Cercopithecine herpesvirus 16* (herpesvirus papio 2, HVP-2). Ces deux virus sont donc très proches du CeHV-1 des macaques mais également des HSV humains en particulier sérologiquement (Katz 2002). Tous ces virus appartiennent au genre des *Simplexvirus*.

Tous les virus de ce groupe présentent des caractéristiques virologiques, génétiques, pathologiques et immunologiques très similaires, mais présentent également une spécificité d'hôte dans la nature remarquable. A l'heure actuelle le CeHV-1 est le seul herpès virus de singe connu pour pouvoir infecter occasionnellement et causer une maladie fatale chez l'homme.

Comme indiqué à la page 59, aucun cas d'infection par le CeHV-1 n'a été rapporté chez les magots africains. Il n'a pas non plus été rapporté d'infection par le SA8 ou l'HVP-2, deux herpès virus endémiques à l'Afrique. Malgré l'absence d'infection de ces macaques africains dans le milieu naturel, il est hautement probable que ces animaux puissent se contaminer par le CeHV-1 au contact de leurs homologues asiatiques en captivité étant donné la grande

variété d'hôte de primate pouvant être atteint par ce virus. Cela a été rapporté à de nombreuses reprises chez différentes espèces de singes du Nouveau Monde lors de contacts en captivité entre ces animaux et des macaques d'origine asiatiques porteurs du CeHV-1. Il est donc important de rappeler que les différentes espèces de primates surtout s'ils sont d'origine variée ne doivent être mélangés ou même avoir de simples contacts.

CHAPITRE III : LA MALADIE CHEZ L'ANIMAL : SES SYMPTOMES, SON DIAGNOSTIC ET SON TRAITEMENT

1. Les espèces de primates hôtes du CeHV-1 :

L'infection par le CeHV-1 touche à l'heure actuelle exclusivement les macaques d'origine asiatique et leurs descendants (pour plus de détails nous invitons le lecteur à se référer à la partie 8 du chapitre 2 traitant du réservoir naturel du virus CeHV-1).

En dehors des macaques d'Asie, d'autres espèces de singes sont sensibles à l'infection par le CeHV-1 lorsqu'ils sont exposés au virus en conditions artificielles (zoo ou animalerie expérimentale). Dans ces espèces, l'infection par le CeHV-1 est fréquemment fatale. Une infection a ainsi été décrite chez huit cercopithèques de Brazza (*Cercopithecus neglectus*) probablement contaminés par des macaques à queue de lion (*Macaca silenus*) séropositifs pour le CeHV-1 (Thompson 2000), trois singes patas ou singes rouges (*Erythrocebus patas*) et chez un colobe à épaules blanches (*Colobus abyssinicus*) ayant été en contact avec des macaques rhésus dans des zoos nord-américains (Loomis 1981). Il a enfin été décrit une infection accidentelle chez des singes capucins sajou apelle (*Cebus apella*) suite à une exposition en captivité de ces animaux à des macaques d'origine asiatique et porteurs du CeHV-1 (Coulibaly 2004). C'est dire l'importance de cloisonner efficacement les différentes espèces de primates en milieu captif.

Mise à part ces infections accidentelles d'animaux en captivité, il a été étudié l'infection expérimentale par le CeHV-1 chez deux espèces de singes du Nouveau-Monde ; des singes capucins sajou apelle (*Cebus apella*) et des ouistitis (*Callithrix jacchus*) qui ont développé une infection mortelle (Weigler 1992). En pratique, étant donné le large spectre d'hôte du CeHV-1, il est probable que les animaux naturellement indemnes d'infection par le CeHV-1, comme les singes africains (en particulier les *Macaca sylvanus*), soient tout de même sensibles à l'infection par le virus. Il est donc préférable de séparer les espèces de singes d'origine asiatique des singes d'origine africaine et du Nouveau-Monde. En effet il est à craindre le risque de contamination de ces animaux et de voir apparaître des animaux infectés par le CeHV-1. Ces animaux pouvant alors être parfois excréteurs asymptomatiques de virus comme il a été le cas au laboratoire de recherche de Aventis Pharma à Frankfurt, Allemagne, où des sajous apelle (*Cebus apella*) ont été contaminés par des macaques rhésus séropositifs pour le CeHV-1 sans que la possibilité de leur infection ne soit envisagée dans un premier temps (Coulibaly 2004).

2. Description clinique de la maladie animale

2.1. Les signes cliniques de la forme classique chez le macaque

2.1.1. *La primo-infection*

La durée d'incubation de la maladie induite par le CeHV-1 est de 2 à 5 jours chez le macaque. Le plus souvent, les infections naturelles sont subcliniques, en effet il aura fallu plus de 25 ans après son premier isolement chez l'homme pour redécouvrir le virus chez le macaque et enfin décrire la maladie induite par ce virus chez son hôte naturel (Keeble 1960). Ainsi l'incidence exacte de l'apparitions de signes cliniques lors de la primo-infection n'est pas connue, mais plusieurs expériences d'infection de macaques séronégatifs pour les anticorps anti-CeHV-1 ont montré que fréquemment les animaux s'infectaient par le virus puis excrétaient celui-ci localement dans leurs sécrétions muqueuses et se séroconvertissaient sans l'apparition d'aucun signe clinique locaux détectables (Lees 1991).

L'infection peut également se traduire par un syndrome fébrile et des symptômes locaux. Parfois les lésions locales s'accompagnent d'une réaction générale passagère et bénigne sous la forme de lymphadénopathies et d'un syndrome fébrile avec anorexie, faiblesse et irritabilité des animaux. L'isolement du virus dans la cavité buccale des animaux infectés expérimentalement est possible dès 6 heures post-infection alors qu'il n'y a aucun signe clinique (Lees 1991).

2.1.2. *La latence virale et les récurrences par réinfection endogène*

Elle est de règle dans la forme classique. Comme pour les virus herpès simplex chez les humains, le CeHV-1 peut devenir latent dans les ganglions sensoriels et causer des infections récurrentes chez les macaques. L'excrétion intermittente du virus dans la salive peut être accompagnée de lésions locales de type herpétiques, mais se produit très fréquemment chez les singes de manière totalement asymptomatiques (Huff 2003).

Les signes cliniques de la maladie peuvent être observés chez le macaque lors de la primo-infection mais également lors de récurrences de la maladie. Lors des récurrences, les animaux ne présentent le plus souvent aucune altération de l'état général en dehors parfois d'une légère hyperthermie, d'un léger jetage nasal mucopurulent qui disparaît après une dizaine de jours, d'une conjonctivite d'intensité variable ou enfin d'une diarrhée. Ces signes cliniques peuvent être accompagnés de lésions souvent discrètes voire indétectables au niveau oral, génital, oculaire et rarement cutané (Keeble 1960).

2.2. Aspect lésionnel.

Les lésions sont identiques dans la phase de primo-infection et lors des phases de récurrence.

2.2.1. *Sur le plan macroscopique :*

L'infection primaire de type buccal induit une gingivo-stomatite caractérisée par l'apparition de vésicules simples ou multiples qui se rompent en 3 ou 4 jours, laissant place à des ulcères. Ces ulcères mesurent de 5 millimètres à 2 centimètres de diamètre et jusqu'à 5 millimètres de profondeur. Les ulcères se développent rapidement en lésions fibrinonécrotiques qui forment une croûte hémorragique sur la lèvre ; dans la cavité buccale les lésions restent blanches et semblent fibrineuses. Les lésions intra buccales sont localisées le plus souvent sur la face dorsale de la langue et de la muqueuse buccale et au niveau de la jonction cutanéomuqueuse des lèvres. Les lésions peuvent également apparaître sur la peau et la conjonctive. Les lésions liées à l'infection primaire n'induisent généralement que des signes localisés légers chez les singes et guérissent par granulation sans laisser de cicatrice en 7 à 14 jours. Les signes cliniques de l'infection primaire sont habituellement légers et dans la plupart des cas ces signes sont indétectables. L'infection secondaire des lésions par des bactéries et des mycètes se produit parfois, aggravant alors les lésions et ralentissant la guérison de celle-ci (Weigler 1992).

2.2.2. *Sur le plan microscopique :*

L'examen histologique des tissus lésionnels montre que les lésions induites lors de l'infection par le CeHV-1 ressemblent à celles induites lors de l'infection par les virus herpès simplex chez les humains. Ces lésions ressemblent à celles observées dans les cultures cellulaires et sont caractérisées par une dégénérescence par ballonnisation (arrondissement du noyau et effondrement du cytoplasme avec apparition d'une forte réfringence) des cellules épithéliales, par une infiltration leucocytaire, par la formation de syncytiums, par la nécrose des cellules épithéliales et par la présence des corps d'inclusion intranucléaires éosinophiles dans les cellules en début de phase de dégénérescence (Keeble 1960, Anderson 1994, Weigler 1992, Ressig 1955). Une inflammation légère peut également être présente et varie en fonction du degré d'infection secondaire de lésions.

L'étude histologique du système nerveux central de macaques infectés par le CeHV-1 montre, dans 75% des cas, un engorgement leucocytaire des vaisseaux et une réaction inflammatoire microgliale dans la région des racines des nerfs trijumeaux et faciaux, ainsi que sur le trajet descendant de ces nerfs, il n'a cependant pas été noté de modification des neurones dans les régions atteintes (Keeble 1960).

2.3. Les formes cliniques atypiques

2.3.1. Chez les hôtes naturels du virus : les macaques d'Asie

Bien que l'infection par le CeHV-1 soit peu pathogène pour son hôte naturel voire le plus fréquemment asymptomatique, certains cas de maladie mortelle due au CeHV-1 ont été répertoriés chez le macaque. Plusieurs cas d'infection disséminée par le CeHV-1 ont été décrits chez des macaques rhésus et crabiers. Ces formes systémiques sont particulièrement graves et souvent mortelles.

2.3.1.1. La forme généralisée :

Une femelle macaque crabier primipare de 4 ans a du subir une césarienne pour dystocie. Après une période de 7 semaines de traitement antibiotique, l'animal a été euthanasié suite à la découverte d'une péritonite sévère lors d'une laparotomie exploratrice. Des lésions macroscopiques de type fibrineux ont été découvertes autour de l'intestin grêle, du pancréas, du caecum et du colon. Le foie contenait des foyers miliaires de couleur blanche, les poumons présentaient de multiples pétéchies pleurales et des indurations multifocales et l'utérus était friable et aminci en de nombreux endroits. L'analyse histopathologique des lésions citées mais également de la rate, de la moelle osseuse et des glandes surrénales a montré des corps d'inclusion intranucléaires eosinophiliques. L'analyse immunohistochimique s'est révélée positive pour le CeHV-1. Les sérums récoltés le jour de la mort de l'animal mais également 3 ans auparavant étaient séronégatifs pour l'herpès virose B. De plus le CeHV-1 a été isolé dans le sérum du singe récolté le jour de sa mort (Simon 1993).

Une épizootie d'infections au CeHV-1 a été rapportée à Davis en Californie dans une population de macaques bonnet chinois (*Macaca radiata*). Sur 79 animaux présents, 40 macaques ont présentés des signes cliniques et 16 sont décédés. Les signes cliniques étaient caractérisés par une conjonctivite, un coryza et de la léthargie chez les animaux malades. L'autopsie des animaux décédés a révélée la présence d'indurations pulmonaires avec de nombreux foyers hémorragiques, une splénomégalie et des mouchetures du foie. Aucune lésion des muqueuses n'a été détectée. L'examen histologique a révélé des foyers de nécrose étendus dans le foie, la rate, les nœuds lymphatiques et le cortex des glandes surrénales. Les poumons présentaient des lésions de pneumonie interstitielle lobaire ainsi que des inclusions de type herpétique. Le CeHV-1 a été isolé par culture à partir des poumons, du foie et de la rate d'animaux décédés (Palmer 1987).

2.3.1.2. La forme encéphalitique :

Un macaque rhésus développe une dermatite dans la région occipitale qui sera traitée par des antibiotiques locaux. Au bout d'une semaine avec aggravation de son état, le macaque

présente une faiblesse des pattes postérieures, de l'anorexie, une gingivite et des ulcérations des lèvres. 18 jours après les premiers symptômes, le macaque présenta de la diarrhée et de l'anémie ainsi que des troubles nerveux. L'animal décéda le jour suivant. L'autopsie révéla de multiples ulcères des lèvres, des foyers de nécrose de l'épithélium lingual et au niveau cérébral de multiples foyers de nécrose dans les noyaux gris centraux et la matière blanche adjacente. Tous les autres organes, en particulier le foie, la rate, les poumons et le tube digestif, sont apparus macroscopiquement et histologiquement normaux. Le CeHV-1 fut isolé par culture à partir de prélèvements oraux, anaux, linguaux et pulmonaires. L'inoculation du virus isolé à quatre macaques séronégatifs n'a pas induit de symptômes généraux chez ces animaux, mais les macaques se sont séroconvertis vis-à-vis du CeHV-1 et le virus a pu être isolé à nouveau à partir de prélèvements anaux, oraux et oculaires chez 3 des 4 animaux expérimentalement infectés (Daniel 1975).

On peut faire ici le parallèle entre cette forme de maladie encéphalitique à CeHV-1 chez le macaque et l'encéphalite à HSV chez l'homme. Les encéphalites à HSV chez l'homme sont rares mais présentent une mortalité de 70% en l'absence de traitement et la majorité des patients qui survivent présentent ensuite des séquelles graves.

2.3.1.3. La forme ophtalmique grave :

En juin 1992, une femelle macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) de 8 ans est isolée du reste de sa colonie en raison du manque de soin maternelle que celle-ci donne à son nouveau-né de un jour. Lors de son déplacement il est remarqué que celle-ci souffrait de blépharo-conjonctivite et sa température rectale était de 39°C. Aucune autre anomalie n'est observée chez cette femelle et trois jours plus tard les lésions disparaissent et le comportement maternel de la femelle redevient normal. A l'âge de 7 jours, le nouveau-né présente une conjonctivite de l'oeil droit et des lésions périorbitaires décrites comme des « petites cloques plates ». Ces lésions se sont aggravées en l'espace de trois jours et sont accompagnées de multiples lésions vésiculo-ulcéraires sévères de la face et de la tête. L'animal est euthanasié après un diagnostic présumé d'herpès virose B. Quelques petits foyers de nécrose ont été découverts à la surface et dans le parenchyme hépatique. De très nombreuses inclusions intranucléaires éosinophiles ont été découvertes à l'examen histologique dans les cellules épithéliales et dans les marges des foyers de nécrose hépatique. Il a enfin été rapporté une méningo-encéphalomyélite focale. Le CeHV-1 a été isolé à partir d'écouvillonnages réalisés au niveau des lésions cutanées, du foie et de la rate. Le sérum obtenu au moment de la mort de l'animal était négatif pour les anticorps anti-CeHV-1, la mère présentait une sérologie faiblement positive et constante au cours du temps vis-à-vis du CeHV-1 (Anderson 1994). Il est ici important de noter que les anticorps de la mère n'ont pas été retrouvés dans le sérum du

nouveau-né, alors qu'ils lui sont normalement transmis à travers le placenta avant la naissance. Ce fait pourrait s'expliquer par la faible séropositivité de la mère et pourrait être à l'origine de l'infection sévère qu'a subie le jeune animal. On peut faire un parallèle avec l'infection néonatale chez l'homme ; en effet il peut arriver que les nouveaux-nés humains puissent faire des herpès néonataux pouvant se présenter sous deux formes graves. Cet herpès néonatal peut être de type disséminé à tous les organes (comme dans le cas du jeune macaque cité précédemment) ou localisé au système nerveux central. Le nouveau-né est le plus souvent contaminé au passage par les voies génitales de la mère qui présente à ce moment là une récurrence herpétique.

En janvier 1993, une femelle macaque rhésus (*Macaca mulatta*) de 8 mois est isolée du reste de sa colonie en raison d'une conjonctivite bilatérale avec atteinte cornéenne. Des ulcères ont été détectés sur la jonction cutanéomuqueuse de la lèvre inférieure et la langue. L'animal est euthanasié après un diagnostic présumé d'herpès virose B. Les lésions macroscopiques observées se limitèrent aux yeux et à la bouche, cependant il a été découvert une méningo-encéphalomyélite similaire au précédent cas bien que d'intensité plus faible. Des inclusions intranucléaires éosinophiles ont été découvertes à l'examen histologique dans les cellules épithéliales de la langue, des amygdales et de la partie antérieure de l'œsophage. Le CeHV-1 a été isolé à partir de la conjonctive, de la langue et de la rate. Le sérum obtenu au moment de la mort de l'animal était négatif pour les anticorps anti-CeHV-1 (Anderson 1994).

Tous ces cas bien que rares démontrent la possibilité d'une infection systémique naturelle des macaques, hôte naturel du CeHV-1. La possibilité de maladie systémique doit être connue car au cours de cette atteinte généralisée multiorganes, la production et l'excrétion de virus est massive, augmentant les risques de transmission aux autres animaux mais surtout à l'homme. Il est à noter de surcroît que dans tous ces cas le diagnostic étiologique n'a été établi qu'après la mort des animaux infectés.

2.3.1.4. Les formes aggravées par une immunodépression :

De nombreux autres cas d'atteinte systémique de macaques ont été rapportés. Ces autres cas d'atteintes atypiques des macaques, hôtes naturels du CeHV-1, ont été mis en relation avec une immunodépression des animaux atteints. L'origine de ces immunodépressions aura été iatrogène, par un traitement immunosuppresseur, ou virale. Toutes ces formes d'infection atypiques de macaques par le CeHV-1 sont donc exceptionnelles et souvent intercurrentes avec d'autres phénomènes favorisants. Cependant il est très important de savoir reconnaître ce type de pathologie afin de prendre toutes les précautions nécessaires pour le personnel et les animaux aux alentours car lors de ce type d'infection les animaux atteints sont très fortement

porteurs et sont sans doute excréteurs de CeHV-1. Il faut enfin noter que dans plusieurs cas les animaux se sont avérés très fortement porteurs de virus voire virémiques alors qu'ils étaient séronégatifs pour les anticorps anti-CeHV-1.

- immunodépression iatrogène¹ :

Quatre groupes de 14 macaques crabiers ont été utilisés pour un essai pharmaceutique d'une drogue immunosuppressive. Les animaux ont été séparés en 4 groupes, un contrôle et trois groupes recevant chacun 1X, 3X et 10X de la drogue immunosuppressive. Aucun animal des groupes contrôle, 1X et 3X n'a présenté de signe clinique quelconque. Dans le quatrième groupe recevant la plus haute dose de drogue immunosuppressive trois animaux sur les quatorze ont développés des ulcères oraux et/ou linguaux plus ou moins marqués, des vésicules dans la cavité orale, sur la langue et/ou les lèvres après 12 à 13 semaines de traitement. Un de ces animaux développa un jetage nasal et des difficultés respiratoires. Le CeHV-1 a été isolé des lésions par culture virale (malgré un prélèvement de mauvaise qualité) chez deux des trois animaux présentant des ulcères. De manière intéressante, les trois animaux atteints étaient séronégatifs deux semaines avant le début de l'étude, puis après l'apparition des lésions, deux animaux restèrent séronégatifs et un présenta une légère séroconversion vis-à-vis du CeHV-1. Il a été observé de plus une augmentation forte des titres en anticorps contre le CeHV-1 chez 47 des 56 animaux avec 8/14, 14/14, 13/14 et 12/14 des animaux respectivement des groupes contrôle, 1X, 3X et 10X. L'examen histologique des lésions permit enfin de détecter des corps d'inclusion intranucléaires éosinophiles dans les cellules épithéliales (Chellman 1992).

Un groupe de 12 macaques rhésus a été utilisé pour une étude médicamenteuse de la phénylbutazone. Quatre groupes avaient été réalisés, recevant chacun 0, 200, 400 ou 600 mg par jour de phénylbutazone par voie orale. Un des animaux, qui recevait une dose de 400 mg par jour, a commencé à développer de l'anorexie avec perte de poids et est devenu léthargique au bout de 36 jours d'administration de la phénylbutazone. Le traitement a immédiatement été stoppé. L'examen hématologique a révélé une anémie sévère et une leucocytose modérée.

¹ Remarque : Ce type d'infection grave due à un herpès virus peut se retrouver dans les mêmes conditions chez l'homme. Il a été, par exemple, rapporté au CHU Rangueil de Toulouse en 2005 trois cas d'infection disséminée sévère à HSV-2 avec virémie positive survenant chez deux transplantés hépatiques et un transplanté rénal (Basse In : 5^{ème} Congrès Annuel de la Société Francophone de Transplantation, Tours 2005). Pour les transplantés hépatiques, il y avait par ailleurs une hépatite aiguë spécifique à HSV-2. La mise en route d'un traitement rapide par Acyclovir a permis une guérison rapide. On voit donc bien ici que les traitements immunosuppresseurs utilisés actuellement chez l'homme peuvent induire des infections graves à HSV. Il n'est donc pas étonnant que ces mêmes traitements, lorsqu'ils sont testés chez des animaux d'expérience comme les macaques, puissent induire également de telles infections graves et disséminées à CeHV-1 chez le macaque. Dans ces conditions l'excrétion de virus est très importante et l'ensemble des organes de l'animal est contaminé par le CeHV-1 d'où un risque accru pour les personnes qui manipuleraient cet animal. Il est par contre totalement exclu de traiter ces animaux par des drogues antivirales comme on le fait chez l'homme (pour plus de précisions sur ce sujet, nous invitons le lecteur à se référer à la dernière partie de ce chapitre)

L'animal est décédé le jour suivant l'arrêt du traitement. L'autopsie a révélé que l'animal était particulièrement émacié et présentait une stomatite ulcéreuse. Des ulcères discrets étaient présents sur la muqueuse buccale, linguale et jugale. Des nombreuses zones d'ulcération de la muqueuse de la portion distale de l'œsophage et un large ulcère de la grande courbure de l'estomac ont été relevés. Le parenchyme hépatique était parsemé de larges zones de nécrose blanche et des foyers de nécrose ont été également détectés dans la rate et le cortex des glandes surrénales. L'examen histologique des lésions a montré la présence de corps d'inclusions intranucléaires dans les cellules épithéliales des lésions nécrotiques du foie, de la rate, des glandes surrénales, de l'œsophage et de la bouche. La microscopie électronique a montré la présence intranucléaire de particules virales de type herpès virus dans les tissus de la langue, du foie et des glandes surrénales (McClure 1973).

- immunodépression virale¹ :

Deux femelles macaques crabiers âgées de 7 ans, nées en captivité dans un centre de recherche médicale américain et hébergées ensemble pendant quatre mois, sont décédées à deux semaines d'intervalle. Le premier animal a été découvert hypothermique (33°C), hypoglycémique (glucose 22mg/dl) et est mort malgré les traitements le jour suivant. Le second animal présente une dyspnée, des bruits respiratoires rauques, un jetage nasal et des plaques adhérentes oropharyngées de couleur jaune et blanche. Un examen hématologique révèle une leucopénie, une lymphopénie et une relative neutrophilie ; l'animal est également légèrement anémique et hypoprotéïnémique. Après deux jours de traitement antibiotique, l'état de l'animal se dégrade et il est euthanasié. L'autopsie des deux animaux est réalisée. Le premier singe présentait une nécrose sur toute son épaisseur de pratiquement toute la muqueuse œsophagienne et gastrique, la muqueuse étant recouverte d'une pseudomembrane fibrinonécrotique. Le larynx et le pharynx présentaient des zones d'ulcération multifocales à coalescentes mais la langue et le reste de la bouche étaient macroscopiquement normaux. Le parenchyme hépatique présentait des foyers miliaires de couleur jaune d'un diamètre d'environ 2 mm. Le premier singe présentait également des épanchements péricardiques de liquide clair et des épanchements pleuraux et péritonéaux de liquide trouble et fibrineux contenant de nombreux macrophages et neutrophiles dégénérés. Les poumons étaient de couleur rouge sombre et présentaient des indurations. Le second singe présentait des zones d'ulcération de la face dorsale de la langue, du pharynx et du larynx. L'œsophage et le cardia présentaient de nombreux foyers d'ulcération et nécrose. Le parenchyme hépatique était parsemé de zones pales irrégulières tout comme les glandes surrénales et enfin il a été noté une splénomégalie marquée. Il a été découvert également un épanchement péritonéal de

¹ Remarque : De la même manière, chez l'homme il été rapporté que les patients atteints de SIDA peuvent présenter des lésions herpétiques cutanées chroniques et/ou disséminées dues à HSV (Erlich 1989).

liquide de couleur jaune. Les poumons étaient de couleur rouge sombre. L'examen histologique a révélé la présence de corps d'inclusion intranucléaires dans les cellules épithéliales et syncytiales adjacentes aux lésions nécrotiques dans tous organes atteints du second singe mais pas chez le premier singe. Les cultures réalisées avec des échantillons de tissu lingual du second singe se sont révélées positives pour le CeHV-1. Il faut toutefois noter qu'au moment de leurs décès le premier animal était séropositif pour les anticorps anti-CeHV-1 mais pas le second. Le sérum du premier singe était un mois plus tôt négatif pour ces mêmes anticorps. Les deux animaux étaient également séropositifs pour le rétrovirus simien immunosuppresseur de type D qui a peut être favorisé le développement d'une infection fatale à CeHV-1 (Carlson 1997).

2.3.2. *Les formes cliniques dans les autres espèces de primates sensibles (en dehors de l'homme)*

Les hôtes occasionnels non humains du CeHV-1, qui sont principalement des singes du Nouveau-Monde, présentent fréquemment des formes cliniques graves.

Il a ainsi été rapporté des infections fatales chez trois *Erythrocebus patas* et un *Colobus abyssinicus* en 1981. Deux patas sont décédés en deux semaines après avoir présenté de l'anorexie, de la dépression et des paupières supérieures enflées. Le troisième patas et le colobe ont présentés des signes cliniques identiques mais sont décédés en seulement deux jours. L'autopsie des animaux permit de découvrir des ulcères et des vésicules des paupières, de multiples foyers rougeâtres de la surface des poumons et des foyers miliaires de nécrose du foie, de la rate et des glandes surrénales. L'analyse histologique des lésions précédemment citées montra des lésions d'ulcération ainsi que des inclusions eosinophiliques. Enfin le colobe présenta également des lésions de myélite associées à des inclusions eosinophiliques dans les neurones de la moelle épinière. Il a été rapporté que ces animaux étaient en contact de deux macaques rhésus séropositifs dont un des deux présenta des lésions vésiculeuses orales durant l'épizootie (Loomis 1981).

En 1981, une manifestation de la maladie herpétique s'est développée dans une colonie de cercopithèques de Brazza (*Cercopithecus neglectus*). Sept animaux parmi huit ont été infectés et ont développés des signes cliniques de lésions vésiculaires et ulcératives sur les lèvres, la langue ou le palais. Un singe âgé de trois semaines a été examiné en raison de son incapacité de s'accrocher à sa mère (1^{er} jour de l'épizootie). L'examen a révélé des ulcérations sur la langue, le palais dur et mou et les pieds arrières. Plus tard le jeune singe a développé une diarrhée grave, un oedème facial et est mort le 6^{ème} jour d'une septicémie. Le 3^{ème} jour, la mère de ce jeune a développé un jetage nasal séreux qui a évolué en un jetage mucopurulent. La mère développa également des lésions ulcérées de la langue et du palais dur et mou. Enfin la mère développa une septicémie et mourut le 10^{ème} jour de l'épizootie. La soeur plus âgée

du jeune précédemment cité développa des lésions orales et une sialorrhée le 8^{ème} jour. Cet animal a ultérieurement développé une conjonctivite, de l'épiphora et de l'opacité cornéenne bilatérale qui a duré jusqu'au 38^{ème} jour. Aux 8^{ème} et 10^{ème} jours, il aura été observé des lésions ulcératives orales sur deux autres singes. Enfin au 14^{ème} jour, deux derniers singes ont développé des lésions ulcératives de la langue et du palais dur et mou. Un de ces deux derniers singes est mort 4 jours plus tard d'une infection systémique. Une souche de CeHV-1 a été isolée à partir de différents prélèvements chez les animaux (Thompson 2000).

Un autre cas de contamination de primates non macaque par le CeHV-1 a été rapporté plus récemment. L'infection décrite dans une colonie de sept singes capucins (*Cebus apella*) était persistante mais asymptomatique. Les capucins n'ont montré aucun signe clinique de la maladie ou de lésions au niveau des muqueuses buccales ou génitales au moment des prélèvements par écouvillons. Quatre capucins ont montré une sérologie positive pour le CeHV-1 en 1997 puis à nouveau en 2001 et au moins une PCR positive pour le CeHV-1 à partir d'écouvillons oraux ou conjonctivaux en 2001. Trois de ces mêmes animaux auront également une PCR positive pour le CeHV-1 sur un échantillon de leur sérum démontrant une virémie chez ces animaux malgré l'absence de lésions macroscopique lors de leur autopsie ultérieure. Un autre des capucins montra une sérologie négative pour le CeHV-1 en 1997 puis positive en 2001, les PCR spécifiques du CeHV-1 réalisées à partir d'écouvillons oraux ou conjonctivaux se sont révélées positives en 2001. Enfin les deux derniers capucins ne montrèrent aucune sérologie positive pour le CeHV-1 ni en 1997, ni en 2001 alors que les PCR spécifiques du CeHV-1 réalisées à partir d'écouvillons oraux se sont révélées positives en 2001. Un des deux animaux présenta même une virémie démontrée par PCR sur son sérum (Coulibaly 2004).

A la lumière de ces différents cas on peut observer que l'infection des espèces de primates non macaques semble en règle générale induire une maladie systémique grave accompagnée d'une atteinte sévère du système nerveux. Les maladies occasionnées par ces infections présentent de grandes similitudes avec celle observée chez l'homme, lui-même hôte occasionnel du virus, en cas de contamination par le CeHV-1. Le dernier cas décrit ci-dessus d'épizootie chez des singes capucins montre le problème de gestion des primates non macaques en contact de macaques infectés par le CeHV-1. En effet lors de cette épizootie les macaques, des rhésus et des macaques bruns, à l'origine de la contamination des singes capucins diagnostiqués séropositifs et excréteurs de virus furent euthanasiés alors que les singes capucins eux aussi séropositifs furent épargnés. Ces animaux furent épargnés car avant cette étude publiée en 2004 il était admis que ces animaux ne pouvaient être infectés par le CeHV-1 sans développer une maladie systémique fatale. Ces animaux furent donc conservés

en animalerie pendant cinq ans alors qu'ils étaient porteurs du CeHV-1 et que celui-ci était détectable dans leur cavité buccale. Cet exemple montre l'importance de séparer les espèces de primates hôtes naturels du CeHV-1, les macaques d'origine asiatique, et les autres espèces de primates afin de prévenir le risque de contamination entre ces espèces et le risque que cela peut engendrer pour les personnes en contact avec ces animaux.

2.3.3. *Les formes cliniques chez les animaux de laboratoire en dehors de primates*

Dans la littérature, nous avons retrouvé trace d'inoculations expérimentales aux espèces suivantes : le lapin, la souris, le rat, le cobaye, le poulet. L'espèce la plus sensible est le lapin, les autres animaux testés sont inconstamment sensibles en fonction des souches étudiées ou des méthodes d'inoculation. La souris et le cobaye ne développent que de manière inconstante des symptômes suivant l'inoculation du CeHV-1, ces deux espèces animales semblent en effet peu sensibles à l'infection par le CeHV-1. Certaines souches de ce virus semblent toutefois présenter une virulence accrue chez la souris (Whitley 2001). L'inoculation d'une souche de virus isolée chez le macaque rhésus a été montrée avirulente chez le rat et le poulet, les animaux inoculés développèrent toutefois une immunité humorale spécifique du CeHV-1 (Whitley 2001). D'une manière générale tous les essais d'infection expérimentale, y compris les expériences princeps de Sabin que nous avons développées dans l'introduction historique, chez les animaux de laboratoire décrits dans la littérature suggèrent que le lapin est probablement l'animal de laboratoire le plus utile. Le CeHV-1 se réplique de manière très efficace chez cet animal et induit des symptômes importants chez celui-ci.

La maladie développée par les lapins suite à une injection intradermique est très proche de la maladie humaine. Les animaux infectés présentent des lésions vésiculeuses et nécrotiques localement au niveau du site d'inoculation, une rétention urinaire et une paralysie flasque progressive ascendante. La mort des lapins intervient enfin par arrêt respiratoire. Les lapins sont en réalité atteints d'une encéphalomyélite ascendante présentant une progression très comparable à celle observée dans les cas de contamination humaine. Cette particularité observée chez le lapin en a fait un animal de choix dans les études de test d'agents antiviraux ou pour la mise au point de vaccin contre le CeHV-1 (Boulter 1980, Zwartouw 1989).

Le développement des modèles animaux de l'infection par le CeHV-1 a cependant été limité en raison du manque de drogues antivirales ou de vaccin protecteur prévus spécifiquement pour traiter ou prévenir l'infection par ce virus. Le risque encouru par les manipulateurs de ces animaux infectés par ce virus est également très grand, ce qui nécessite la manipulation dans une animalerie de biosécurité niveau 4 aux USA et de niveau 3 en Europe (voir chapitre 5 pour de plus amples détails), ce qui limite encore les possibilités d'utilisation de ces

animaux.

3. L'épidémiologie de l'herpès virose B chez les macaques

3.1. Le réservoir de virus

Les espèces concernées ont déjà été décrites dans la partie 8, chapitre 2 de cette thèse. Nous invitons le lecteur à s'y référer pour plus de détails.

Les macaques asiatiques sont les hôtes naturels du CeHV-1. L'incidence des infections par le CeHV-1 est maximale au moment et après la maturité sexuelle des animaux. Lors d'une infection expérimentale au niveau buccal par le CeHV-1 de quatre macaques crabiers, aucun signe clinique n'a été observé chez les animaux, le virus a cependant été détectable dans la cavité buccale des animaux dès le 2^{ème} jour post-infection (Lees 1991). Comme nous l'avons déjà indiqué précédemment, l'infection naturelle par le CeHV-1 chez le macaque présente des caractéristiques très proches de l'infection humaine par les virus des herpès simplex humain. Chez les macaques cependant, à de rares exceptions près, seules des manifestations bénignes sont observées et bien souvent l'infection des animaux passe inaperçue. Il est toutefois important de noter que contrairement aux virus humains (HSV-1 et -2), le CeHV-1 ne présente pas de tropisme particulier pour les muqueuses orales ou ano-génitales et infecte les deux de manière indifférente. On peut donc rencontrer des lésions (ou détecter la présence de virus) au niveau des muqueuses buccales, anales et génitales.

Chez le macaque, il a été démontré que l'infection par le CeHV-1 est latente, comme chez l'homme pour l'infection aux HSV1 et 2, et les animaux infectés le sont à vie. La séroprévalence est de l'ordre de 80 à 100% dans le milieu naturel chez les macaques rhésus adultes.

Des signes cliniques sont parfois observés au sein d'un groupe d'adultes et l'infection peut alors induire des signes cliniques locaux relativement bénins caractérisés par des lésions de type herpétique au niveau des muqueuses de la langue et des lèvres (les lésions sur les muqueuses sexuelles n'ayant pas été recherchées), la prévalence de ces signes cliniques est de l'ordre de 2,3% (Keeble 1960).

3.2. La prévalence de l'infection

La prévalence réelle de l'infection par le CeHV-1, comme pour beaucoup d'autres herpès virus, n'est pas directement quantifiable. En effet, le seul moyen permettant de réaliser un diagnostic de certitude quand au statut d'un animal donné vis-à-vis de l'herpès virose B, est de rechercher la présence de virus dans les ganglions trijumeaux et sacrés de l'animal. Cette

recherche n'est malheureusement pas réalisable du vivant de l'animal. Un premier moyen de pallier cette carence consiste à rechercher les anticorps dirigés contre le CeHV-1 dans le sérum des animaux ce qui permet de détecter la très grande majorité des animaux infectés. On obtient ainsi la séroprévalence de l'infection par le CeHV-1. Cependant il peut arriver qu'un animal porteur du virus ne soit pas sérologiquement positif. Un second moyen consiste à rechercher la présence du CeHV-1 au niveau des différentes muqueuses de l'animal. Cette technique très spécifique permet d'obtenir la prévalence de l'excrétion du CeHV-1 parmi une population de macaques. Cette technique est cependant très peu sensible en ce qui concerne la prévalence totale de l'infection par le virus car seul un pourcentage limité d'animaux infectés est excréteur de virus à un moment donné. Enfin une troisième méthode de diagnostic consiste à rechercher la présence de lésions de type herpétique au niveau des muqueuses des animaux. Cette technique est très peu sensible et dangereuse car de très nombreux animaux sont en réalité excréteurs asymptomatiques de virus.

Il faut donc bien séparer la notion de prévalence d'infection des animaux désignant le pourcentage d'animaux porteurs du virus, qui est une donnée difficilement accessible, de la notion de séroprévalence désignant le pourcentage des animaux ayant développé des anticorps spécifiques vis-à-vis du CeHV-1. Les animaux ayant développés des anticorps spécifiques vis-à-vis du CeHV-1, sauf dans le cas d'un résultat sérologique faussement positifs, sont des animaux obligatoirement porteurs à vie du CeHV-1. Il faut aussi différencier la notion de prévalence d'animaux malades et ou excréteurs qui renseigne plus sur les risques de contamination inter-individu que sur la prévalence réelle de l'infection.

La séroprévalence en anticorps dirigés contre le CeHV-1 au sein de la population de macaques asiatiques est variable mais toujours élevée et elle augmente avec l'âge des animaux. Ainsi, elle s'approche de 80% dans la population générale et 100% chez les macaques adultes dans le milieu sauvage (Engel 2002). Des enquêtes épidémiologiques menées au Etats-Unis, à Porto Rico, en Russie et au Canada sur des animaux en captivité ont montré que la séroprévalence chez l'adulte était comprise entre 50 et 97% (Weigler 1990, Kessler 1990, Nguyen 1990). Une étude menée au Brésil dans une colonie de macaques, a révélé une séropositivité pour le CeHV-1 chez 45% des macaques rhésus et plus de 70% des macaques crabiers (Andrade 2003). Une autre étude menée au Japon a montré que la prévalence sérologique de l'infection par le CeHV-1 était de 34% chez les macaques japonais, 53% chez les macaques rhésus et 60% chez les macaques crabiers (Sato 1998).

La séroprévalence CeHV-1 augmente avec l'âge des animaux, en effet, celle-ci est faible à nulle chez les animaux âgés de moins de 3 ans et atteint 70% à 100% chez les animaux adultes (Engel 2002, Weir 1993).

La prévalence de l'infection, telle qu'on peut la déduire de la séroprévalence, est donc très élevée dans le milieu naturel. La mortalité est par contre extrêmement faible chez les hôtes naturels du virus, il n'a en effet été décrit que quelques rares cas d'infection disséminée mortelle par le CeHV-1 chez des macaques rhésus et crabiers. Le plus souvent cette infection grave est associée à une immunosuppression profonde viro-induite ou expérimentale des sujets atteints.

3.3. Transmission du virus

Chez le macaque, l'infection par rapports sexuels a longtemps été pressentie comme un mode majeur de transmission du virus, mimant le mode de transmission des HSV humains.

La transmission verticale du CeHV-1 n'a jusqu'à présent pas été clairement démontrée. En effet les nouveau-nés ne semblent pas être porteur du virus et les anticorps anti-CeHV-1 présents chez eux sont d'origine maternelle et décroissent avec le temps. Cependant il a été décrit certains cas d'infection de jeunes animaux par leur mère ou d'autres adultes les côtoyant (Zwartouw 1984). La protection des anticorps transmis par la mère au nouveau-né *in utero* et par le colostrum n'est donc pas totale (voir également page 66)

La voie de transmission sexuelle n'est pas la seule en cause, car il semble qu'elle ne soit responsable que de 23 % des transmissions du CeHV-1 entre les macaques pubères. La voie traumatique par griffure et surtout morsure serait en réalité prépondérante (Weigler 1995). L'augmentation brusque de la séroprévalence chez les animaux pubères serait due à l'augmentation des bagarres entre les animaux au moment puis après la puberté.

Il été montré par PCR que le virus pouvait être détectable chez les animaux séropositifs aussi bien dans les sécrétions salivaires, génitales que conjonctivales et ce même en l'absence de signes cliniques visibles au niveau des muqueuses (Huff 2003).

Il est important de noter qu'une étude menée chez des macaques rhésus séropositifs à rapporté que l'excrétion du virus n'était détectable par PCR dans les sécrétions muqueuses qu'en période de reproduction des animaux. Ainsi la prévalence de l'excrétion virale chez ces animaux variait de 0% (0/374) en avril et en juillet contre 14,6% (21/144) en période de reproduction, c'est à dire le mois de décembre, sans que cette excrétion ne soit associée à l'apparition de signes cliniques évoquant des lésions de type herpétique (Huff 2003). Ainsi les périodes de reproduction suivant la puberté des jeunes animaux sont particulièrement propices à leur infection en raison de l'augmentation de l'excrétion virale chez les animaux atteints et

de l'augmentation des contacts et bagarres entre les animaux.

La voie de transmission par aérosols, bien que démontrée efficace expérimentalement chez le macaque rhésus et chez le lapin, semble être limitée en conditions naturelles (Chappell 1960). La voie majeure de transmission du CeHV-1 reste donc le contact direct entre les animaux. Cependant il a été rapporté des cas de contamination d'animaux n'ayant jamais été en contact direct entre eux, des voies de contamination indirecte ont alors été envisagées, par l'intermédiaire des soigneurs ou de leur matériel par exemple (Coulibaly 2004).

L'encagement collectif des animaux est un facteur de risque supplémentaire. En effet le risque de contamination entre animaux est très faible si ceux-ci demeurent en cage individuelle (Weigler 1992). En collectivité, d'autant plus si la densité animale est importante, les risques de contamination des animaux par le virus sont beaucoup plus importants en raison des contacts et bagarres occasionnés.

Toutes les études sérologiques menées chez les macaques indiquent que les animaux se séropositivent au moment de la puberté, cela indiquerait donc que l'infection de ces animaux se produit principalement à cette période. On a ainsi une augmentation des risques d'infection par le CeHV-1 lorsque les singes vieillissent, lors des périodes de reproduction, après leur capture ou leur quarantaine et lorsqu'ils sont mis en cage dans les groupes à forte densité animale.

3.4. Saisonnalité des récurrences et des transmissions

Il semblerait donc que le virus soit excrété par les animaux porteurs latents principalement en période de reproduction. Les infections récurrentes peuvent donc prendre un rythme saisonnier. Cependant d'autres facteurs favorisent les récurrences et ainsi la contamination d'autres animaux lorsque ceux-ci sont en captivité. La capture et la mise en quarantaine des animaux induisent un stress qui favorise les réactivations de l'infection mais également les bagarres (Zwartouw 1984).

Comme beaucoup d'herpès viroses, l'infection par le CeHV-1 est une infection latente et se caractérise par des infections récurrentes comme dans le cas par exemple de l'infection à virus herpès simplex chez l'homme. Le virus a été isolé, chez des animaux séropositifs mais ne présentant aucun signe clinique, dans les ganglions nerveux trigéminés et lombo-sacrés. Des études montrent que lors de cette infection latente qui dure toute la vie de l'animal après sa contamination, les taux d'anticorps chutent dès 18 mois après la primo-infection et, en l'absence de récurrence récente, la sérologie peut dans certains cas devenir négative (Zwartouw 1984).

Cette latence de l'infection chez les animaux contaminés, avec un portage à vie du virus dans les ganglions innervant la région cutané-muqueuse par laquelle le virus est entré, est identique en de nombreux points à l'infection par les herpès virus simplex humains.

3.5. Parallèle avec l'épidémiologie de l'infection par les HSV chez l'homme

Chez l'homme le réservoir des HSV est constitué par des personnes infectées abritant les virus dans les ganglions sensitifs, les excréant par intermittence au niveau de la cavité buccale ou des muqueuses génitales et les transmettant par contact rapproché, intime. L'infection HSV-1 (région céphalique, herpès oro-labial, oculaire) se transmet par contact direct avec un sujet excréant du virus lors d'une primo-infection, d'une récurrence ou d'une excrétion virale asymptomatique présente aussi dans la salive. La transmission d'HSV-2 se fait par contact génital (mais aussi par contact orogénital). C'est une maladie sexuellement transmissible. L'infectiosité des lésions est majeure, en particulier lors d'une primo-infection, mais l'excrétion virale asymptomatique est un facteur épidémiologique capital dans la transmission d'HSV-2. Selon des études prospectives sur des couples hétérosexuels, le taux annuel de transmission d'HSV-2 est de 10 % (transmission plus fréquente dans le sens homme-femme que dans le sens femme-homme). Par ailleurs, 70 % des contagions surviennent en période d'excrétion virale totalement asymptomatique. En France, 70 % des adultes sont séropositifs pour HSV-1 : l'infection survient tôt dans l'enfance et la prévalence est encore plus élevée dans les pays pauvres et en voie de développement. L'herpès génital est en progression dans les pays développés depuis une vingtaine d'années : environ 107 millions de personnes sont infectées dans le monde, et en France il touche environ 2 millions de personnes. L'acquisition d'HSV-2 se fait à partir de l'âge de 15 ans et les facteurs de risque sont liés principalement à la sexualité, en particulier le nombre élevé de partenaires sexuels, une sexualité précoce et des antécédents de maladies sexuellement transmissibles. Une séropositivité HSV-2 est un marqueur de l'infection herpétique génitale toujours susceptible de réactivation. En France, le taux de séropositivité HSV-2 dans la population générale est de 15 à 17 % ; il passe à 57 % chez les consultants de MST.

Si on compare avec l'épidémiologie de l'infection par le CeHV-1 chez le macaque, il faut prendre en compte le fait que ce virus présente une localisation mixte au niveau des muqueuses (orales et génitales). Comme décrit précédemment, on peut retrouver chez les macaques les modalités de transmission des deux HSV chez l'homme. Étant donné les taux de prévalence des HSV-1 et HSV-2 chez l'homme, respectivement plus de 70% et moins de 20%, on comprend également que le mode de transmission le plus fréquent du virus CeHV-1 chez le macaque soit les contacts rapprochés (engagement collectif ou bagarres) plutôt que

uniquement les transmissions par voie sexuelle.

4. Le diagnostic biologique des macaques malades et porteurs

4.1. Sérologie

4.1.1. Tests de neutralisation, RIA, Western Blot et ELISA

4.1.1.1. Tests de neutralisation

Cette méthode est la méthode historique de sérodiagnostic. Elle permet également d'obtenir un résultat sérologique qualitatif. En effet seuls les anticorps neutralisants pour le CeHV-1 sont détectés par cette technique. Cette méthode présente donc l'avantage d'une bonne spécificité mais souffre d'une sensibilité plus faible que les méthodes radio-immunologiques ou ELISA.

Les premiers tests de neutralisation ont été pratiqués par incubation du CeHV-1 en présence du sérum à tester puis en inoculant le virus à des lapins, animaux très sensibles à l'infection par le CeHV-1 et en recherchant l'apparition de signes d'infection chez les animaux inoculés (Melnick 1954). La culture du virus sur cellules a permis d'adapter cette technique lourde d'inoculation à l'animal, à l'utilisation de la culture cellulaire. Il est alors recherché l'effet cytopathique du virus sur des cellules de rein de singe (Kalter 1978).

Le test de neutralisation reste un test de référence à l'heure actuelle, cependant sa mise en œuvre reste lourde en raison de la pathogénicité du CeHV-1 et sa réalisation nécessite un laboratoire d'un niveau de confinement 3.

4.1.1.2. Dosages radio-immunologiques

L'équipe de Lees a mis au point un test sérologique fondé sur la technique du dosage radio-immunologique pour détecter la présence d'immunoglobuline anti-CeHV-1 d'une manière quantitative et qualitative. Ainsi grâce à un test radio-immunologique par capture d'anticorps les auteurs ont pu quantifier les immunoglobulines anti-CeHV-1 de la classe des IgM et de la classe des IgG dans le sérum de macaques infectés expérimentalement (Lees 1991 et se reporter au paragraphe 7.2.1. du chapitre 2 de cette thèse pour plus de détails concernant la technique employée par les auteurs). Ce type de test a ainsi permis aux auteurs de décrire avec précision la mise en place de la réponse humorale chez les macaques lors d'une primo-infection.

Cette même équipe utilisa également un test radio-immunologique compétitif. Le test mettait en compétition la fixation des anticorps de sérums de souris hyperimmunisées contre le CeHV-1 et les anticorps des sérums de macaques infectés. Grâce à ce test les auteurs ont pu

obtenir un résultat quant à la qualité des anticorps présents dans le sérum des macaques. Ils ont pu ainsi montrer que ce type de test leur permettait d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus par les tests de séroneutralisation et permettrait ainsi selon eux de remplacer les tests de neutralisation (Lees 1991 et se reporter au paragraphe 7.2.1. du chapitre 2 de cette thèse pour plus de détails concernant la technique employée par les auteurs).

4.1.1.3. Le Western Blot

La technique de Western Blot est la première technique qui a permis de distinguer avec certitude les sérums contenant des anticorps spécifiques du CeHV-1 de ceux contenant des anticorps spécifiques d'autres *Simplexvirus* proche de ce dernier. Ce problème de spécificité se pose cependant rarement pour les sérums de macaque.

Les antigènes provenant de cellules infectées et non infectées par le CeHV-1 sont soumis à une migration par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide avant d'être transférés sur membrane de nitrocellulose. Chaque membrane est mise en contact avec les sérums à tester et révélée par des anticorps anti-immunoglobulines humaines marquées. Cette technique, relativement lourde à mettre en œuvre, n'est pas la technique la plus sensible mais demeure la technique de référence pour l'identification des anticorps dépistés.

4.1.1.4. Les tests ELISA

La méthode ELISA est à l'heure actuelle la méthode la plus rapide pour le diagnostic sérologique du CeHV-1. Cette méthode est également facile à mettre en œuvre et très sensible.

D'une manière générale, la méthode ELISA pour le diagnostic sérologique du CeHV-1 suit le principe suivant :

- adsorption sur une plaque ou une bille des antigènes viraux, incubation des sérums de macaque à tester et fixation des anticorps spécifiques du CeHV-1 sur les antigènes présents.
- les anticorps de macaques fixés sur les antigènes viraux sont ensuite détectés par un système couplé à une enzyme (le plus souvent une anti-immunoglobuline humaine).
- révélation de la fixation des anticorps de macaque sur les antigènes par adjonction du substrat de l'enzyme puis quantification de la réaction enzymatique.

Le test ELISA est la méthode la plus sensible mais ne permet pas de différencier les sérums contenant des anticorps spécifiques du CeHV-1 de ceux contenant des anticorps spécifiques d'autres *Simplexvirus*. Ce test n'est donc pas très adapté au diagnostic sérologique chez

l'homme, mais convient parfaitement au diagnostic sérologique chez le macaque. De ce point de vue l'utilisation de test ELISA contenant des antigènes extraits de HSV-1 ou -2 pour tester les sérums de macaques peut s'avérer tout à fait satisfaisant (nous l'avons-nous même confirmé : voir la partie expérimentale de cette thèse dans le chapitre VII).

- les antigènes viraux alternatifs : SA8, HVP-2 et HSV

La production d'extraits antigéniques issus de cultures cellulaires du CeHV-1 pour leur utilisation dans les tests radio-immunologiques, le Western Blot et l'ELISA est bien entendu la meilleure solution afin de préparer un test de qualité. Cependant les risques sanitaires qui accompagnent la culture de ce virus ont amené de nombreux chercheurs à tester des extraits antigéniques provenant d'autres *Simplexvirus* proches du CeHV-1.

L'utilisation d'un test ELISA basé sur le SA8 a été testée comme alternative à l'utilisation du CeHV-1. Lors de cette étude des sérums de macaques crabiers ont été testés par deux tests ELISA vis-à-vis de l'herpès virose B. Un test ELISA fut produit à partir d'extraits antigéniques issus de culture de CeHV-1 et un second à partir d'extraits antigéniques issus de culture de SA8. Ainsi 100% des 72 animaux positifs dans le test ELISA contenant des antigènes de CeHV-1 étaient également positifs dans un test ELISA contenant des antigènes de SA8. Deux sérums donnés négatifs dans le premier test furent donnés positif dans le test basé sur SA8 et un sérum négatif dans le premier test était douteux dans le test basé sur SA8. Ces données indiquent donc que les anticorps dirigés contre le CeHV-1 pourrait être détectés de manière efficace par un test ELISA basé sur des antigènes issus de SA8. L'utilisation de SA8 serait bien entendu moins risquée d'un point de vue sanitaire (Takano 2001).

Ohsawa et al, ont mené une étude sérologique sur 349 animaux de sept espèces de macaques différentes. Les sérums de ces animaux ont été testés par trois tests ELISA vis-à-vis de l'herpès virose B. Un premier test ELISA fut produit à partir d'extraits antigéniques issus de culture de CeHV-1, un deuxième à partir d'extraits antigéniques issus de culture de HSV-1 et un troisième à partir d'extraits antigéniques issus de culture d'*Herpesvirus papio 2*. Les auteurs prirent comme référence les résultats obtenus avec le test ELISA avec des antigènes de CeHV-1 et classèrent les résultats des animaux comme positifs, négatifs ou douteux. Les auteurs ont ainsi pu déterminer que la sensibilité du test HSV-1 était de 96% en comparaison avec le test ELISA CeHV-1. Les 4% de résultats discordants se subdivisaient en : 1% des animaux positifs dans le test CeHV-1 étaient douteux avec le test HSV-1 et 3% des animaux positifs dans le test CeHV-1 étaient négatifs dans le test HSV-1. De la même manière, les auteurs ont déterminé que la sensibilité du test HVP-2 était de 98% avec 2% des animaux positifs dans le test CeHV-1 qui étaient négatifs dans le test HVP-2 (Ohsawa 1999).

On peut donc voir ici que les tests ELISA basés sur les antigènes de SA8, de HSV-1 ou de HVP-2 permettent d'obtenir d'excellents résultats en comparaison avec un test ELISA basé sur le CeHV-1. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que le SA8, le HSV-1 et le HVP-2 sont des virus présentant une sécurité de manipulation beaucoup plus grande que le CeHV-1 (niveau de confinement biologique 3). Il existe toutefois un grand avantage dans l'utilisation de HSV-1 qui réside principalement dans la disponibilité de nombreux kits commerciaux. Ces kits ELISA présentent en effet l'avantage d'être validés et certifiés mais permettent aussi de s'affranchir totalement de toute manipulation de virus pour la préparation d'extraits antigéniques. Nous présenterons dans le chapitre 7 de cette thèse les travaux que nous avons réalisés sur la détection des anticorps anti-CeHV-1 chez le macaque grâce à un test ELISA basé sur des antigènes issus de HSV-1/-2¹.

- les antigènes recombinants du CeHV-1

Toujours pour des raisons de sécurité, il a été produit et testé des glycoprotéines recombinantes du CeHV-1 pour leur potentiel diagnostique. Les glycoprotéines B, C, E et G ont ainsi été produites par des cellules d'insecte (Sf-9) grâce à un système d'expression utilisant un baculovirus, et la glycoprotéine D a été produite par des cellules de hamster (CHO). L'efficacité diagnostique des tests utilisant ces protéines recombinantes a été réalisée sur 40 sérums de macaques déclarés négatifs et 75 sérums de macaques déclarés séropositifs pour le CeHV-1 par identification par un test ELISA utilisant des extraits antigéniques complets de CeHV-1 et par Western Blot.

La sensibilité des tests utilisant comme antigènes cibles des protéines recombinantes gB, gC, gD et gG étaient respectivement de 100%, 97%, 88% et 80% par rapport à la méthode référence précédemment citée. La spécificité des tests utilisant des protéines recombinantes gB, gC et gD était de 100% et celle du test utilisant la glycoprotéine recombinante gG était de 97%. En revanche la spécificité et la sensibilité du test utilisant la glycoprotéine recombinante gE étaient faibles. Des sérums humains HSV-1 et HSV-2 positifs ont réagi avec les glycoprotéines recombinantes gB et gD mais pas avec la gG.

Cela indique donc que les tests utilisant les glycoprotéines B, C, D, et G ont un potentiel diagnostique élevé pour le sérodiagnostic de l'infection par le CeHV-1 chez les macaques, tandis que la glycoprotéine G peut être un antigène valable pour la discrimination entre les anticorps induits par le CeHV-1 et ceux induits par d'autres alphaherpèsvirus étroitement liés

¹ Nous verrons qu'il existe un réel avantage à utiliser un mélange d'antigènes HSV-1 et HSV-2 pour dépister les anticorps anti-CeHV-1 chez les macaques (voir chapitre VII).

comme HSV-1 et -2 chez l'homme (Perelygina 2005).

L'utilisation de glycoprotéines recombinantes dans un but de sérodiagnostic semble donc être une alternative très intéressante à l'utilisation d'extraits antigéniques complets du CeHV-1. Il est tout de même ici important de rappeler qu'il faut porter une attention particulière au système mis en œuvre pour la production de ces glycoprotéines. En effet comme indiqué et détaillé précédemment dans le chapitre 2, il a été démontré que la glycosylation des glycoprotéines des herpès virus est essentielle pour la conservation des propriétés antigéniques de ces protéines. Or cette même glycosylation est dépendante du type cellulaire qui les produit. Il serait donc judicieux d'utiliser des cellules autologues, ou issues d'espèces phylogénétiquement proches (comme des cellules de type Vero provenant de singe vert africain par exemple), pour produire ces protéines recombinantes mais aussi bien entendu pour produire tout extrait antigénique de virus quel qu'il soit.

- la réactivité croisée des anti-immunoglobulines humaines et des immunoglobulines de macaques

La sérologie anti-CeHV-1 pratiquée aujourd'hui dans tous les laboratoires nécessite l'emploi d'anti-immunoglobulines couplées à une enzyme afin de détecter la fixation d'éventuels anticorps de macaques dans la technique ELISA, mais également dans le cadre du Western Blot. Les différentes études menées jusqu'à maintenant dans le cadre de la sérologie des macaques vis-à-vis du CeHV-1 ont été réalisées grâce à des anti-immunoglobulines humaines. Ces anti-immunoglobulines sont en effet facilement disponibles, existent couplées à différentes enzymes et sont relativement bon marché. Il se pose cependant le problème de la réactivité croisée entre ces anti-immunoglobulines humaines et les immunoglobulines de macaques. La sensibilité du test mise en œuvre pour la détection des anticorps anti-CeHV-1 dans un sérum de macaque dépend donc en partie de la réactivité des anti-immunoglobulines employées dans ce test.

Peu d'études ont été réalisées pour quantifier cette réactivité croisée, il s'avère pourtant capital de vérifier l'importance de cette réactivité croisée pour l'anti-immunoglobuline qui a été choisit pour détecter les anticorps de macaque dans le test que l'on pratique et ainsi vérifier la pertinence du test pratiqué.

L'analyse des gènes codant pour les sous classes d'immunoglobuline G (IgG) de macaque rhésus et crabier a permis de différencier trois sous classes d'IgG¹ chez ces animaux (IgG1, 2

¹ Une quatrième sous classe d'IgG a été récemment décrite chez le macaque rhésus. Cette sous classe d'IgG est homologue à la sous classe IgG4 humaine (Scinicariello 2004)

et 3). La structure primaire (séquence en acides aminés) au niveau de la partie constante de ces trois sous classes d'IgG de macaque présentaient peu de différences avec celle des parties constantes des immunoglobulines humaines (homologie supérieure à 95%) (Calvas 1999). Il est donc raisonnable de penser que les anti-immunoglobulines humaines puissent de manière tout à fait efficace réagir avec les immunoglobulines de macaque.

D'une manière générale, il est conseillé d'utiliser des anti-immunoglobulines humaines sans spécificité de classe ou spécifiques des chaînes γ humaines et de s'assurer que cette anti-immunoglobuline réagit bien de manière efficace avec les anticorps de macaque.

Une méthode alternative a été utilisée par certains auteurs. Le sérum à tester est tout d'abord incubé dans des puits recouverts d'antigènes viraux d'une part et dans des puits témoins négatifs recouverts de lysats de cellules non infectées d'autre part. La révélation de la réaction a fait appel à la protéine A biotinylée reconnaissant le fragment Fc des IgG et à un complexe avidine-phosphatase alcaline. Le rapport des densités optiques entre les solutions des puits témoins négatifs et des puits recouverts d'antigènes viraux a ensuite été calculé. Le test était considéré comme positif lorsque le rapport des densités optiques était supérieur ou égal à 3,5 ; indéterminé pour un rapport compris entre 2,5 et 3,5 et négatif pour un rapport inférieur à 2,5 (Freifeld 1995).

4.1.2. Problèmes posés par la sérologie :

Le diagnostic de l'infection par le CeHV-1 chez les macaques par l'intermédiaire d'un test sérologique peut parfois poser problème. En effet, la recherche des anticorps spécifiques du CeHV-1 ne permet pas toujours de refléter la présence du virus chez un animal. Il existe des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

4.1.2.1. Les sérologies faussement négatives.

Plusieurs cas de résultats sérologiques faussement négatifs ont été rapportés.

Cas 1 : il a été rapporté le cas d'une femelle macaque crabier qui a développé, à la suite d'une césarienne, une infection disséminée sévère à CeHV-1. Le sérum de cet animal prélevé le jour de sa mort et 3 ans avant sa mort était négatif pour les anticorps dirigés contre le CeHV-1 (tests sérologiques réalisés au VRL « Virus Reference Laboratory » à San Antonio, Texas, USA). Le CeHV-1 a pourtant pu être isolé dans le sérum du singe récolté le jour de sa mort (Simon 1993).

Cas 2 : un macaque à queue de cochon (*Macaca nemestrina*) nouveau-né a présenté sept jours après sa naissance une conjonctivite de l'oeil droit et des lésions périorbitaires. Ces lésions se sont aggravées en l'espace de trois jours et sont accompagnées de multiples lésions vésiculo-ulcératives sévères de la face et de la tête. L'animal présenta également une méningo-

encéphalomyélite focale. Le CeHV-1 a été isolé à partir d'écouvillonnages réalisés au niveau des lésions cutanées, du foie et de la rate. Le sérum obtenu au moment de la mort de l'animal était négatif pour les anticorps anti-CeHV-1 et la mère présenta une sérologie faiblement positive et constante au cours du temps vis-à-vis du CeHV-1 (Anderson 1994).

Cas 3 : en janvier 1993, une femelle macaque rhésus (*Macaca mulatta*) de 8 mois est isolée du reste de sa colonie en raison d'une conjonctivite bilatérale avec atteinte cornéenne. Des ulcères ont été détectés sur la jonction cutanéomuqueuse de la lèvre inférieure et la langue. Il est découvert une méningo-encéphalomyélite similaire au précédent cas. Le CeHV-1 a été isolé à partir de la conjonctive, de la langue et de la rate. Le sérum obtenu au moment de la mort de l'animal était négatif pour les anticorps anti-CeHV-1 (Anderson 1994).

Il apparaît donc à la lumière de ces cas que des macaques peuvent être infectés par le CeHV-1 bien que l'on soit incapable de détecter des anticorps sériques chez ces animaux. La sérologie ne permet donc pas, y compris grâce aux méthodes les plus sensibles comme l'ELISA, de détecter l'ensemble des animaux infectés par le CeHV-1. La séoprévalence dans une population de macaques est donc différente de la prévalence de l'infection réelle par le CeHV-1.

En dehors de ces cas, l'immunodépression peut diminuer l'efficacité de la réponse humorale et donner lieu à des faux négatifs. Les animaux immunodéprimés peuvent parfois devenir négatifs à la sérologie alors qu'ils étaient séropositifs avant l'immunodépression tout en demeurant infectés par le virus, mais surtout des animaux séronégatifs immunodéprimés peuvent développer une infection par le CeHV-1 sans produire aucun anticorps vis-à-vis du virus et ainsi rester séronégatifs malgré l'infection.

Cas 1 : Au cours d'une étude sur une drogue immunosuppressive, trois macaques crabiers recevant une forte dose ont développés des ulcères oraux et/ou linguaux plus ou moins marqués, des vésicules dans la cavité orale, sur la langue et/ou les lèvres après 12 à 13 semaines de traitement. Un de ces animaux développa un jetage nasal et des difficultés respiratoires. Le CeHV-1 a pu être isolé des lésions par culture virale. Les analyses sérologiques par méthodes ELISA menées chez les trois animaux atteints donnèrent des résultats négatifs deux semaines avant le début de l'étude ; puis après l'apparition des lésions deux animaux restèrent encore séronégatifs et un présenta une légère séroconversion vis-à-vis du CeHV-1. (Chellman 1992)

Cas 2 : Au cours d'une étude rétrospective sur les résultats sérologiques de macaques rhésus utilisés pour des essais d'allogreffe rénale, six animaux ayant subi une irradiation totale lymphoïde qui étaient séropositifs au début de l'étude sont devenus séronégatifs vis-à-vis du CeHV-1 (Olson 1991).

4.1.2.2. Les sérologies faussement positives

- Faux positifs par réactivité croisée

Il peut également se poser le problème de résultats faussement positifs. De tels résultats peuvent apparaître en raison de réactivités croisées qui existent entre les anticorps produits en réponse à des virus antigéniquement proches. Toute fois cette remarque ne s'applique pas à l'exemple des macaques d'origine asiatique car ces animaux ne peuvent être infectés par le SA8 ou le HVP-2 en l'absence de contact avec des animaux d'origine africaine. Par ailleurs il a souvent été évoqué la possibilité d'une infection des macaques par les HSV humains. Une recherche bibliographique exhaustive ne nous a pas permis de retrouver de preuve que les macaques puissent être infectés par les virus humains. Au contraire le macaque est le plus souvent défini comme une espèce naturellement résistante à l'infection par ces virus.

Une étude de réactivité croisée a été réalisée entre des sérums issus de macaques rhésus, de singes verts africains (*Chlorocebus aethiops*), de langurs (*Presbytis spp.*), de babouins (*Papio spp.*) et d'humains vis-à-vis de six alphaherpèsvirus (CeHV-1, herpès papio 2, SA8, langur herpès virus et HSV-1 et -2). Les macaques rhésus sont naturellement infectés par le CeHV-1, les singes verts africains par le SA8, les babouins par l'herpès papio 2, les langurs par le langur herpès virus (récemment découvert et non encore officiellement classé) et l'homme par les herpès simplex humains. Tous ces sérums montrèrent pourtant une forte réactivité croisée par une méthode ELISA avec les différents antigènes utilisés (Katz 2002).

Il apparaît donc qu'un résultat séropositif pour le CeHV-1 chez une espèce autre que le macaque doit être pris avec précaution, éventuellement vérifié par Western Blot, mais surtout confirmé par la recherche du CeHV-1 chez cet animal, soit par isolement viral, soit par recherche du génome du virus par PCR.

- La fausse positivité par réactivité vis à vis d'antigènes cellulaires

Les tests sérologiques nécessitent l'emploi d'antigènes viraux. Or ces antigènes viraux ne peuvent être produits qu'à partir de culture cellulaire. Pour utiliser ces antigènes viraux, il est nécessaire de les extraire à partir de ces cultures cellulaires. Les antigènes viraux ainsi obtenus sont donc généralement contaminés par des antigènes provenant des cellules utilisées pour la culture. Il peut arriver que les animaux, essentiellement dans le cas de maladies auto-immunes, présentent des anticorps capables de reconnaître les antigènes contaminants d'origine cellulaire. Dans ce cas le test sérologique pourra être faussement positif.

Une méthode permettant de s'affranchir de ce problème a été mise au point par le docteur

Nakamura. Elle consiste à diluer les sérums à tester dans un extrait antigénique des cellules identiques à celles utilisées pour préparer l'antigène viral mais indemnes de toute infection virale. De cette manière la fixation des auto-anticorps naturels ou des anticorps naturels anti-espèces (dans le cas de la méthode employée par le docteur Nakamura, il s'agit d'anticorps naturels anti-cellule Vero) sur les antigènes cellulaires adsorbés sur la plaque est inhibée par compétition avec les antigènes cellulaires solubles apportés en excès (Nakamura communication personnelle au Pr. Blancher)

4.2. Polymérisation en chaîne (PCR)

4.2.1. *Le prélèvement*

La méthode de prélèvement pour la PCR la plus utilisée sur les animaux vivants est l'écouvillonnage. On utilise des écouvillons stériles en coton ou en Dacron pour le prélèvement de salive mais surtout de fragment de muqueuse. Le prélèvement est réalisé en frottant l'écouvillon sur la muqueuse apparemment saine à prélever (buccale, oculaire, vaginale, anale ou du prépuce) ou sur les lésions (ulcères ou vésicules) si elles existent. L'ADN peut être directement extrait ou l'écouvillon est laissé à sécher à l'air pendant 10 à 15 minutes puis placé dans un emballage stérile et étanche. L'ADN est ainsi stable jusqu'à un mois à température ambiante et jusqu'à 6 mois à -20°C. Lors de l'extraction de l'ADN, l'écouvillon est placé dans tube contenant une solution d'extraction de l'ADN puis pressé et roulé contre les parois du tube. L'ADN peut ensuite être purifié selon diverses techniques couramment utilisées en biologie moléculaire. Lors de la manipulation de l'animal au moment du prélèvement et de l'écouvillon jusqu'à l'extraction de l'ADN, il sera de rigueur d'observer toutes les précautions possibles afin d'éviter une éventuelle contamination humaine par le CeHV-1. Le port d'une blouse lavable, de gants, de masques et de lunettes de protection est ici un minimum.

La PCR peut également être pratiquée sur tous les types de tissus prélevés par biopsie sur les animaux vivants ou lors d'une autopsie sur les animaux morts. Généralement les biopsies concernent des lésions herpétiformes en vue d'obtenir un diagnostic de certitude quant à la nature de l'agent responsable. La recherche de l'ADN viral par PCR est également très intéressante sur des tissus prélevés lors d'une autopsie. En effet il peut alors être prélevé les ganglions trijumeaux et les ganglions sacrés de l'animal qui sont les lieux privilégiés de latence du CeHV-1 (Vizoso 1975, Weigler 1995).

Un exemple de procédure de prélèvement et d'envoi d'échantillon proposé par le laboratoire « Viral Immunology Center » Atlanta, Georgia, USA est également disponible en annexe 5.

4.2.2. *Les techniques*

De nombreuses méthodes de détection de l'ADN du CeHV-1 par PCR ont été développées. La parenté phylogénique proche du CeHV-1 avec les autres *Simplexvirus* comme le *Cercopithecine herpesvirus 2* (SA8), le *Cercopithecine herpesvirus 16* (HVP2), mais aussi les herpes virus simplex humains (HSV-1 et HSV-2) a amené les chercheurs à développer différentes méthodes de PCR permettant d'amplifier spécifiquement l'ADN du CeHV-1. Les séquences des amorces citées ci-dessous sont regroupées dans le tableau 4.

Tableau 3 : Séquences des amorces pour la détection spécifique de l'ADN du CeHV-1

Amorce	Séquence
gGS4	CCGCGTACGACTACGAGATCC
gGAS4	GTTCGCGGCCACGATCCA
RhBVgB_F	GGTGATCGACAAGATCAACGC
RhBVgB_P	TCTGCCGCTCGACGGCAAAGTAC
RhBVgB_R	GCCGTGCTCTCCATGTTGTT
gGBV_323_F	TGGCCTACTACCGCGTGG
gGBV_403_P	CCGCCCTCTCCGAGCACGTG
gGBV_446_R	TGGTACGTGTGGGAGTAGCG
gC_1352_F	CGAGATGGAGTTCGGGAGCGGCGA
gC_1646_R	GGTCACCTGCTGGCCCACGGGGTC
gC_1410_F	GTGGAGCTGCAGTGGCTGCT
gC_1558_R	AGCCGGCAGGTGTACTCGCT

Hirano *et al.* ont mis au point une PCR en un temps permettant de distinguer l'ADN du CeHV-1 de celui de ces autres virus. Les amorces publiées pour réaliser cette PCR sont les suivants : gGS4 directe et gGAS4 indirecte ; le cycle d'amplification pratiqué est 94°C pendant 5 min, puis 35 cycles (94°C, 1 min ; 55°C, 1 min ; 72°C, 2 min), suivis d'une extension finale à 72°C pendant 7 min. Cette réaction de PCR a permis aux auteurs d'amplifier une bande de 203 à 209 paires de bases sur différentes souches de CeHV-1 issues de macaques rhésus, de macaques crabiers, de macaques à queue de lion et de macaques à queue de cochon, mais pas de HSV-1, HSV-2, SA8 ou HVP-2. Il est important de noter en outre que les auteurs ont réalisé la réaction d'amplification en présence de 1,5M de bêtaïne (Hirano 2002).

L'emploi de la bêtaïne à une concentration de 1 à 1,5M lors de la réaction d'amplification de l'ADN apparaît comme essentiel (Hirano 2000). En effet il a été démontré que l'adjonction de quantités croissantes en bêtaïne dans les réactions de PCR réalisées sur des échantillons de CeHV-1 a permis d'améliorer de manière très importante l'efficacité de ces réactions et ainsi

d'augmenter la sensibilité de ces réactions (Hirano 2000). Le bénéfice obtenu par l'adjonction de bétaïne tiendrait dans sa capacité à faciliter la séparation des doubles brins d'ADN du CeHV-1 qui sont naturellement particulièrement stables en raison de la forte teneur de celui-ci en bases guanine et cytosine (75%).

Il a également été développé des méthodes de PCR quantitative pour la détection de l'ADN du CeHV-1.

Huff *et al.* ont développé une PCR quantitative basée sur la détection d'une séquence de 77 paires de bases contenue dans le gène codant pour la glycoprotéine B. Ils ont ainsi utilisé avec succès les amorces de PCR quantitative suivantes : amorce directe RhBVgB_F et amorce indirecte RhBVgB_R avec la sonde RhBVgB_P, afin de détecter spécifiquement la présence de l'ADN du CeHV-1 dans des extraits d'ADN issus d'écouvillons réalisés sur des macaques rhésus. La sensibilité de cette PCR quantitative a été estimée à 10 copies de génome par réaction (Huff 2003).

Perelygina *et al.* ont quant à eux développé une PCR quantitative basée sur la détection d'une séquence de 124 paires de bases contenue dans le gène codant pour la glycoprotéine G. Les amorces de PCR quantitative utilisées sont les suivantes : amorce directe gGBV_323_F et amorce indirecte gGBV_446_R avec la sonde gGBV_403_P. Une sensibilité de 100% a été obtenue grâce à cette PCR quantitative avec une quantité de 50 copies de génome par réaction (Perelygina 2003).

Il a enfin été mis au point par Coulibaly *et al.* une PCR nichée permettant d'amplifier spécifiquement un fragment de 148 paires de bases. Cette méthode comprend une première PCR amplifiant un fragment de 294 paires de bases du gène codant pour la glycoprotéine gC utilisant les amorces suivantes : gC_1352_F directe et gC_1646_R indirecte ; le cycle d'amplification pratiquée est 95°C pendant 10 min, puis 40 cycles (95°C, 30 sec ; 60°C, 30 sec ; 72°C, 40 sec), suivis d'une extension finale à 72°C pendant 7 min. Une seconde PCR nichée amplifiant un fragment de 148 paires de bases du gène codant pour la glycoprotéine gC est ensuite réalisée avec 10% du produit de la réaction précédente en utilisant les amorces suivantes : gC_1410_F directe et gC_1558_R indirecte ; le cycle d'amplification pratiqué est 95°C pendant 10 min, puis 40 cycles (95°C, 30 sec ; 56°C, 30 sec ; 72°C, 40 sec), suivis d'une extension finale à 72°C pendant 7 min (Coulibaly 2004). Encore une fois les auteurs ont réalisé leurs réactions de PCR en présence de bétaïne (1M).

4.3. L'étude du pouvoir infectieux *in vitro*

Le CeHV-1 se réplique de manière efficace sur des lignées cellulaires continues de singes de l'Ancien-Monde comme les cellules Vero ou sur cultures primaires de cellules de rein de

singe vert, mais tout aussi bien sur des cellules de rein de lapin ou sur les cellules HeLa d'origine humaine (Weigler 1992). La réplication du virus sur les cultures cellulaires induit généralement la formation de syncytiums. Des inclusions intranucléaires éosinophiles peuvent être observées après fixation et coloration des cellules cultivées infectées par le virus. La réplication du virus sur les cultures cellulaires de rein de singe induit des effets cytopathogènes.

Les modifications morphologiques consistent en un gonflement des cellules et une disparition du nucléole suivie par la margination et la diminution progressive de la chromatine nucléaire. Des corps d'inclusion intranucléaires éosinophiles apparaissent au centre du noyau là où la chromatine a disparue. Au cours des stades tardifs de l'infection, les corps d'inclusion remplissent le noyau et forment des corps d'inclusion dits « Cowdry type A », typiques des infections herpèsvirales (Ressig 1955).

Les particules virales apparaissent dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées quelques heures seulement après l'inoculation. Les premières particules extracellulaires sont visibles à la surface de cellules gonflées mais encore intactes à peu près en même temps que des premières particules infectieuses deviennent détectables dans le milieu de culture, soit dès la 6^{ème} heure (Ressig 1955).

4.4. Les tests d'inhibition du pouvoir pathogène *in vitro*

Le test d'inhibition du pouvoir pathogène du virus par les anticorps a été l'outil diagnostique prédominant pendant de nombreuses décades. Cependant cette méthode utilisée dans un premier temps manquait de spécificité et n'est plus utilisée aujourd'hui.

Les tests d'inhibition du pouvoir pathogène du virus étaient réalisés grâce à des sérums contenant des anticorps dirigés contre le CeHV-1 ou les herpès virus simplex humains. Après incubation du virus avec un des sérums, le mélange était soit injecté à un lapin, animal de laboratoire le plus sensible à l'infection par le CeHV-1, soit inoculé sur des cultures de rein de lapin ou de singe. Dans le cas d'une injection à un lapin, il était recherché l'apparition de signes cliniques chez celui-ci et dans le cas d'une inoculation à des cellules, il était recherché un effet pathogène sur celles-ci (Endo 1959).

Cette méthode de diagnostic posait le problème de la spécificité des sérums employés. En effet en raison de la forte communauté antigénique qui existe entre les différents *Simplexvirus*, les réactions croisées étaient importantes. Les sérums contenant des anticorps anti-CeHV1 sont capables par exemple de neutraliser efficacement le pouvoir infectieux des

herpès virus simplex humains mais également du SA8 et de l'herpès virus papio 2 (Palmer 1987, Katz 2002). Dans ces conditions, le diagnostic viral par la méthode d'inhibition du pouvoir pathogène apparaît peu spécifique¹.

5. Le traitement de l'herpès virose B chez l'animal

5.1. Le traitement médical

Le traitement médical des animaux est dangereux et inutile. Si un animal est infecté par le CeHV-1, le traitement de celui-ci par une des molécules antivirales disponibles actuellement sera totalement inefficace puisque le virus non répliquatif n'y est absolument pas sensible, ainsi ces molécules n'ont aucune activité sur le virus en état de latence dans les ganglions nerveux et ne permettent donc pas d'éradiquer le CeHV-1 chez un animal infecté. A moyen terme ce traitement pourrait tout juste prévenir le risque de résurgence tant que le virus n'a pas développé de résistance à la molécule antivirale. Le seul traitement logique serait de traiter le macaque infecté à vie mais cela est à exclure totalement car le risque de résistance est majeur. Si la résistance apparaît chez le macaque, il devient alors impossible de soigner les humains qui pourraient se contaminer. En conclusion il est impératif de ne jamais donner de traitement antiviral quel qu'il soit aux animaux porteurs du CeHV-1.

Comme dans le cas de la tuberculose chez les animaux domestiques, l'herpès virose B ne doit donc pas être traitée chez les animaux. L'euthanasie pourra par ailleurs être conseillée pour les animaux qui seront diagnostiqués comme porteurs du CeHV-1 en raison des forts risques qu'ils font encourir à l'homme et de l'incurabilité de cette maladie chez les animaux porteurs.

5.2. La vaccination anti-CeHV-1

Le CeHV-1 est endémique dans de nombreuses populations captives de macaque et constitue une menace sérieuse pour les humains qui travaillent en contact avec ces macaques ou leurs tissus. Un vaccin qui pourrait empêcher ou limiter l'infection par le CeHV-1 chez le macaque diminuerait le risque professionnel.

À cet effet, une équipe de chercheur a mis au point un plasmide exprimant la glycoprotéine B du CeHV-1 en vue de vacciner par l'ADN des macaques. Ce vaccin a été testé pour son immunogénicité chez la souris et le macaque rhésus (Loomis-Huff 2001). L'immunisation intramusculaire ou intradermique chez la souris a induit la production chez celles-ci d'anticorps dirigés contre la glycoprotéine B. Cette immunisation s'est révélée relativement stable sur une période de plus de 6 mois. Les anticorps détectés par ELISA furent d'une matière prédominante de l'isotype d'IgG2a. Cinq macaques juvéniles (âgés de 6 à 8 mois)

¹ Remarque : les anticorps anti-HSV humains ne protègent pas l'homme de l'infection par le CeHV-1.

furent également immunisés par voie intramusculaire (n=3) ou par voie intramusculaire et intradermique (n=2), avec deux rappels à 10 et 30 semaines. Chacun des cinq animaux développèrent des anticorps vis-à-vis de la glycoprotéine B du CeHV-1. Il a été également démontré une activité neutralisante vis-à-vis d'une souche de CeHV-1 issue de macaque rhésus dans le sérum des animaux immunisés par voie intramusculaire et intradermique. Ces résultats démontrent donc que l'immunisation par l'ADN pourrait être employée afin d'induire une immunité contre une glycoprotéine de CeHV-1 chez les macaques non infectés (Loomis-Huff 2001).

Une autre équipe a également construit un plasmide en vue d'une utilisation vaccinale, ce plasmide exprimant la glycoprotéine D du CeHV-1 (Hirano 2002). Ce vaccin par l'ADN a été administré chez des macaques japonais adultes (âgés de 6,5 à 9 ans) séronégatifs pour l'herpès virose B en quatre injections intradermiques à 0, 4, 18 et 31 semaines. L'immunogénicité du vaccin a été mesurée par une méthode ELISA. Il a ainsi été prouvé que des niveaux significatifs d'anticorps ont été induits chez tous les animaux vaccinés suivant chaque piqûre de rappel. Les Western Blot réalisés avec les sérums des macaques vaccinés ont confirmé l'identification particulière de la glycoprotéine D du CeHV-1. Les sérums des macaques immunisés ont également montrés une activité neutralisante contre une souche de CeHV-1 issue de macaque rhésus. Des réactions lymphoprolifératives faibles ont été enfin observées chez les macaques vaccinés en utilisant la glycoprotéine D recombinante issue de HSV1 comme antigène stimulant. L'analyse en cytométrie en flux chez un individu vacciné montra la présence de lymphocytes T effecteurs sensibles à une stimulation par la glycoprotéine D issue de HSV1. Ainsi, ce vaccin par l'ADN dérivé du gène de la glycoprotéine D du CeHV-1 a permis d'induire une immunité humorale et cellulaire efficace contre la glycoprotéine D chez les macaques vaccinés (Hirano 2002).

Il n'a cependant pas du tout été prouvé que cette immunisation puisse empêcher l'infection des animaux par le CeHV-1 ou dans le cas contraire empêcher l'excrétion du virus par ces animaux. Cela n'est en effet pas sûr que l'immunité induite par de tels vaccins soit plus efficace pour limiter l'excrétion virale que l'immunité naturelle contre le virus déjà mise en défaut par ce dernier. De plus en cas de vaccination des animaux il pourrait devenir difficile de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés. L'utilisation d'un tel vaccin chez l'animal supposera donc avant tout que ce vaccin démontre une efficacité préventive et curative à toute épreuve chez le macaque.

CHAPITRE IV : LE CEHV-1 CHEZ L'HOMME

1. Historique des cas de contamination humaine

Aujourd'hui, d'après la littérature, le nombre total de contaminations humaines par le CeHV-1 peut être estimé à environ 40. Seuls 27 cas cliniques ont été décrits en détail, les autres cas authentifiés n'ont pas donné lieu à une publication en règle. On doit rajouter à ces 40 cas où le virus a été authentifié, dix cas où le rôle du CeHV-1 est fortement suspecté. Dans leur quasi totalité ces contaminations humaines ont été observées aux USA dans le contexte de la manipulation de macaques pour la recherche biomédicale. Nous présentons sous la forme d'un tableau synthétique tous les cas qui ont donné lieu à une publication détaillée. Dans le tableau 4 ces cas sont classés par ordre historique de 1 à 27.

Nous avons détaillé le premier cas dans le chapitre I.

Tableau 4 : Cas cliniques d'infections humaines par le CeHV-1

Cas	Date	Type d'exposition	Source de contamination	Incubation / évolution de la maladie	Diagnostic chez le patient	Symptômes observés chez le patient	Traitement effectué	Référence
n°1	1932	Médecin mordu par un singe à la main	<i>Macaca mulatta</i> de statut sérologique inconnu	- 3 jours d'incubation - 15 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral dans le SNC par inoculation à l'animal - sérologie non pratiquée	- inflammation locale à J 3 puis apparition de vésicules au niveau du site d'inoculation - lymphadénite des ganglions drainant le site d'inoculation à J 3 - apparition d'un état fébrile à J 6 - crampes abdominales associées à des nausées et de la diarrhée à J 10 - hyperesthésie des extrémités basses associée à une rétention urinaire à J 13 - apparition d'une myélite ascendante à J 14 et décès à J 17	Non spécifique	Sabin 1934
n°2	1949	Médecin dont une plaie de la main a été contaminée par de la salive de singe	<i>Macaca mulatta</i> de statut sérologique inconnu	- temps d'incubation inconnu - "quelques" jours d'évolution avant le décès	- isolement viral dans le SNC par inoculation à l'animal - sérologie non pratiquée	- lésion insignifiante au début puis apparition d'une lymphangite et lymphadénite au niveau du site d'inoculation - puis développement durant les jours suivants de vésicules de type herpétiques au niveau du site d'inoculation associées à un état fébrile - en fin d'évolution apparition de sensations de brûlure, de dysphagie, d'une confusion mentale, d'une abolition des réflexes des extrémités basses, d'une rétention urinaire, d'un nystagmus bilatéral et enfin de troubles respiratoires avant le décès	Non spécifique	Sabin 1949
n°3	1956	Animalier griffé par un singe	inconnu	- 2 jours d'incubation - survie avec atteinte des fonctions supérieures	- isolement viral non pratiqué - sérologie positive CeHV-1 mais sujette à caution	- apparition d'une angine à J 2 puis d'un état fébrile, des céphalées et des vertiges à J 4 - puis développement d'une paralysie faciale G, d'une hémiparésie G et d'un détachement rétinien D - enfin développement d'une détérioration mentale qui s'améliora progressivement pendant les 3 ans qui suivirent - survie avec absence de vision de l'oeil D, diminution de la vision de l'oeil G et détérioration de l'état mental	Non spécifique	Davidson 1960

Tableau 4 : Cas cliniques d'infections humaines par le CeHV-1

Cas	Date	Type d'exposition	Source de contamination	Incubation / évolution de la maladie	Diagnostic chez le patient	Symptômes observés chez le patient	Traitement effectué	Référence
n°4	1957	Animalier mordu par des singes aux mains et à la nuque de 5 mois à 5 semaines avant les premiers symptômes	inconnu	- 35 jours à 5 mois d'incubation - 30 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral négatif dans le cerveau, la rate et les noeuds lymphatiques - sérologie positive pour CeHV-1 et HSV	- hyperthermie associée à des douleurs générales, des nausées, une grande faiblesse et des sueurs froides à J 35 après la dernière exposition - apparitions de convulsions à J 41 puis d'apnées, de cyanose et de coma à J 43 - développement d'une paralysie flasque de la jambe et du bras G à J 45 puis abolition de tous les réflexes ostéotendineux à J 46 - durant les 7 jours suivant la myélite ascendante atteint la tête avec apparition d'un nystagmus bilatéral, d'une faiblesse des muscles de la face et une déviation de la langue - décès à J 65	450 mg de cortisone au total	Hummeler 1959
n°5	1957	Vétérinaire pratiquant régulièrement des autopsies de singes morts d'infection à CeHV-1 Suspicion de contamination par aérosols	Probablement <i>Macaca mulatta</i> morts d'infection à CeHV-1	- temps d'incubation inconnu - 7 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral dans le SNC - sérologie CeHV-1 négative	- douleurs pharyngées puis vomissements, maux de tête, hyperesthésie de l'hémiface et du cuir chevelu G 2 jours plus tard - hyperthermie, douleurs thoraciques avec spasmes musculaires, rigidité de la nuque et confusion mentale 4 jours après les premiers symptômes - coma 5 jours et décès 7 jours après les premiers symptômes	Non spécifique	Davidson 1960
n°6	1957	Pharmacien nettoyant sans gant un crâne de singe	<i>Macaca mulatta</i> de statut sérologique inconnu	- 14 jours d'incubation - 8 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral dans le SNC et identification par tests de neutralisation - sérologie inconnue	- chute inexplicable probablement par ataxie puis dans les jours qui suivirent apparition de nausées avec léthargie - apparition d'un état semi comateux avec abolition des réflexes cutanés abdominaux à D - décès après coma 8 jours après les premiers symptômes	Non spécifique	Davidson 1960
n°7	1957	Animalier mordu à un doigt par un singe	<i>Macaca mulatta</i> de statut sérologique inconnu	- 16 jours d'incubation - 8 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral dans le SNC - sérologie inconnue	- infection de la plaie à J 5 - encéphalite associée à des céphalées et une faiblesse générale à J 18 - abolition des réflexes cutanés abdominaux et augmentation de la faiblesse musculaire généralisée puis coma et décès à J 26	Gammaglobulines IM	Davidson 1960

Tableau 4 : Cas cliniques d'infections humaines par le CeHV-1

Cas	Date	Type d'exposition	Source de contamination	Incubation / évolution de la maladie	Diagnostic chez le patient	Symptômes observés chez le patient	Traitement effectué	Référence
n°8	1957	Animalier mordu à un doigt par deux singes le même jour	<i>Macaca mulatta</i> et <i>fascicularis</i> de statuts sérologiques inconnus	- 13 jours d'incubation - survie avec régression des signes neurologiques sans séquelle en 6 mois	- isolement viral négatif dans les fèces et le sérum - séroconversion vis à vis de CeHV-1 entre J 3 et J 26, présence d'anticorps toujours importante à J 100	- développement de douleurs inter scapulaires à J 14 puis céphalées durant les jours suivants - faiblesse de la jambe G à J 19 puis myélite associées à de l'hyperthermie, des vomissements, de l'anisocorie, des contractions musculaires de la face et des tremblements de la langue - faiblesse respiratoire à J 21 puis paralysie progressive des quatre membres puis de la face - début d'amélioration à partir de J 32 puis régression progressive des signes neurologiques	Cortisone 100mg/j puis 200mg/j IM Gammaglobulines couverture antibiotique	Breen 1958
n°9	1957	Animalier exposé régulièrement à des singes CeHV-1 (inoculation expérimentale par CeHV-1) mais aucun accident n'a été rapporté	inconnu	- temps d'incubation inconnu - 2 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral dans le SNC et le LCR par inoculation à l'animal - sérologie inconnue	- diplopie le premier jour puis agitation et état délirant le lendemain - décès par insuffisance respiratoire centrale un jour plus tard	Non spécifique	Davidson 1960
n°10	1958	Technicien de laboratoire blessé aux mains par du verre souillé par des cultures de rein de singe	inconnu	- 2 jours d'incubation - 13 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral dans le SNC par inoculation à l'animal - séroconversion vis à vis de CeHV-1	- hyperthermie associée à l'apparition de pustules au niveau du site d'inoculation avec hypertrophie des ganglions axillaires drainants à J 2 - frissons et douleurs de la nuque à J 6 - dysphagie, hyperesthésie du bras G à J 10 - diplopie, faiblesse musculaire généralisée à J 11, instabilité psychomotrice et dyspnée à J 12, cyanose à J 13 et décès à J 15	Pénicilline, symptomatique	Hummeler 1959
n°11	1958	Animalier piqué à la main par une aiguille souillée ayant servie pour des singes	inconnu	- 5 jours d'incubation - 8 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral dans le SNC et identification par tests de neutralisation - sérologie inconnue	- fatigue, céphalées et douleurs épigastriques à J 5 puis difficultés de miction à J 12 - décès par myélite avec paralysie ascendante rapide à J 13	Non spécifique	Davidson 1960

Tableau 4 : Cas cliniques d'infections humaines par le CeHV-1

Cas	Date	Type d'exposition	Source de contamination	Incubation / évolution de la maladie	Diagnostic chez le patient	Symptômes observés chez le patient	Traitement effectué	Référence
n°12	1958	Animalier griffé à la main par une aiguille souillée 5 semaines avant la maladie et morsure de la main par un singe 4 semaines avant la maladie	inconnu	- 4 à 5 semaines d'incubation - 3 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral dans le SNC - sérologie inconnue	- céphalées et nausées 4 semaines après la morsure sans signes neurologiques associés - hyperthermie, nystagmus bilatéral, convulsions et coma puis décès 3 jours plus tard	Non spécifique	Davidson 1960
n°13	1960	Animalier griffé à plusieurs reprises aux avant-bras	<i>Macaca mulatta</i> de statut sérologique inconnu	- temps d'incubation inconnu - 38 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral dans le SNC par inoculation à l'animal - sérologie inconnue	- engourdissement et paresthésie du pouce D puis du poignet et de l'avant-bras D - maux de gorge 3 jours plus tard - nausée et vertiges pendant un mois jusqu'à apparition de malaises et d'un état fébrile - puis développement d'une pneumonie associée à une pleurésie, de céphalées et de douleurs abdominales et du dos - apparition rapide de signes neurologiques : photophobie, diplopie, parésie de la jambe D, paresthésie de la jambe G, difficultés de miction puis rigidité de la nuque et vomissements - cyanose et décès 38 jours après les premiers symptômes	Pénicilline puis chloramphénicol	Love 1962
n°14	1963	Professionnel suspect de contamination par aérosols car aucun accident d'exposition rapporté mais exposition régulière à des singes	Exposition à des <i>Macaca mulatta</i> et à des <i>Chlorocebus aethiops</i> de statuts sérologiques inconnus	- temps d'incubation inconnu - décès après 3 ans de coma	- isolement d'un herpès virus par inoculation à l'animal de liquide provenant de vésicules - séroconversion neutralisante vis à vis de CeHV-1 et SA8 à des titres équivalents	- syndrome pseudo grippal - confusion mentale 8 jours plus tard - paralysie de l'épaule G et apparition de vésicules sur celle-ci - évolution rapide vers un coma et décès 3 ans et 4 mois plus tard	Non spécifique	Palmer 1987
n°15	1965	Professionnel mordu par un singe	<i>Chlorocebus aethiops</i> séropositif pour le CeHV-1	- 54 jours d'incubation - 20 jours d'évolution avant le décès	- isolement viral non réalisé - séroconversion neutralisante vis à vis de CeHV-1	Pas de données	Pas de données	Palmer 1987

Tableau 4 : Cas cliniques d'infections humaines par le CeHV-1

Cas	Date	Type d'exposition	Source de contamination	Incubation / évolution de la maladie	Diagnostic chez le patient	Symptômes observés chez le patient	Traitement effectué	Référence
n°16	1970	Virologiste sans contact avec des singes depuis plus de 10 ans et sans contact avec des cellules de singes depuis plus de 6 mois	<i>Macaca mulatta</i> et autres de statuts sérologiques inconnus	- récurrence ? - survie mais persistance d'un trouble psychomoteur important	- isolement de CeHV-1 à partir de liquide provenant de vésicules et identification par tests de neutralisation - séroconversion neutralisante vis à vis de CeHV-1 durant la phase clinique de la maladie	- douleurs périorbitaires, périauriculaires et de la gorge puis fièvre, céphalées, ataxies et apparition de vésicules associées à un érythème zostérien dans le territoire de la branche ophtalmique du nerf trijumeaux G - rétention urinaire 15 jours après les premiers signes et développement de vésicules associées à un érythème entre les 6ème et 7ème côtes puis ataxie - apparition d'une paralysie ascendante progressive jusqu'à une quadriplégie, une paralysie faciale flasque et aphasie en quelques jours - survie avec amélioration progressive de l'aphasie et des troubles moteurs mais persistance de troubles importants	- Prednisolone 15 mg 3X/j - Gammaglobulines humaines IV - Cytosine arabinoside 3 mg/kg/j IV	Fierer 1973
n°17	1973	Assistant de recherche exposé à des singes sans accident rapporté depuis un an	<i>Macaca mulatta</i> et autres dont 35% des singes étaient séropositifs	- récurrence ? - survie après régression des symptômes en 120 jours	- isolements viraux négatifs dans le LCR, un lavage trachéal, l'urine et des écouvillonnages oraux et anaux - séroconversion vis à vis de CeHV-1 durant la phase clinique de la maladie	- apparition d'une faiblesse musculaire et d'une parésie de la face D, de la jambe et du bras D associées à un état fébrile et des malaises - apparition de nausées, de vomissements, d'une rhinorrhée, d'une angine, de céphalées, d'irritabilité et de difficultés de miction 6 jours plus tard - généralisation de la parésie musculaire associée à une encéphalomyélite et apparition d'une importante hémorragie vitrénne G au 28 jours après les premiers symptômes - survie avec régression des symptômes en 100 jours mais séquelles de fatigabilité, de perte de vision importante de l'oeil G et d'impuissance	Traitements symptomatiques sans utilisation d'antiviraux	Bryan 1975
n°18	1987	Animalier mordu à un doigt par un singe	<i>Macaca mulatta</i> présentant une conjonctivite bilatérale, de la diarrhée excréant du CeHV-1	- 5 jours d'incubation - 1 mois d'évolution rapide vers un coma sans amélioration avant le décès au bout de 6 mois	- isolements viraux positifs dans une biopsie de peau et identification par analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN viral - séroconversion vis à vis de CeHV-1	- apparition d'une paresthésie du bras G à J5 puis progressivement d'une léthargie et d'un syndrome pseudo grippal pendant les 13 jours suivants - apparition d'une paresthésie du côté G du corps avec nausées et diplopie - évolution vers un coma à J30 avec troubles respiratoires et décès d'un arrêt cardiaque 5 mois plus tard	- Acyclovir haute dose IV puis Ganciclovir IV à partir de J 24	Holmes 1990

Tableau 4 : Cas cliniques d'infections humaines par le CeHV-1

Cas	Date	Type d'exposition	Source de contamination	Incubation / évolution de la maladie	Diagnostic chez le patient	Symptômes observés chez le patient	Traitement effectué	Référence
n°19	1987	Technicien biologiste mordu à un avant-bras par un singe	même animal que dans le cas n°18	- 5 jours d'incubation - 43 jours d'évolution avant le décès	- isollements viraux positifs dans une biopsie de peau et identification par analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN viral - séroconversion vis à vis de CeHV-1	- apparition de vésicules herpétiformes au niveau du site d'inoculation à J 5 - détection d'inclusion virales dans un frottis de lésions par cytodagnostic de Tzanck à J 16 - parésie du bras D, douleurs thoraciques, dyspnée, état fébrile, confusion, léthargie, diplopie et dysphagie durant les jours suivants - arrêt respiratoire à J 21 et décès à J 48	- Acyclovir en topique à J 16 non observé et remplacé par des corticoïdes en topique - Acyclovir haute dose IV puis Ganciclovir IV à partir de J 20	Holmes 1990
n°20	1987	Chef d'un laboratoire égratigné par une pointe sur une cage de singe	<i>Macaca mulatta</i> excréant asymptomatiquement le CeHV-1	- 16 jours d'incubation - survie sans séquelle sous traitement par acyclovir au long cours	- isollements viraux positifs dans une biopsie de peau et identification par analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN viral - séroconversion vis à vis de CeHV-1	- vésicules prurigineuses au site d'inoculation à J 16 - diminution progressive des signes cliniques en 3 semaines - excrétion asymptomatique du virus au niveau conjonctival et buccal à J 46 - survie sans aucune séquelle	- Acyclovir PO de J 20 à J 33 - Acyclovir IV de J 33 à J 40 - Acyclovir PO de J 40 à J 46 mal observé - Acyclovir IV pendant 3 semaines - Acyclovir PO au long cours	Holmes 1990
n°21	1987	Femme du patient n°19 ayant appliqué une crème contenant 0,25% d'hydrocortisone sur les lésions de son mari et en même temps sur une dermatite de contact sur un de ses doigts	Contamination interhumaine	- moins de 5 jours - survie sans séquelle sous traitement par acyclovir au long cours	- isollements viraux positifs dans une biopsie de peau et identification par analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN viral - sérologie inconnue	- la dermatose devient prurigineuse et légèrement ulcérée, la lésion reste CeHV-1 positive pendant plus d'un mois, portage également de manière asymptomatique au niveau conjonctival pendant 18 jours - puis disparition de tous les symptômes - survie sans aucune séquelle	- Acyclovir PO pendant 1 semaine - Acyclovir IV pendant 1 mois - Acyclovir PO au long cours	Holmes 1990

Tableau 4 : Cas cliniques d'infections humaines par le CeHV-1

Cas	Date	Type d'exposition	Source de contamination	Incubation / évolution de la maladie	Diagnostic chez le patient	Symptômes observés chez le patient	Traitement effectué	Référence
n°22	1988	Technicien vétérinaire piqué au doigt par une aiguille souillée ayant servi pour un singe	<i>Macaca mulatta</i> excrétaient asymptomatiquement le CeHV-1 au niveau conjonctival	<ul style="list-style-type: none"> - patient resté asymptomatique malgré des biopsies positives pour le CeHV-1 B 5 jours et 12 jours après l'accident - survie sans séquelle sous traitement par acyclovir au long cours 	<ul style="list-style-type: none"> - isolements viraux positifs dans deux biopsies de peau par culture virale et identification par analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN viral - sérologie inconnue 	<ul style="list-style-type: none"> - portage asymptomatique au niveau du site d'inoculation du CeHV-1 pendant environ 2 semaines - aucun symptôme n'a été détecté et survie sans aucune séquelle 	<ul style="list-style-type: none"> - Acyclovir 400 mg PO 5X/j pendant 1 semaine - Acyclovir 10 mg/kg IV 3X/j pendant 3 semaines - Acyclovir 800 mg PO 5X/j au long cours 	Artenstein 1991
n°23	1989	Animalier mordu et griffé par des singes pendant 2 ans	<i>Macaca mulatta</i> et <i>Macaca fascicularis</i> séropositifs pour le CeHV-1 (pas d'excrétion détectée)	<ul style="list-style-type: none"> - temps d'incubation inconnu - 12 jours d'évolution avant le décès 	<ul style="list-style-type: none"> - isolements viraux positifs à partir de vésicules, du SNC, des poumons, du cœur, des reins, de la bouche et de la langue par culture virale et identification par analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN viral - sérologie positive vis-à-vis du CeHV-1 	<ul style="list-style-type: none"> - douleurs de l'épaule D puis le lendemain augmentation de cette douleur de l'épaule associées à des douleurs du dos et du thorax - un jour plus tard, parésie du bras D, céphalées, dysphagie et nausées - extension de la parésie aux membres du côté G puis généralisation suivie d'un arrêt respiratoire - léthargie et paralysie flasque des extrémités - décès après 12 jours d'évolution de la maladie 	<ul style="list-style-type: none"> - Acyclovir 15 mg/kg IV 3X/j à partir de J 3 	Davenport 1994
n°24	1989	Animalier mordu par des singes pendant 2 semaines, dernière morsure grave à un pouce	même animal que dans le cas n°23	<ul style="list-style-type: none"> - environ 15 jours d'incubation - survie sans séquelle sous traitement par acyclovir au long cours 	<ul style="list-style-type: none"> - recherche négative - sérologie positive vis-à-vis du CeHV-1 	<ul style="list-style-type: none"> - syndrome pseudo-grippal à J 15 - céphalée et myalgie diffuse à J 16 - dysesthésie, dysphagie et ataxie à J 20 - diminution progressive des symptômes en quelques jours - survie sans aucune séquelle 	<ul style="list-style-type: none"> - Acyclovir 15 mg/kg IV 3X/j de J20 à J22 - Ganciclovir 5 mg/kg IV 2X/j de J22 à J47 - Acyclovir au long cours PO 800 mg 5X/j 	Davenport 1994

Tableau 4 : Cas cliniques d'infections humaines par le CeHV-1

Cas	Date	Type d'exposition	Source de contamination	Incubation / évolution de la maladie	Diagnostic chez le patient	Symptômes observés chez le patient	Traitement effectué	Référence
n°25	1989	Animalier mordu et griffé régulièrement par des singes pendant 13 ans	même animal que dans le cas n°23	- temps d'incubation inconnu - survie sans séquelle sous traitement par acyclovir au long cours	- recherche négative - sérologie positive vis-à-vis du CeHV-1	- céphalées occipitales et légère hyperthermie - nausées 3 jours plus tard - disparition des symptômes en 11 jours - apparition un an plus tard d'un déficit d'attention résolutif sous traitement	- Acyclovir 15 mg/kg IV 1X/j de J20 à J30 - Acyclovir PO 800 mg 5X/j pendant 8 mois - Reprise au long cours un an plus tard de l'acyclovir	Davenport 1994
n°26	1992	Neurobiologiste sans contact récent avec des tissus ou des cellules de singe contaminés même si des échantillons de ce type sont utilisés en routine dans ce laboratoire	Inconnu	- temps d'incubation inconnu - survie sans séquelle sous traitement par acyclovir au long cours	- recherche positive dans le LCR par PCR puis analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction du produit de PCR - sérologie inconnue	- tableau clinique de méningite aseptique - survie sans séquelle après traitement	- Ganciclovir 5 mg/kg IV 3X/j pendant 1 mois - Acyclovir au long cours 4g/j PO	Scinicariello 1993
n°27	1997	Animalier ayant reçu une projection oculaire de liquide biologique non identifié (probablement d'origine fécale)	<i>Macaca mulatta</i> de statut sérologique inconnu	- 10 jours d'incubation - 32 jours d'évolution avant le décès	- recherche négative dans le LCR et des écouvillons oculaires - séroconversion vis-à-vis du CeHV-1	- conjonctivite à J 10 avec lésions cornéennes dendritiques typique d'une infection oculaire herpétique - aggravation des symptômes oculaire à J 13 puis douleurs rétro-orbitaires, photophobie, anorexie, nausées et douleurs abdominales à J 15 - éruption vésiculeuse dans le territoire de distribution des premières et deuxièmes branches du nerf trijumeau droit à J 16 - parésie du pied droit, difficultés urinaires, douleurs abdominales basses suivie d'une myélite ascendante rapide à J 17 - paralysie flasque totale à J 22 puis développement d'une pneumonie avec détresse respiratoire aboutissant au décès du patient à J 32	- Acyclovir 15 mg/kg IV 3X/j à J 15 - Ganciclovir 5 mg/kg IV 2X/j à partir de J 16	MMWR 1998

2. La clinique

2.1. Voie d'infection

La voie d'infection du virus est chez l'homme exclusivement cutané-muqueuse. Le mode de contamination est bien connu dans 22 cas sur 27 et constitue une inoculation directe du virus.

2.1.1. *Inoculation directe par des singes*

L'inoculation du virus à l'homme a été provoquée par une morsure ou une griffure de singe (11 cas), une projection oculaire (1 cas), une égratignure par un élément saillant d'une cage (1 cas), une piqûre d'aiguille souillée (3 cas), une contamination directe d'une plaie préexistante par de la salive de singe (1 cas) et enfin une coupure avec du verre contaminé par des cultures de cellules de singes (2 cas).

2.1.2. *Inoculation directe par transmission interhumaine*

Un cas de contamination interhumaine a été rapporté (21) : à partir d'une lésion herpétique post-morsure de l'avant-bras d'un sujet vers une lésion d'eczéma de contact préexistante du doigt de sa femme par échange d'un dermocorticoïde cutané. Hormis ce cas aucune autre transmission n'a été observée.

2.1.3. *Autres modes de contamination*

Il a été rapporté un cas de contamination à la suite du nettoyage à mains nue d'un crâne de macaque rhésus sans blessure rapportée et deux cas de transmission aérienne par aérosols suspectée chez deux patients ayant développé une encéphalite sans signe clinique de myélite ascendante.

2.2. Incubation de la maladie

Le délai d'incubation, lorsque celui-ci est connu, varie de 2 jours (3, 10) à 2 mois (15) mais d'une manière générale, les premiers symptômes se développent dans le premier mois. Il est à noter que dans deux cas (16, 17) il a été soupçonné un phénomène de réactivation virale en raison du délai très important entre la dernière exposition possible au virus et l'apparition des premiers symptômes de la maladie (de 6 mois à plusieurs années)

2.3. La primo-infection

2.3.1. *Premiers symptômes*

Les premiers symptômes de la maladie humaine peuvent être variés. Il a été rapporté un seul cas d'infection asymptomatique d'un patient pourtant excréteur de virus CeHV-1 (22).

Dans les 25 autres cas où les premiers symptômes ont été décrits la maladie a débuté par :

- des signes cutanés ou muqueux, N=9

- des signes généraux (hyperthermie, sensation de malaise, asthénie, syndrome pseudo-grippal, maux de gorge ou céphalées), N=9
- des signes neurologiques (parésie, paresthésie, syndrome méningé ou coma inaugural), N=7

2.3.1.1.L'atteinte cutanéomuqueuse

L'infection cutanéomuqueuse n'a été observée que dans un tiers des cas décrits en tant que premier symptôme. Il a ainsi été observé une simple infection non spécifique du site d'inoculation (7), une éruption de vésicules herpétiformes (1, 2, 10, 19, 20, 27), un eczéma zostérien (16) ou une surinfection d'un eczéma préexistant (21)

2.3.1.2.Le syndrome général

Les symptômes généraux constituent dans un autre tiers des cas les premiers signes de la maladie. Ils sont variés et non spécifiques : syndrome pseudo-grippal, vomissements, hyperthermie, maux de gorge et céphalées.

2.3.1.3.L'atteinte du système nerveux

Les premiers signes cliniques de la maladie auront été dans 7 cas sur 27 caractérisés par une atteinte du système nerveux. Les premiers signes décrits ont été des atteintes sensitives ou motrices. L'évolution vers une myélite ascendante avec paralysie respiratoire puis une encéphalite a ensuite été rapide. Deux cas de méningite aseptique sont également survenus (25, 26) et ont régressé sans séquelle sous Acyclovir.

En conclusion, devant tout patient suspect de contamination par le CeHV-1, on devra s'aider cliniquement par la recherche systématique des symptômes suivants (Holmes 1995) :

Manifestations précoces (non constamment présentes) :

- Eruption vésiculaire ou ulcération au niveau ou à proximité du site d'inoculation
- Douleur intense ou prurit au niveau du site d'inoculation
- Lymphadénopathie locale

Manifestations intermédiaires (non constamment présentes)

- Hyperthermie
- Parésie, paresthésie ou autres atteintes neurologiques au niveau du site d'inoculation, avec ou sans progression ascendante
- Parésie ou paralysie de l'extrémité correspondant au site d'inoculation
- Hoquet persistant

Manifestations tardives (prévenues par un traitement précoce)

- Sinusite
- Raideur de la nuque

- Céphalées durant plus de 24 heures
- Nausées et vomissements
- Atteinte de tronc cérébral : diplopie, dysarthrie, dysphagie, vertiges, hémiparésie controlatérale, ataxie cérébelleuse, atteinte de la sensibilité de l'hémicorps controlatéral, paralysie des nerfs crâniens, perte de connaissance
- Altération mentale
- Autres signes compatibles avec une atteinte du SNC ou d'encéphalite virale : rétention urinaire, atteinte respiratoire centrale, convulsions, myoclonies, hémiparésie, hémiplégie, autres signes neurologiques localisés, paralysie ascendante ou coma

Le diagnostic clinique passe par des examens répétés à la recherche de signes locaux précoces (éruption vésiculaires, ulcération, douleur ou prurit au site d'inoculation) et de signes intermédiaires (hyperthermie, paresthésie, parésie ou paralysie dans la régions du site d'inoculation) mais surtout dans une prise détaillée de l'anamnèse à la recherche de tout accident ayant pu faire courir au patient un risque de contamination par le CeHV-1. Il est cependant important de noter que les signes précoces et intermédiaires de la maladie ne sont pas constamment présents et qu'il est parfois difficile de retrouver l'origine de la contamination d'un patient. L'existence d'un contact antérieur avec des primates est cependant constant chez les patients atteints, l'existence d'un tel contact chez une patient présentant des signes cliniques évoquant une infection par le CeHV-1 doit donc être pris en compte.

2.4. L'évolution de la primo-infection

2.4.1. *Évolution de la maladie non traitée*

En l'absence de traitement, la maladie évolue vers l'apparition de signes neurologiques. Dans certains cas, décrits ci-dessus, les signes neurologiques constituent d'emblée les premiers signes cliniques. Les signes neurologiques sont caractérisés par une faiblesse musculaire ou une parésie d'une région du corps du patient suivie d'une évolution ascendante de cette atteinte neurologique. La parésie peut ensuite évoluer en paralysie flasque pouvant aboutir à une quadriplégie, une paralysie faciale et un arrêt respiratoire voire un coma. La mort survient en général par arrêt respiratoire. En l'absence de traitement, l'infection humaine par le CeHV-1 est fatale à plus de 75% (13/17).

2.4.2. *Évolution de la maladie traitée par antiviral*

En l'absence de traitement, la mortalité de l'infection par le CeHV-1 chez l'homme atteint 75% mais depuis l'utilisation des antiviraux, cette mortalité est descendue à 40% (4/10). Il est par ailleurs estimé que l'administration préventive d'antiviraux (voir 3.5.1. de ce chapitre)

évite l'apparition de tout symptôme mais prémunit également contre l'apparition d'une infection latente à CeHV-1 chez l'homme et évite ainsi la nécessité d'administrer un traitement antiviral à vie chez les patients.

Lors d'une évolution favorable de la maladie, il peut cependant persister des séquelles neurologiques d'autant plus que l'atteinte neurologique est grave avant la régression des symptômes. Ainsi 3 des 10 survivants (3, 16 et 17) ont présenté des séquelles neurologiques. Il est intéressant de noter que depuis l'utilisation des antiviraux comme l'Acyclovir, les patients qui survivent à leur maladie ne présentent plus de séquelles après la régression des symptômes. Ces patients sont cependant amenés à suivre un traitement au long cours par l'Acyclovir afin de prévenir l'apparition de récurrences. En effet les molécules disponibles actuellement n'ayant que des propriétés virostatiques, le virus présent en état de latence dans les neurones du patient n'est pas détruit par le traitement antiviral.

2.4.3. Durée d'évolution de la maladie

Pour les cas mortels, le temps écoulé entre les premiers symptômes et le décès du patient varie de 2 jours (9) à plusieurs années (14) avec une durée d'évolution généralement inférieure à 30 jours. Les durées d'évolution plus longues, 6 mois (18) et 3 ans (14), avant le décès du patient correspondent à des entrées dans un état comateux, sans amélioration avant la mort, après respectivement 30 jours et 15 jours d'évolution de la maladie.

Lorsque les patients ont survécus, la phase aiguë de la maladie dura de 11 jours (25) à 1 mois et la phase de convalescence dura de quelques jours à plusieurs années (3).

2.5. Récurrence de la maladie

Dans deux cas la primo-infection a été totalement asymptomatique si bien que le diagnostic de la maladie n'a été posé que devant des signes de récurrence de la maladie. En effet la durée de la période asymptomatique entre la primo-infection et les signes de récurrence a été estimée entre un an et dix ans dans deux cas ; une infection latente suivie d'une réactivation est donc suspectée dans ces deux cas (16, 17) avec développement d'une maladie neurologique à CeHV-1 plusieurs années après le dernier contact entre le patient et une source potentielle de contamination. Par exemple, le patient du cas 16 présenta durant plusieurs années des névralgies trigéminales récurrentes qui pourraient trouver leur origine dans des poussées récurrentes d'une infection par le CeHV-1 des neurones des ganglions trijumeaux. Dans ces deux cas, la maladie lors de la réactivation abouti au développement d'une encéphalomyélite.

Un autre cas de récurrence d'infection à CeHV-1 a été observé après une primo-infection

aiguë. Dans le cas 25 la récurrence a été favorisée par l'arrêt du traitement antiviral par l'Acyclovir. La récurrence a pris la forme d'une atteinte des fonctions cognitives supérieures 1 an après l'arrêt du traitement antiviral par l'Acyclovir. La reprise au long cours du traitement a fait disparaître les symptômes. Depuis cette observation l'intérêt d'un traitement au long cours par l'Acyclovir est démontré surtout si le patient a présenté des signes neurologiques centraux.

Dans tout les cas récents où l'infection humaine au CeHV-1 est diagnostiquée de manière certaine, le suivi d'un traitement antiviral au long cours a permis d'éviter l'apparition de récurrence. Dans les cas plus anciens où l'on n'avait pas la possibilité de pratiquer de traitement antiviral, les malades sont décédés au décours de la primo-infection. Pour les rares cas anciens où les malades ont survécu, il n'a pas été rapporté de récurrence.

3. Le diagnostic biologique

Il repose sur deux piliers : la mise en évidence du virus, la mise en évidence des anticorps.

3.1. La mise en évidence du virus :

La mise en évidence du virus peut se faire par isolement viral ou par détection de l'ADN viral par PCR, cette recherche n'a cependant pas été fructueuse chez 6 patients sur les 25 cas où cette recherche a été tentée. Cette recherche pose en effet un problème dans la prise d'échantillon pouvant être délicate dans certains cas. De plus, avant qu'il y ait la possibilité de détecter la présence du virus par PCR, l'identification virale nécessitait l'isolement viral par culture ou inoculation à l'animal.

Dans le cas des encéphalites humaines à HSV-1, la recherche du HSV par culture virale à partir d'une ponction de LCR (liquide céphalo-rachidien) est positive dans moins de 5% des cas alors que ce virus pousse très facilement *in vitro* (Denes 2005). La PCR à partir d'une ponction de LCR montre par contre une sensibilité de 98% dès le quatrième jour après l'apparition des premiers symptômes. C'est pour cette raison que la culture virale à partir de LCR a été abandonnée dans le cadre du diagnostic des encéphalites herpétiques humaines (Denes 2005). Cette remarque doit également s'appliquer au diagnostic biologique de l'encéphalite à CeHV-1 chez l'homme.

En général le virus aura été identifié dans des prélèvements issus du système nerveux central du patient ou à partir d'échantillons prélevés au niveau du site d'inoculation du virus. Il a également été rapporté des isollements de virus à partir de prélèvements des poumons, du cœur, de la bouche et de la langue (23) mais également à partir de prélèvements oculaires

(21).

3.1.1. Isolement viral par culture ou inoculation au lapin

Déjà évoqué dans l'historique du chapitre I, cet isolement viral a été réalisé pour la première fois en 1932 lors de la première maladie humaine décrite (Sabin 1934). L'injection intradermique, intrapéritonéale ou intracérébrale du CeHV-1 est létale et reproductible chez le lapin, mais l'injection intracérébrale ou intrapéritonéale chez la souris, le cobaye, le chien ou le macaque rhésus n'induisait aucune maladie. Il est également possible d'infecter des lignées cellulaires continues de reins de singe, des cellules HeLa, des cellules Vero et des cellules LLC-MK2 (Weigler 1992) qui permettent la culture efficace du virus.

Le CeHV-1 est actuellement classé dans le groupe 3 de la classification des agents biologiques française (arrêté du 18 juillet 1994, voir annexe 4) et européenne (directive 2000/54/CE) et sa manipulation est donc réservée à un petit nombre de laboratoires présentant un niveau de confinement de type L3 et P3. Peu de laboratoires dans le monde réalisent cet isolement viral de manière courante (voir annexe 2). A cette date, aucun laboratoire français ne le pratique.

Le CeHV-1 a pu être isolé à partir de liquide de vésicules herpétiques, de biopsies tissulaires, de LCR ou d'écouvillons conjonctivaux chez des patients infectés par le virus. Cependant toutes les tentatives d'isolement viral ne sont pas couronnées de succès en raison de la grande fragilité des virions. Les prélèvements pour la culture du CeHV-1 peuvent être collectés au niveau du site d'inoculation grâce à un écouvillon stérile en coton ou de type Dacron qui doit être immédiatement placé dans un tube contenant 1 à 2 ml de milieu de transport de virus. Dans le cas d'un échantillon issu d'une biopsie de peau par exemple, le tissu collecté doit être également placé dans un milieu de transport de virus adéquat (Cohen 2002).

S'il est possible de réfrigérer le prélèvement, une solution de Earle complétée de 50 µg/ml de gentamycine et 2% de sérum de veau fœtal est un milieu de transport de virus acceptable. Le virus y reste stable jusqu'à 6 mois à 4°C. Si la réfrigération n'est pas possible immédiatement, une solution de Hanks complétée de gentamycine permet de conserver le prélèvement à température ambiante (Cohen 2002).

Tous les échantillons doivent ensuite être placés dans un flacon étanche, congelés et envoyés sur glace carbonique au laboratoire selon les modalités indiquées par celui-ci dont un exemple est décrit en annexe 5. Le processus de congélation et l'exposition au dioxyde de carbone de la glace carbonique peuvent diminuer la viabilité du virus, le dernier effet pouvant être

atténué par un flaconnage parfaitement étanche (Cohen 2002).

Après culture ou inoculation, l'identification virale peut être réalisée soit grâce à la séroneutralisation par des anticorps spécifiques du CeHV-1 soit plus récemment par la PCR.

3.1.2. Détection par PCR

La recherche du génome viral par PCR dans les prélèvements biologiques représente aujourd'hui un moyen de diagnostic virologique de tout premier plan, en raison de sa sensibilité et de sa spécificité élevées. De plus la recherche de l'ADN viral par PCR ne nécessite pas l'emploi de prélèvements ayant conservés leur pouvoir infectieux potentiel, d'où un gain de sécurité lors de la manipulation et du transport des prélèvements, mais également un prélèvement, un transport et un stockage des échantillons plus aisés.

Scinicariello a mis cette technique de détection par la PCR à contribution en 1992 pour faire le diagnostic d'une méningite aseptique à CeHV-1 chez un neurobiologiste (26).

Dans cette même étude, sur un total de 21 prélèvements, 9 provenant d'autopsie de patients humains infectés par le CeHV-1 et 12 d'écouvillons réalisés sur des singes également infectés par le CeHV-1, l'identification virale par PCR a pu être réalisée dans 76% des cas alors que l'isolement viral par culture n'a donné de résultats positifs que pour 52% des mêmes prélèvements. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette différence de sensibilité en faveur de la PCR est due à la faible quantité de virus présent dans les échantillons (Scinicariello 1993a, 1993b). L'état de conservation du virus dans les prélèvements est également beaucoup plus important dans le cas de la culture virale. La PCR est donc plus sensible que la culture virale.

3.2. La sérologie anti-CeHV-1 chez l'homme

3.2.1. Les difficultés posées par le diagnostic sérologique anti-CeHV-1 chez l'homme

Il existe une grande communauté antigénique entre le CeHV-1 et les HSV-1 et -2. Il a été montré que des sérums issus de patients infectés par HSV-1 présentaient une forte réactivité croisée vis-à-vis des extraits antigéniques totaux de HSV-2 et du CeHV-1 (Katz 2002). De manière intéressante, dans cette étude, la réactivité des anticorps humains anti-HSV-1 était plus forte vis-à-vis des antigènes du CeHV-1 que vis-à-vis des antigènes du HSV-2, alors que le virus HSV-1 est phylogénétiquement plus proche du HSV-2 que du CeHV-1 (Katz 2002). La réactivité croisée des anticorps humains anti-HSV-2 vis-à-vis du CeHV-1 a aussi été démontrée clairement.

Cette réactivité croisée des anticorps va poser problème pour la différenciation des anticorps dirigés contre les HSV et contre le CeHV-1. Les tests sérologiques pour la détection des anticorps dirigés contre le CeHV-1 ont été à l'origine développés pour le diagnostic sérologique chez les macaques. Ces tests (RIA ou ELISA, voir chapitre 3 pour plus de détails sur le diagnostic sérologique chez le macaque) ont montré de fortes valeurs prédictives positives chez le macaque ; en effet l'infection (à l'état sauvage) est endémique chez les macaques et les HSV ne les infectent pas.

Cependant cette observation n'est pas valable dans le cas de la sérologie humaine anti-CeHV-1. Étant donnée la forte réactivité croisée entre les HSV et le CeHV-1 et la prévalence très élevée de l'infection par les HSV dans la population humaine adulte, des résultats faux-positifs sont à craindre.

La valeur prédictive positive d'un test est toujours fonction de la prévalence de la maladie dans la population étudiée. Or l'infection humaine par le CeHV-1 est rare, la valeur d'un résultat sérologique positif chez une personne asymptomatique sera donc faible.

Les résultats sérologiques pour CeHV-1 réalisés chez les humains devront donc être pris avec une grande prudence mais peuvent être utiles pour le suivi de personnes ayant été en contact rapproché avec le virus ou présentant des symptômes évocateurs de la maladie. Cependant des résultats positifs ne constitueront malheureusement jamais une preuve définitive d'une infection humaine par le CeHV-1 si le virus lui-même n'est pas détecté ou en l'absence de signes cliniques évocateurs (Freifeld 1995). Le dépistage aléatoire chez des personnes asymptomatiques n'est donc pas conseillé car les résultats qui seront ainsi obtenus seront quasiment systématiquement ininterprétables.

3.2.2. *Les méthodes de détections des anticorps dirigés contre le CeHV-1 chez l'homme*

Parmi les techniques utilisables pour la détection des anticorps spécifiques du CeHV-1 dans le sérum humain, on retrouve le Western blot et l'ELISA compétitif utilisant des antigènes dérivés du CeHV-1.

Le Western blot montre une grande spécificité dans la détection des anticorps spécifiques du CeHV-1. La technique de Western Blot est la première technique qui a permis de distinguer avec certitude les sérums contenant des anticorps spécifiques du CeHV-1 de ceux contenant des anticorps spécifiques d'autres *Simplexvirus* proches de ce dernier. Les antigènes viraux provenant de cellules infectées et non infectées par le CeHV-1, HSV-1 et HSV-2 sont soumis à une migration par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide

avant d'être transférés sur membrane de nitrocellulose. Chaque membrane est mise en contact avec les sérums à tester et révélés par des anticorps anti-immunoglobulines humaines. Le test est considéré comme positif si au moins quatre bandes spécifiques du CeHV-1 sont observées (Freifeld 1995). Cette méthode est lourde à mettre en oeuvre mais permet d'obtenir un diagnostic de certitude en raison de sa très grande spécificité.

Une méthode de détection des anticorps spécifiques du CeHV-1 par dosage radio-immunologique compétitif a été développée et présente une bonne spécificité. Le principe de ce test repose sur l'inhibition de la fixation d'un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope du CeHV-1 par les anticorps spécifiques du virus contenu dans les sérums humains et la quantification de l'inhibition de cette fixation par une méthode radio-immunologique (Norcott 1993).

Les méthodes ELISA montrent en général une très grande sensibilité. Dans le cas de la détection des anticorps anti-CeHV-1, cette méthode présente cependant une très faible spécificité en raison de la très grande réactivité croisée entre les anticorps anti-HSV humains et les antigènes du CeHV-1. Certains auteurs indiquent qu'une préincubation des sérums humains dans des antigènes de HSV permet de diminuer le niveau de réactivité croisée des sérums humains sans permettre de l'abolir totalement (Holmes 1995).

Le test ELISA de type compétitif est également une méthode utilisée (Katz 1986) et peut permettre lorsqu'il est couplé au Western blot de détecter avec une grande spécificité la présence d'anticorps dirigés contre le CeHV-1 dans les sérums humains.

Toutes ces méthodes ont été validées en vérifiant que les sérums des patients ayant développé une infection clinique à CeHV-1 réagissaient de manière positive dans ces tests et que les sérums de personnes n'ayant jamais été en contact avec des singes (mais présentant généralement des anticorps anti-HSV) ne réagissaient pas de manière positive. Cela ne permet cependant pas d'exclure qu'une personne en contact avec le virus CeHV-1 et faisant une infection asymptomatique (avec possibilité éventuelle de récurrence) soit en dessous du seuil de détection fixé pour ces tests.

Récemment, il a été démontré l'intérêt éventuel de l'usage de glycoprotéines recombinantes dans le diagnostic sérologique de l'infection humaine par le CeHV-1. En effet il a été démontré que certaines glycoprotéines du CeHV-1, telles que la gG et la gC lorsqu'elles sont employées dans un test de type ELISA, ne sont pas reconnues par les anticorps humains dirigés contre les HSV alors que ces mêmes glycoprotéines sont reconnues par les anticorps humains présents dans le sérum de patients infectés par le CeHV-1. Cependant les auteurs de

l'article (Perelygina 2005), qui présente ces propriétés particulières de ces deux glycoprotéines, tempèrent leurs résultats en indiquant que le nombre de sérums humains testés doit être augmenté avant de pouvoir conclure définitivement sur la qualité de ces tests.

3.2.3. Discussion de l'effet protecteur des anticorps humains anti-HSV vis-à-vis de l'infection par le CeHV-1

Il existe donc une forte réactivité croisée des anticorps humains dirigés contre les virus HSV et les antigènes issus du virus CeHV-1. Cependant cette forte réactivité croisée des anticorps humains anti-HSV-1 et -2 vis-à-vis des différents virus du genre *Simplexvirus* n'est pas retrouvée par les méthodes de neutralisation virale.

Vizoso montra en 1975 qu'il existait une relation immunologique à sens unique entre les HSV et le CeHV-1 grâce à des tests de séroneutralisation. Ainsi les sérums de macaques infectés par le CeHV-1 neutralisent efficacement les virus HSV et le CeHV-1 à des titres comparables, alors que les sérums de patients humains infectés par le HSV ne parviennent à neutraliser efficacement que les virus HSV et pas le CeHV-1 (Vizoso 1975).

Ces résultats furent confirmés dans une étude menée sur 163 sérums de macaques rhésus et 67 sérums humains. La réactivité croisée des sérums anti-HSV et anti-CeHV-1 vis-à-vis des deux virus y a été testée par fixation du complément et par séroneutralisation. Les titres des sérums de macaques ont été plus élevés vis-à-vis des antigènes de CeHV-1 que vis-à-vis des antigènes de HSV-1 par la méthode de fixation du complément (Gary 1977). De manière comparable les sérums humains ont montrés des titres plus élevés pour les antigènes de HSV-1 que pour ceux du CeHV-1 par la méthode de fixation du complément (Gary 1977). Cependant ces observations n'ont pas été retrouvées dans le cas de la méthode de titrage des sérums par séroneutralisation. En effet tous ces sérums d'origine simienne ont montré des titres élevés vis-à-vis de HSV-1 par des méthodes de séroneutralisation (100% des sérums de macaques neutralisant le CeHV-1 ont également neutralisé le HSV-1), alors que seuls quelques sérums humains étaient capable de neutraliser le CeHV-1 (17,5% des sérums humains neutralisant le HSV-1 ont également neutralisé le CeHV-1). Cela indique donc que les anticorps anti-CeHV-1 sont neutralisants pour HSV-1 mais que l'inverse est beaucoup moins fréquent (Gary 1977).

On peut donc en déduire avec certitude que les anticorps dirigés contre les HSV et présents chez de nombreux individus ne constituent en aucun cas une protection efficace contre l'infection humaine par le CeHV-1.

3.3. Traitements de la maladie humaine

3.3.1. *Les molécules disponibles et leur mode d'action*

De nombreuses molécules ont montré leur efficacité contre les herpès virus humains (Denes 2005). Parmi ces molécules, trois ont montré leur efficacité contre le CeHV-1 : l'Acyclovir, le Valaciclovir et le Ganciclovir. L'efficacité des autres molécules antivirales n'a pas été testée pour le moment.

Toutes ces drogues actuellement disponibles sont des analogues de bases puriques et agissent par inhibition de l'ADN polymérase des herpès virus. Ces molécules ne présentent pas de groupe 3'-hydroxyl et interrompent ainsi toute possibilité de polymérisation après leur insertion pendant la synthèse de l'ADN. Certaines de ces drogues, avant leur incorporation à l'ADN, doivent être transformées en drogue monophosphatée par la thymidine kinase virale (TK). Seule cette enzyme virale peut transformer la drogue en drogue monophosphatée contrairement à la TK humaine (ou des autres mammifères) qui ne convertit que très peu la drogue. Puis des kinases cellulaires se chargent de produire la drogue di et triphosphatée. La drogue triphosphatée est alors utilisable par l'ADN polymérase et joue ainsi son rôle d'inhibiteur de la réplication de l'ADN (Denes 2005).

Ces drogues n'ont donc comme action que d'inhiber la réplication virale qui dépend de la TK dans toutes les cellules qui ne se divisent pas. La biodisponibilité par voie orale de ces molécules étant souvent faible, il est conseillé de les administrer par voie intraveineuse pour atteindre rapidement des concentrations en antiviraux efficaces dans le système nerveux central. Comme toutes ces molécules agissent sur la réplication virale, elles ne sont que virostatiques et n'éradiquent en rien le virus présent dans les ganglions à l'état latent (Denes 2005).

3.3.1.1. L'Acyclovir

L'Acyclovir est un analogue de la desoxyguanosine (9-[(2-hydroxyethoxy)méthyl]-9H-guanine) et agit comme inhibiteur de l'ADN polymérase. L'Acyclovir est excrété par voie rénale, la posologie doit donc être réduite chez les patients insuffisants rénaux. L'Acyclovir est bien toléré et induit peu d'effets secondaires. Chez 5 à 10% des patients on observe une néphropathie due à la cristallisation de l'Acyclovir dans les tubules rénaux (Denes 2005). Cette complication apparaît quasiment exclusivement après injection intraveineuse et peut être prévenue par une hydratation correcte du patient avant l'administration de la molécule. L'innocuité de l'Acyclovir tient au fait que sa concentration est 40 à 100 fois plus élevée dans

les cellules infectées par le virus par rapport aux cellules non infectées. De plus, l'Acyclovir est un million de fois plus phosphorylé par la TK virale que par les TK des cellules humaines (Denes 2005).

Dans une population virale naïve de HSV, un virion sur 10^3 à 10^4 semble résistant. On atteint ainsi en moyenne une prévalence de 0,5% de résistance chez les patients immunocompétents contre 4 à 14% chez les patients immunodéprimés (Denes 2005).

L'Acyclovir, première molécule antivirale commercialisée présentant des propriétés antiherpétiques, peut être utilisé pour prévenir ou traiter une infection à CeHV-1 chez l'homme. Cette molécule est administrable par voie orale (en cas d'absence de signes nerveux) et la seule contre-indication vient de sa néphrotoxicité. Il sera donc fortement déconseillé d'employer cette molécule chez les patients présentant une insuffisance rénale d'autant que la posologie recommandée pour le CeHV-1 est 10 fois supérieure à celle recommandée pour le HSV-1.

Etant donné la faible fréquence des infections humaines par le CeHV-1, il est très peu probable qu'une résistance à l'Acyclovir puisse apparaître lors d'un traitement adapté des infections humaines au CeHV-1. A ce propos il est toutefois important de remarquer que des résistances pourraient par contre survenir si l'on diffusait l'utilisation de l'Acyclovir à tous les macaques infectés.

3.3.1.2.Le Valaciclovir

Le Valaciclovir est une prodrogue de l'Acyclovir. Cette molécule est uniquement disponible sous une forme galénique pour l'administration par voie orale. Les concentrations sériques en Valaciclovir sont comparables à celles obtenues avec l'Acyclovir administré par voie intraveineuse. Des essais cliniques sont en cours pour déterminer l'efficacité du Valaciclovir dans le traitement des encéphalites herpétiques à herpès virus humains après une primo-administration d'Acyclovir (Denes 2005).

Le Valaciclovir et l'Acyclovir sont les deux molécules de choix pour le traitement préventif en cas de suspicion de contamination d'un patient par le CeHV-1 en raison de leur faible toxicité et de leur bonne efficacité.

3.3.1.3.Le Ganciclovir

Le Ganciclovir (9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl] guanine) est comme l'Acyclovir un analogue de la desoxyguanosine. Le Ganciclovir diffère de l'Acyclovir par la présence d'un

groupe hydroxyméthyle supplémentaire au niveau de la chaîne carbonée non cyclique. Les concentrations inhibitrices pour le HSV du Ganciclovir sont égales à celles de l'Acyclovir (Denes 2005). Le CeHV-1 est au contraire plus sensible au Ganciclovir qu'à l'Acyclovir aussi bien *in vitro* que *in vivo* dans les modèles animaux lapin (Cohen 2002). Ainsi il est recommandé d'utiliser le Ganciclovir plutôt que l'Acyclovir dans le traitement des patients présentant des symptômes neurologiques, signes d'un stade avancé de développement de la maladie (Cohen 2002). L'utilisation du Ganciclovir doit toutefois être raisonnée de part ses effets secondaires qui peuvent être importants. L'effet secondaire principal est une toxicité pour la moelle osseuse induisant une myélosuppression et principalement une neutropénie. Une thrombocytopénie et une anémie peuvent apparaître lors d'une administration au long cours par voie orale du Ganciclovir (Denes 2005).

L'administration du Ganciclovir dans le cadre d'un traitement préventif de l'infection humaine par le CeHV-1 est donc déconseillée.

3.3.1.4. Les autres molécules antivirales

Il existe actuellement d'autres molécules ayant fait leurs preuves contre les différents herpès virus humains. Ces molécules comme le Foscarnet et le Cidofovir sont aujourd'hui utilisés seuls ou en combinaison avec les autres molécules comme le Ganciclovir en cas d'apparition de résistance du CMV ou du HSV à l'Acyclovir. Ces molécules agissent directement sur l'ADN polymérase virale et n'ont pas besoin d'être préalablement métabolisées par la TK virale. Le Foscarnet et le Cidofovir sont donc actifs sur les souches de HSV ou CMV déficientes en TK ou présentant une TK altérée (Denes 2005). Ces molécules n'ont cependant pas été testées et validées dans le cadre du traitement de l'infection par le CeHV-1. Etant donné le faible risque d'apparition de résistance du CeHV-1 à l'Acyclovir ou au Ganciclovir, ces molécules ne devraient pas être utiles à l'heure actuelle dans le traitement de l'infection humaine par le CeHV-1.

3.3.2. *Traitement préventif chez l'homme*

Tout d'abord il est important de remarquer qu'il n'existe aucun vaccin contre le CeHV-1. Il n'existe pas non plus d'effet protecteur des anticorps anti-herpès simplex humains contre le CeHV-1.

L'agent antiviral de choix en traitement prophylactique après une exposition au CeHV-1 est l'Acyclovir par voie orale. La concentration inhibitrice à 50% de l'Acyclovir pour le CeHV-1 en culture est environ 10 fois plus élevée que celle pour le HSV-1, la posologie recommandée sera donc de 800 mg par voie orale 5 fois par jours pendant au moins 14 jours (Holmes 1995)

ou un traitement par le Valaciclovir 1g par voie orale 3 fois par jour pendant 14 jours.

3.3.3. *Traitement curatif*

En cas de mise en place du traitement après l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie (cutanés, généraux ou nerveux) le traitement de choix est l'administration de Ganciclovir 5mg/kg par voie IV 2 fois par jour pendant 14 à 21 jours ou d'Acyclovir à la dose de 12 à 15 mg/kg par voie IV 3 fois par jour pendant 14 à 21 jours. Après régression des symptômes le traitement doit être suivi d'un traitement de couverture par le Valaciclovir 1g par voie orale 3 fois par jour à vie du fait du risque de récurrence.

4. Comparaison entre l'encéphalite humaine à CeHV-1 et les encéphalites dues aux herpès virus humains

Un certain nombre d'herpès virus humain peuvent induire une méningo-encéphalite chez l'homme, HSV-1 étant le virus le plus fréquemment mis en cause. Les encéphalites à HSV-1 représentent environ 10 à 20% de toutes les encéphalites virales chez l'homme (Denes 2005). La prévalence des encéphalites herpétiques est estimée entre 1 à 4 cas par an pour un million d'habitants suivant les pays. Les autres herpès virus humains pouvant induire une encéphalite chez l'homme sont le HHV-6 (*Human Herpesvirus type 6*) responsable de la roséole infantile ou sixième maladie, et l'EBV (Epstein-Barr virus), respectivement impliqué dans 7% et 7,6% des cas d'encéphalites herpétiques chez les patients immunocompétents (Denes 2005). Chez les patients immunodéprimés, les encéphalites herpétiques sont principalement dues au CMV (Cytomégalovirus). Les encéphalites au CMV peuvent fréquemment toucher les malades du SIDA (suivant une prévalence de 12%) et dans une moindre mesure les patients greffés (2%) mais très rarement les patients immunocompétents (Arribas 1996).

Les encéphalites herpétiques à HSV-1 chez l'homme peuvent affecter des individus de tous âges avec toute fois une incidence plus élevée vers 25 ans puis 65 ans. En l'absence de traitement antiviral, cette encéphalite est mortelle dans 70% des cas et même en cas de traitement spécifique, la mortalité reste élevée autour de 20 à 30% (Denes 2005). On retrouve ici les taux de mortalité observés dans les cas d'encéphalites à CeHV-1 chez l'homme en l'absence de traitement antiviral et en cas de traitement spécifique démarré après l'apparition des symptômes nerveux.

Lors des encéphalites humaines à HSV-1, les symptômes observés pendant la phase aiguë sont essentiellement dus à la production de diverses molécules dans le système nerveux central (cytokines telles que l'IL-6, prostaglandines, catécholamines et glucocorticoïdes). La réplication virale dans le cerveau est quant à elle responsable des séquelles neurologiques

voire du décès du patient (Denes 2005). On peut raisonnablement penser que cela s'applique également aux encéphalites humaines à CeHV-1.

Ces dernières années, l'influence de l'apolipoprotéine E (apoE) dans le développement de l'encéphalite herpétique chez l'homme est étudiée. En effet une étude anglaise a montré que le fait de posséder l'allèle apoE ε2 constituait un facteur de risque (OR=4,6) pour le développement d'une encéphalite herpétique à HSV-1 (Lin 2001). Le mécanisme d'action de l'apoE est encore inconnu mais une étude récente montre que l'apoE pourrait avoir une activité antivirale directe sur différents virus dont les HSV-1 et -2. L'apoE aurait une activité virucide et/ou inhiberait l'attachement viral, limitant ainsi l'infectiosité virale. Il apparaît donc qu'il pourrait exister des facteurs génétiques pouvant influencer l'issue clinique d'une infection virale, ici l'encéphalite herpétique suivant l'infection humaine par le HSV-1. De la même manière, des facteurs génétiques pourraient être à l'origine d'une sensibilité accrue à l'infection par le CeHV-1 chez l'homme.¹

D'une manière générale, on pourra remarquer que la physiopathologie et le traitement sont très proches entre les encéphalites à CeHV-1 et les encéphalites herpétiques à HSV-1. La gestion de la maladie d'un patient atteint d'une encéphalite herpétique à CeHV-1 pourra donc s'inspirer de la gestion d'une encéphalite herpétique à HSV-1.

¹ Depuis la rédaction de cette thèse, une équipe internationale coordonnée par Jean-Laurent Cosanova, faculté de Médecine de Necker, Paris, vient de rapporter que deux jeunes enfants qui avaient développé une encéphalite virale herpétique, présentaient de manière homozygote une mutation sur le gène UNC-93B1. La protéine codé par ce gène est impliquée dans la présentation des peptides exogènes par les molécules de classe 1 et de classe 2 ainsi que dans la transduction du signal de certains TLR (Toll like receptor, TLR3, TLR7, TLR9) aboutissant à l'induction de la sécrétion des interférons de type 1. Chez l'homme les mutations décrites n'affectent que la sensibilité des individus à développer une encéphalite herpétique.

Référence : Casrouge A, et al. Herpes Simplex Virus Encephalitis in Human UNC-93B Deficiency. Science. 2006 Sep 14; Published online September 14 2006;10.1126/science.1128346.

CHAPITRE V : LA REGLEMENTATION ACTUELLE EN FRANCE, EN EUROPE ET DANS LE MONDE

1. La réglementation actuelle sur la manipulation du virus

D'après l'arrêté du 18 Juillet 1994 (annexe 4), publié au Journal officiel de la République française le 30 juillet 1994, fixant la liste des agents biologiques pathogènes, le CeHV-1 fait partie du groupe 3 de la classification des agents biologiques. De même d'après la directive 2000/54/CE du parlement européen du 18 septembre 2000, le CeHV-1 fait également partie du groupe 3 de la classification des agents biologiques fixée par cette directive. La réglementation en vigueur concernant la manipulation des agents biologiques est régie par l'article R231-61-1 du code du travail, cet article est en vigueur depuis le 6 mai 1994. Cet article indique que « le groupe 3 comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est possible, mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficaces ». La directive 2000/54/CE indique également que « les activités comportant la manipulation d'un agent biologique doivent être exécutées [...] uniquement dans des zones de travail correspondant au moins au niveau de confinement numéro 3, pour un agent biologique du groupe 3 ».

Ainsi la réglementation française et européenne exige que toute manipulation du CeHV-1 nécessite un niveau de confinement numéro 3.

Aux USA, la réglementation actuelle recommande d'utiliser des pratiques et des équipements de biosécurité de niveau 2 pour toutes les activités comportant l'utilisation ou la manipulation des tissus, des fluides corporels et des matériaux issus de tissu ou de culture primaire de macaques. Le niveau 3 de biosécurité est requis pour les activités impliquant la manipulation de matériaux contenant ou suspecté de contenir du CeHV-1, ceci incluant la propagation *in vitro* du virus dans un but diagnostique. Le niveau 4 de biosécurité est recommandé pour la production et la manipulation de grande quantité de CeHV-1 (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Department of Health and Human Services, Fourth Edition April 1999).

2. La réglementation actuelle sur l'importation des macaques concernant le CeHV-1

L'arrêté du 19 Avril 2002 (voir annexe 4) fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux du genre *Macaca* importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer en provenance des pays tiers destinés à des établissements de présentation au public à caractère mobile, visés par ce texte « Ont été soumis [...] à une épreuve de dépistage sérologique annuelle avec résultat négatif de l'herpès virose B [...] dans un laboratoire autorisé ou à une épreuve de dépistage sérologique avec résultat négatif de l'herpès virose B, réalisée dans les 40 jours précédant le chargement ».

Ce même arrêté, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux du genre *Macaca* importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, destinés à des établissements d'expérimentation animale, des établissements d'élevage spécialisés, des établissements fournisseurs (au sens du décret 87-848 modifié du 19 octobre 1987) et des établissements de présentation au public à caractère fixe, en provenance des pays tiers, « ont été soumis [...] à une épreuve de dépistage sérologique avec résultat négatif de l'herpès virose B [...] Cette disposition ne s'applique pas aux macaques à longue queue ou macaques crabiers (*Macaca fascicularis*) originaires et en provenance de l'île Maurice ».

Ainsi d'une manière générale, l'importation de tout animal du genre *Macaca* ne peut se faire que si l'animal a subi une épreuve de dépistage sérologique et est séronégatif pour le CeHV-1. Cette disposition n'étant pas obligatoire pour les macaques originaires et en provenance de l'île Maurice. En effet la colonie de macaques crabiers vivant sur cette île est réputée naturellement indemne de CeHV-1.

Le texte actuel précise que le vétérinaire officiel certifie que l'animal a subi une épreuve de dépistage sérologique avec résultat négatif de l'herpès virose B, réalisé dans un laboratoire autorisé. Cependant il n'existe à l'heure actuelle aucune liste de laboratoires autorisés à pratiquer ces tests. En pratique ces tests sont réalisés par certains laboratoires de référence (voir annexe 3). Ces tests peuvent également être réalisés dans les pays où sont élevés les macaques (par exemple en Chine) par des laboratoires indépendants.

3. Les mesures à prendre en cas de découverte d'animal positif

L'herpès virose à CeHV-1 n'est pas à l'heure actuelle en France une maladie légalement contagieuse, à ce titre il n'existe pas de réglementation précise régissant le cas où un animal vivant en France est découvert comme infecté par le CeHV-1. Le diagnostic d'infection par le CeHV-1 peut être réalisé par une épreuve de dépistage sérologique ou par détection du virus, de ses antigènes ou de son génome chez cet animal.

L'infection par le CeHV-1 abouti à une infection permanente de l'hôte et cet hôte peut être potentiellement excréteur de virus, y compris en l'absence de tout signe clinique. Cet animal présente donc un risque pour toute personne amenée à avoir des contacts avec celui-ci ou son environnement. Lors de la découverte de l'infection d'un animal par le CeHV-1, que ce soit un hôte naturel du virus ou non, il est conseillé de sacrifier l'animal et d'incinérer le cadavre. Les laboratoires équipés pour la virologie et l'immunologie peuvent toute fois procéder à des essais de mise en évidence du virus ou de recherche des anticorps neutralisants.

Aux USA, la réglementation actuelle recommande que toutes les colonies de macaques, même celles connues pour être exemptes d'animal séropositif pour le CeHV-1, devraient être présumées comme naturellement infectées. Les animaux avec les lésions orales suggestives d'une infection active par le CeHV-1 doivent être identifiés et manipulés avec une attention extrême. Pour les études réalisées avec des animaux infectés expérimentalement par le CeHV-1 les textes conseillent une animalerie remplissant les conditions de biosécurité de niveau 4 (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Department of Health and Human Services, Fourth Edition April 1999). En France il n'existe pas de texte régissant la manipulation des animaux infectés par le CeHV-1 alors que la réglementation française et européenne limite la culture du virus en secteur protégé de type 3.

CHAPITRE VI : LES MESURES PREVENTIVES

1. Chez l'animal :

1.1. Quarantaine clinique

La quarantaine clinique des animaux n'est pas légalement obligatoire à l'arrivée des animaux en France étant donné que ces animaux en ont déjà subi une dans leur pays d'origine avant leur importation. Cependant la réglementation impose que les animaux restent dans leur premier lieu d'accueil en France pendant une durée minimale de 30 jours. Dans la pratique cette période peut être mise à profit pour le dépistage clinique et biologique de toute affection qui mettrait en danger soit l'animal lui-même soit les animaux avec lesquels il sera en contact soit les personnels qui s'occupent de ces animaux. De plus sur le plan pratique, les règles de bonne gestion des animaleries imposent que tous les animaux en provenance d'un autre élevage subissent une période de quarantaine durant laquelle sont dépistées toutes les maladies contagieuses qui risqueraient de mettre en péril la colonie. En fonction de la provenance des animaux et des expériences dans lesquelles ils seront utilisés, diverses sérologies peuvent être utiles.

Quelles que soient les circonstances, en ce qui concerne le portage du virus CeHV-1 qui représente un risque non pour les animaux mais pour les personnels qui les manipulent, il est fortement recommandé de pratiquer durant la période de quarantaine un dépistage systématique de cette maladie. Les tests sérologiques à la recherche d'anticorps spécifiques du CeHV-1 seront réalisés à l'arrivée des animaux dans la zone de quarantaine. Il est important de renouveler cette sérologie à la fin de la quarantaine des animaux. En effet, il a été montré que le transport et les changements de condition de vie des animaux étaient très propices aux réactivations virales (nous invitons le lecteur à se référer au chapitre 3 de cette thèse pour plus de détails sur ce sujet). Cette seconde sérologie peut donc permettre de détecter les animaux qui se sont séropositivés durant la quarantaine. Cette deuxième sérologie permet également de détecter des animaux initialement indemnes d'infection par le CeHV-1 et qui durant la quarantaine ont pu se contaminer auprès d'animaux excréteurs du virus.

La recherche de lésions typiques de l'infection par le CeHV-1 chez les animaux est une méthode diagnostique peu sensible chez le macaque étant donné la fréquence des formes asymptomatiques de l'infection primaire et des réactivations. De plus le portage latent du virus est totalement asymptomatique comme nous l'avons déjà détaillé. Nous insisterons donc à nouveau sur l'importance du dépistage sérologique systématique.

1.2. La sérologie anti-CeHV-1 chez le macaque :

A l'heure actuelle en France, il n'existe aucune obligation légale de tester les macaques vis-à-vis de l'infection par le CeHV-1. En effet l'infection par le CeHV-1 chez le macaque n'est pas considérée comme une MRC (maladie réputée contagieuse)¹. Pourtant le CeHV-1 est reconnu comme responsable d'une zoonose, certes rare chez l'homme, mais souvent mortelle. Une surveillance du statut sérologique des macaques vis à vis du CeHV-1 est une bonne mesure de prévention du risque de contamination de l'homme par cet agent. Cette surveillance du statut sérologique des macaques vis-à-vis du CeHV-1 permet en effet d'identifier les animaux porteurs. Cependant quelque soit la nature du dépistage sérologique réalisé, et de manière indépendante du laboratoire expert qui gère ce dépistage, il existe une faible proportion d'animaux porteurs du virus mais incapables de développer un taux d'anticorps dépassant le seuil de détection sérologique.

En dehors de la période quarantaine que nous avons détaillé plus haut, le dépistage sérologique du CeHV-1 peut être réalisé sur tous les animaux d'une colonie avec une périodicité qui dépendra du mode de stabulation et de la fréquence de l'introduction de nouveaux individus.

1.3. La PCR CeHV-1 chez le macaque :

C'est à l'heure actuelle la méthode la plus sensible pour le dépistage du virus chez les macaques. Elle est en particulier plus sensible que le dépistage par mise en culture in vitro ou l'inoculation à un animal sensible (voir chapitre 3). Pour dépister le virus encore faut-il avoir une chance qu'il soit présent dans le prélèvement biologique étudié. Nous avons à plusieurs reprises insisté sur la totale absence du virus dans les muqueuses pendant les périodes de latence infectieuse. On ne peut avoir une chance de mettre en évidence le virus chez un animal porteur en phase de latence que dans les ganglions des racines sensitives postérieures (ce qui bien entendu n'est possible qu'en cas d'autopsie de l'animal). Les prélèvements biologiques qui peuvent être réalisés sur l'animal vivant sont des prélèvements des muqueuses et éventuellement des conjonctives oculaires par écouvillonnage.

La recherche de l'ADN viral par PCR peut être utile lorsqu'un animal présente une sérologie douteuse à plusieurs reprises ou chez les animaux séronégatifs présentant des signes cliniques en faveur d'une infection par le CeHV-1. Dans ce dernier cas soit on se situe à la période de séronégativité au début d'une primo-infection soit l'animal peut présenter un déficit immunitaire grave (parfois iatrogène) qui l'empêche de développer des anticorps anti-CeHV-1.

¹ Pendant la rédaction de cette thèse, le 17 février 2006 est paru un décret actualisant les listes des "MRC" (maladies réputées contagieuses) dans lesquelles figure désormais l'herpès virose B.

Cette recherche pourra également être indiquée en cas d'accident d'exposition d'un homme. Dans ce cas quelque soit le statut sérologique de l'animal il peut être recommandé de pratiquer un test systématique de dépistage du génome viral dans les prélèvements de muqueuses. Nous verrons cependant que la conduite à tenir en cas d'accident d'exposition d'un homme ne tiendra pas compte de cette recherche car elle parviendra de manière différée par rapport à l'accident qui requiert la mise en route d'un traitement prophylactique rapide (voir plus loin). De plus la négativité du test de PCR ne permet en rien d'affirmer que le risque est nul. En effet, l'excrétion de virus n'est pas un phénomène continu et il se peut très bien que le virus soit absent des prélèvements qui parviennent au laboratoire alors qu'il était présent dans le liquide biologique au moment de l'accident de contamination.

2. Chez l'homme :

2.1. Protection et information des personnes

En France on peut se référer aux recommandations données dans un document édité par le CNRS (voir annexe 6). Aux USA on trouve des textes précis et détaillés tels que ceux édités par le CDC (Centers for Disease Control). Ces différentes directives pour la prévention de l'infection par le CeHV-1 chez les manipulateurs de singes sont rappelées ci-dessous (traduction fidèle des recommandations publiées en 1987 par le CDC, MMWR 1987) :

- Les macaques doivent être utilisés uniquement pour des recherches où leur emploi est clairement incontournable.
- Si cela est possible, les macaques qui sont nécessaires pour des recherches doivent être exempts d'infection par le CeHV-1 et doivent être maintenus dans les conditions appropriées pour préserver leur statut négatif vis-à-vis du CeHV-1. La possibilité d'acquérir et de maintenir une colonie exempte d'infection par le CeHV-1 doit être explorée par chaque installation animale.
- Tous les macaques de statut inconnu vis à vis du CeHV-1 doivent être considérés comme porteurs du virus et capables d'excréter du virus de façon intermittente y compris en l'absence de lésion visible. La manipulation directe des macaques doit être réduite au minimum. La capture, la contention ou tout autre manipulation de macaques vigiles à mains nues doivent être proscrites. Elles doivent être accomplies en utilisant des méthodes adaptées de contentions physiques et chimiques. Les macaques manipulés régulièrement doivent être logés dans des cages à fond mobile qui permettent une contention physique de l'animal avant la manipulation. Si cela est réalisable, la contention chimique par injection d'anesthésiques (par exemple, kétamine) doit être administrée avant de retirer l'animal de la cage. Dans le cas d'animaux gérés en groupes captifs, les captures

s'adapteront au comportement des animaux de manière à éviter les risques au moment des captures. On pourra en particulier utiliser des sas de contention facilitant la prise d'un animal après son isolement du groupe.

- Les manipulateurs de macaque doivent retirer les animaux vigiles des cages en portant des gants en cuir renforcés recouvrant les bras. Les manipulateurs doivent être en plus protégés avec un vêtement long pour se prémunir des griffures et un masque de protection facial (ou un masque de chirurgie et des lunettes de protection) pour éviter l'exposition des yeux et des muqueuses aux sécrétions de macaque. Si les manipulateurs de macaques choisissent de ne pas manipuler les animaux contenus chimiquement avec des gants en cuir, des gants en latex ou vinyle doivent être portés pour éviter le contact direct avec des sécrétions de macaque. Une double paire de gants limite le risque en cas de déchirure accidentelle.
- Les cages ou tout autre matériel pouvant être souillés par du virus doivent être exempts d'arêtes et de coins pointus qui peuvent causer des éraflures ou des blessures aux manipulateurs. Les cages doivent être conçues et disposées dans les animaleries de sorte que le risque pour les manipulateurs d'être accidentellement agrippé ou griffé par un singe soit réduit au minimum. L'accès aux zones où les macaques résident ou sont manipulés doit être limité aux personnes ayant été correctement informées des procédures de prévention du risque d'infection. Toutes les autres personnes ne pénétreront dans les zones à risque que si elles sont accompagnées par des personnes compétentes.
- Le dépistage systématique régulier des macaques à la recherche de signes cliniques de l'infection par le CeHV-1 n'est pas recommandé car inutile. En effet, un animal, même précédemment diagnostiqué comme négatif pour le virus ou ses anticorps, pourrait être infectieux au moment de l'exposition humaine accidentelle. En outre, de tels examens cliniques peuvent augmenter le risque de contamination des examinateurs. Dans les cas où les travaux de recherche sur les macaques peuvent induire une immunosuppression des animaux, il conviendra de choisir avec attention les animaux en fonction de leur statut vis-à-vis du CeHV-1, en effet de telles conditions peuvent augmenter l'excrétion virale. Bien que le dépistage systématique ne soit pas très utile, il est bien évident que les macaques porteurs de lésions orales ou oculaires compatibles avec une infection active par le CeHV-1 doivent être mis en quarantaine jusqu'à l'obtention d'un diagnostic de certitude quant au statut de l'animal vis-à-vis du CeHV-1.
- Les personnes qui manipulent des macaques, y compris les vétérinaires et les chercheurs, doivent être formées aux méthodes de contention et d'utilisation des vêtements de protection afin de prévenir les risques de morsure ou égratignure. La formation doit être continue. Les manipulateurs de macaque doivent également être avertis de la nature de l'infection par le CeHV-1, de la nécessité d'éviter toutes morsures, griffures et toute autre

exposition aux sécrétions de macaque, de la nécessité de nettoyer les blessures immédiatement. Ils doivent être également avertis des symptômes précoces de l'infection par le CeHV-1 et de la nécessité de rapporter immédiatement à leur responsable et à leur médecin tous les signes cliniques ou symptômes suggestifs de l'infection par le CeHV-1.

- Toutes les blessures par morsure ou griffure causées par des macaques ou des cages qui pourraient être souillées avec des sécrétions de macaque doivent être frottées immédiatement et complètement nettoyées avec de l'eau et du savon. De tels incidents doivent être rapportés au directeur de l'animalerie et être enregistrés dans un journal des morsures et des griffures. Les blessures superficielles qui peuvent être convenablement nettoyées n'exigent probablement aucun autre traitement. Des blessures plus étendues doivent être mentionnées au médecin du travail. Chaque animalerie doit identifier un médecin du travail qui sera appelé comme conseiller dans de telles situations. Ces médecins, en plus de leurs connaissances générales au sujet des morsures animales, doivent être bien informés au sujet du risque de l'infection par le CeHV-1, de ses symptômes et du traitement éventuel. Après une morsure ou une griffure, la personne doit rapporter immédiatement toutes les lésions de peau ou symptômes neurologiques (tels que des démangeaisons, de la douleur ou des engourdissements) près du site de la blessure ou de n'importe quel autre symptôme peu commun. Il est de la responsabilité du supérieur, quand aucune maladie n'est enregistrée, de déterminer le statut clinique de la personne à intervalles hebdomadaires jusqu'à un mois après l'exposition. L'apparition de symptômes suggestifs de l'infection par le CeHV-1 doit être rapportée immédiatement au médecin du travail.
- Dans certaines situations, un traitement prophylactique avec un agent antiviral peut être considéré avant l'apparition de signes ou de symptômes suggestifs de l'infection par le CeHV-1. Une telle situation peut survenir quand un manipulateur subit une blessure profonde et pénétrante qui ne peut pas être convenablement nettoyée. Ces situations doivent être contrôlées par le médecin du travail. Ce dernier point va être développé ci-dessous.

2.2. Conduite à tenir en cas d'accident d'exposition à un macaque :

Étant donné la dangerosité de l'infection par le CeHV-1 pour l'homme, il conviendra de prendre un certain nombre de mesures en cas d'accident d'exposition d'une personne à un macaque, même si l'évaluation du risque de contamination en fonction du contexte fait apparaître un risque faible (animal antérieurement séronégatif). Les accidents d'exposition à considérer découleront soit de contact direct par les morsures ou griffures de macaque, ou de contact indirect par les projections de fluides biologiques (urine, salive) ou de fèces issus de macaque sur les muqueuses ou une plaie cutanée même superficielle.

En annexe 7 le lecteur trouvera un exemple de protocole pouvant être appliqué en cas d'accident d'exposition d'une personne à un macaque. Nous commenterons ci-dessous les mesures sanitaires et médicales recommandées :

Mesures sanitaires à prendre immédiatement chez le macaque incriminé :

1. Prévenir le vétérinaire sanitaire en charge de l'animal et la DSV du département.

Même si l'herpès virose B du macaque n'est officiellement en France une MRC (maladie réputée contagieuse) ou à déclaration obligatoire, il conviendrait toutefois de prévenir au minimum le vétérinaire sanitaire en charge de l'animal afin qu'il puisse en cas de besoin répondre du statut de l'animal vis-à-vis du CeHV-1.

En cas de morsure, cette mesure est de toute façon obligatoire dans le cadre de la gestion sanitaire vis-à-vis de la rage.

2. Prélèvement sanguin sur tube sec pour sérologie : effectuer les tests sérologiques

Ce prélèvement de sérum chez le macaque impliqué dans l'accident d'exposition a pour but de rechercher les anticorps dirigés contre le CeHV-1 mais également contre d'autres virus comme le SIV. La découverte d'une séropositivité vis-à-vis du CeHV-1 chez cet animal sera un facteur aggravant dans l'évaluation du risque de contamination de la personne exposée, bien que le résultat ne sera disponible que quelques jours après l'accident contaminant. Cependant, une sérologie négative ne sera jamais garante d'une absence totale de risque. En effet comme nous l'avons déjà souligné, on a pu démontrer que certains animaux porteurs du virus sont séronégatifs (voir page 85).

3. Prélèvements pour culture ou PCR au niveau de la bouche, des yeux et de l'appareil génital du singe impliqué

Ces prélèvements (par écouvillonnages) ont pour but de mettre en évidence le virus CeHV-1 au niveau des sites d'excrétion potentiels du virus chez le macaque. Un résultat positif sera là encore un facteur aggravant du risque de contamination de la personne exposée au macaque. Un résultat négatif pourra être un facteur minimisant le risque que dans le cas où la recherche du virus est réalisée par PCR (méthode la plus sensible) et que le prélèvement a été parfaitement réalisé (voir chapitre 3 pour plus de détails sur la technique de prélèvement).

4. En cas d'euthanasie¹ de l'animal veiller à inspecter minutieusement les territoires cutanés et muqueux oraux, génito-anal ainsi que la conjonctive oculaire. Si ces territoires sont suspects de lésions dues au CeHV-1, faire des biopsies et les congeler à -80°C dans le but d'extraire ultérieurement l'ADN afin de mettre en évidence le génome viral par PCR. Prélever surtout

¹ Il est ici important de rappeler que l'euthanasie des animaux mordeurs ou griffeurs ne peut intervenir moins de 30 jours après la griffure ou morsure. Cette interdiction découle directement de la législation française réglementant la rage chez les animaux sauvages.

les deux ganglions des nerfs trijumeaux ainsi que les ganglions des racines postérieures sacrées. Conserver ces échantillons de tissus nerveux à -80°C pour recherche par PCR du génome viral.

14 – 21 jours post-exposition, si l'animal n'a pas été euthanasié.

Prélèvement sanguin sur tube sec pour un nouveau contrôle sérologique. Ce second contrôle a pour objet de rechercher une éventuelle séroconversion de l'animal vis-à-vis du CeHV-1 au cas où l'animal aurait été en cours de primo-infection au moment de la morsure.

Conduite à tenir chez les individus exposés au risque :

DANS L'IMMEDIAT

- **Parage de la plaie, éventuellement exploration chirurgicale**

On évitera de mettre en avant le risque de contamination par le CeHV-1 devant une urgence chirurgicale ou médicale. La gestion du risque doit être analysée avant l'accident et ne pas faire perdre de temps au moment de la gestion d'un accident.

- **Prévention des risques infectieux :**

Comme toujours : Rage , Tétanos et Pasteurelles (*P. multocida*, *P. haemolytica*) mais aussi streptocoques, staphylocoques, *Nesseria*, corynébactéries, entérocoques, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*,...

Herpes B : Traitement prophylactique : 100% d'efficacité si <72h

Zélitrex® 500 : 1g (=2 cp) x 3 /jour, 14 jours

Ce traitement peut être administré à titre préventif contre l'infection humaine par le CeHV-1. Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre 4) le Valaciclovir (comme l'Acyclovir dont il est le précurseur) peut être administré chez l'homme à titre préventif en raison de sa faible toxicité. Cette molécule a également montré son efficacité contre le CeHV-1 même si les doses doivent être augmentées par rapport au traitement classique des HSV chez l'homme. De plus il n'a jamais été décrit de développement de symptômes de la maladie à CeHV-1 chez l'homme si ce traitement était prescrit à titre préventif. Enfin ce traitement préventif évite également l'administration au long cours de molécules antivirales inévitable en cas d'apparition de symptômes de la maladie chez l'homme (voir traitement curatif).

- **Prélèvement sanguin sur tube sec pour sérologies HSV et CeHV-1. Il existe une forte réaction croisée entre la sérologie CeHV-1 et HSV. Il conviendra donc d'effectuer une comparaison entre les résultats obtenus pour le sérum à J0 et J14 afin de chercher une séroconversion CeHV-1. Attention aux difficultés d'interprétation car comme nous**

l'avons déjà envisagé (page 112) 90% des adultes sont HSV1 positifs. Etant donné la réaction croisée avec le CeHV-1 il sera donc très difficile d'observer une séroconversion vraie sauf à utiliser un test permettant de ne doser que les anticorps spécifiques du CeHV-1. Cependant il faut que le système immunitaire du malade soit capable de fabriquer des anticorps contre les épitopes (minoritaires) spécifiques du CeHV-1. On sait que de tels anticorps sont apparus chez les patients qui ont développé à la suite de leur contamination une maladie virale due au CeHV-1. Les techniques permettant de dépister ces anticorps sont lourdes et ne peuvent être réalisées que par des laboratoires capables de cultiver le virus CeHV-1 à des fins diagnostiques. Ces laboratoires sont soit aux USA soit en Angleterre (voir annexe 2). Ces techniques sont l'ELISA compétitif ou le Western blot. Etant donné les limites de l'ELISA compétitif (voir page 113) nous recommanderons particulièrement le Western blot.

Il est à notre avis inutile de pratiquer des sérologies systématiques spécifiques du CeHV-1 (expertises lourdes et coûteuses qui requièrent l'expédition des sérums aux USA ou en Angleterre) des personnels à risque en dehors du contexte d'un accident. En effet, en dehors des cas de séroconversion vis-à-vis du CeHV-1 suivant un accident d'exposition à un macaque, l'observation d'une sérologie positive ponctuelle chez l'homme n'a aucune valeur (voir partie 3.2. du chapitre 4). Il est aussi inutile de pratiquer des sérologies systématiques HSV1/2 chez les personnels à risque. En cas de positivité cela n'apporte rien (anticorps non protecteurs) en cas de négativité cela n'apporte rien non plus de savoir que quelques mois avant l'accident d'exposition le patient était HSV1/2 négatif (le patient a très bien pu subir une séroconversion HSV depuis le dernier dépistage). Par contre nous insisterons sur la valeur du sérum prélevé le jour même de l'accident. Ce sérum est très précieux et plusieurs échantillons devront être conservés par le LAM en charge du dossier du patient.

- Prélèvement au site d'inoculation après désinfection pour analyse bactériologique et virologique. En ce qui concerne la mise en évidence du CeHV-1, on conseillera de rechercher l'ADN viral par PCR (même si cela n'est pas informatif sur la présence de virus répliquatif) en raison de la grande sensibilité de cette technique.

14 – 21 JOURS POST-EXPOSITION :

Prélèvement de sang sur tube sec pour sérologies HSV et CeHV-1. Cette analyse sérologique a pour but, en comparaison de celle effectuée le jour de la contamination potentielle du patient, de rechercher chez le patient une séroconversion vis-à-vis du CeHV-1.

ENVOIE aux laboratoires experts avec un échantillon de sérum prélevé à J 0.

TRAITEMENT CURATIF (dès les premiers signes cliniques au niveau du site d'inoculation avant l'apparition des signes neurologiques) :

(Le lecteur pourra se référer au chapitre 4 pour plus de détails sur les bases du traitement)

Ganciclovir 5mg/kg IV 2X/j pendant 14-21j : le virus CeHV-1 est plus sensible au Ganciclovir qu'à l'Acyclovir ou dans le cas où ce traitement serait mal supporté ou contre indiqué chez le patient : Acyclovir : 12-15mg/kg IV 3X/j pendant 14-21j,

puis Valaciclovir PO à vie. En l'état actuel des connaissances, le traitement au long cours par une drogue antivirale est malheureusement nécessaire dans le cas d'une infection humaine par le CeHV-1 ayant entraîné l'apparition de symptômes caractéristiques qu'ils soient locaux, généraux ou neurologiques. En effet en cas d'arrêt de ce traitement on prend un fort risque de voir apparaître une réactivation virale chez le patient. Le traitement antiviral devra donc être poursuivi tout au long de la vie du patient.

CHAPITRE VII : ÉVALUATION D'UN TEST SEROLOGIQUE

1. Introduction :

A l'heure actuelle il existe plusieurs méthodes pour le diagnostic sérologique de l'infection par le CeHV-1 chez le macaque. Ces méthodes ont déjà été détaillées dans la partie 4 du chapitre 3 de cette thèse et nous ne ferons que les énumérer :

- tests de séroneutralisation nécessitant la culture du CeHV-1 (minimum laboratoire de type P3) ;
- dosages radio-immunologiques d'anticorps soit par test d'immunocapture soit par tests compétitifs. Les antigènes viraux utilisés par ces tests dérivent soit du CeHV-1 soit d'autres virus apparentés (HSV, CeHV-2, CeHV-16);
- recherche et identification d'anticorps par Western blot utilisant des antigènes viraux issus de cultures du CeHV-1 ;
- divers tests ELISA employant des antigènes viraux issus du CeHV-1, des HSV, du CeHV-2, du CeHV-16 ou bien différentes protéines recombinantes du CeHV-1.

1.1. Les tests mis en œuvre par les laboratoires de référence :

Différents laboratoires dans le monde proposent de réaliser le dépistage sérologique CeHV-1 sur les sérums de macaque. Le tableau A indique les détails disponibles quant aux types de tests et aux méthodes employés par ces laboratoires. Les méthodes les plus utilisées aujourd'hui sont les tests ELISA utilisant des antigènes viraux issus du CeHV-1 du macaque ou du CEHV-16 du babouin ou des HSV humains. Le Western blot utilisant les antigènes viraux du CeHV-1 n'est proposé que par quelques rares laboratoires de référence et est réservé à la confirmation de résultats douteux obtenus par les tests ELISA. Malgré son coût important c'est la technique de référence pour affirmer la spécificité des anticorps détectés.

Tableau 5 : Description des tests sérologiques pratiqués par les laboratoires de référence

Laboratoire	Type de test	Antigène	Type de résultat
B Virus Research and Resource Laboratory Atlanta, GA 30302-4118 USA	ELISA compétitif Western blot	CeHV-1	Résultat Positif/Négatif Titre en anticorps
ERNVL Central Public Health Lab London NW9 5HT England	ELISA	CeHV-1	Résultat Positif/Négatif
VRL Laboratories San Antonio, TX 78229 USA	ELISA Western blot	CeHV-1	Valeur chiffrée et résultat donné en fonction d'un seuil

Laboratoire	Type de test	Antigène	Type de résultat
BioReliance Simian Diagnostic Laboratory Rockville, MD 20850 USA	ELISA	CeHV-1	Valeur chiffrée et résultat donné en fonction d'un seuil
VetDiagnostics Victoria House Small Dole BN5 9XE - Henfield West Sussex - United Kingdom	ELISA	Non communiqué par le laboratoire	Résultat Positif/Négatif
Biomedical Primate Research Centre 2280 GH Rijswijk The Netherlands	ELISA	HSV-1	Valeur chiffrée et résultat donné en fonction d'un seuil
Shin Nakamura Department of Cellular and Molecular Biology Primate Research Institute Kyoto University Inuyama, Aichi 484-8506, Japan	ELISA	CeHV-16	Valeur chiffrée et résultat donné en fonction d'un seuil

Les informations concernant les techniques employées par ces laboratoires de référence nous ont été communiquées sur demande de notre part. A notre connaissance aucun travail de standardisation entre ces divers experts n'a jamais été réalisé. Les travaux comparatifs rapportés dans la littérature ne concernent que des échanges limités entre les laboratoires. En dehors du BPRC, de BioReliance et du Docteur Shin Nakamura, nous n'avons obtenu aucune précision concernant le calcul des seuils de positivité, de la sensibilité et spécificité des tests réalisés. Le laboratoire VetDiagnostics est le seul à avoir refusé de nous communiquer la moindre information sur le test qu'il pratique.

1.2. Sérologie herpès réalisée à Toulouse par réactivité croisée vis-à-vis de HSV-1 et HSV-2.

S'appuyant sur l'expérience du BPRC (Docteur Henk Niphuis), le laboratoire d'analyse médicale (LAM) du Docteur M. Blancher-Sardou (M.B-S) a mis en place dès 2004 un test ELISA basé sur des extraits antigéniques de HSV-1 et HSV-2 pour la recherche des anticorps anti-CeHV-1 chez les macaques. Comme nous l'avons précédemment signalé, la prévention contre l'infection par le virus CeHV-1 passe par la surveillance régulière de la sérologie virale des animaux. En pratique, les laboratoires listés plus haut sont tous à l'étranger et deux seulement sont en Europe. Le transport des échantillons passe pour tous les laboratoires situés en dehors de l'Union Européenne par une demande de CITES. Les procédures administratives sont lourdes et les coûts de transport onéreux. Pour faciliter le dépistage sérologique dans les laboratoires français, le LAM du Docteur M. Blancher-Sardou (Toulouse) propose de réaliser

des tests de sérologie herpès chez le macaque.

Notre travail a consisté en l'analyse statistique des résultats de sérologie herpès obtenus dans le LAM pendant deux ans. Le LAM nous a communiqué pour chaque animal étudié, les résultats des tests de sérologie, l'espèce, le lieu de naissance des animaux, l'origine géographique des géniteurs, le sexe, la date de prélèvement du sérum. Afin de respecter la confidentialité des données médicales et sanitaires aucune autre information ne m'a été communiquée. Certains sérums ont été étudiés par des laboratoires de référence, le Docteur M.B-S nous a alors confié ces résultats. Notre travail statistique nous a permis d'affiner le calcul du seuil de positivité pour ce test chez le macaque et d'en définir la sensibilité et la spécificité.

D'autre part, j'ai pris en charge et réalisé l'analyse par PCR de divers échantillons d'ADN à la recherche du CeHV-1. Les ADN analysés ont été extraits à partir d'échantillons de deux types : prélèvement muqueux sur écouvillons, et matériel d'autopsie (voir matériels et méthodes).

2. Matériels et méthodes

2.1. Origine des sérums testés :

Nous avons étudié les résultats de sérologie herpès obtenus sur 1714 sérums de macaques. Tous ces animaux sont nés en captivité. Toutes espèces confondues les sérums provenaient à 48% de femelles (822/1714) et à 52% de mâles (892/1714).

Parmi les 1714 sérums 10 provenaient de macaques de Tonkean (*Macaca tonkeana*) nés en captivité en France dans une colonie d'animaux vivant en groupe, 199 sérums provenaient de macaques rhésus (*Macaca mulatta*) (dont 192 nés dans des élevages en Chine et dont les géniteurs sont chinois et 7 nés en captivité en France de géniteurs d'origine inconnue) les 1505 autres provenaient de macaques crabiers issus de divers élevages :

- 63 sérums de macaques crabiers nés dans des élevages de Chine et dont les géniteurs sont indochinois (Cambodge, Laos ou Vietnam)
- 239 sérums de macaques crabiers nés dans un élevage de l'île Maurice et dont les géniteurs sont mauriciens ;
- 464 sérums de macaques crabiers nés dans des élevages des Philippines et dont les géniteurs sont philippins ;
- 739 sérums de macaques crabiers nés dans des élevages du Vietnam et dont les géniteurs sont vietnamiens.

2.2. Techniques sérologiques :

2.2.1. Prélèvement et préparation des échantillons de sérum :

Le LAM a reçu des échantillons de sérum prélevés au maximum 48 heures avant la réception ou parfois des échantillons de sérothèque transmis congelés dans de la carboglace. Les sérums sont acheminés et conservés à 4°C jusqu'au moment des tests (au maximum une semaine). Après les tests, les sérums sont conservés à -80°C.

2.2.2. Test ELISA Cobas Core II anti-HSV-1/-2 :

Les tests sérologiques ont été réalisés grâce au kit COBAS CORE Anti-HSV-I/II EIA® qui est un test ELISA humain anti-HSV commercialisé par Roche Diagnostic GmbH (D-68298 Mannheim).

Ce test est un dosage indirect immunoenzymatique réalisé en phase solide sur bille de polystyrène revêtue d'antigènes. Le test est pris en charge par un automate (Cobas core II) qui assure le pipetage des échantillons et toutes les étapes d'incubation et de lavage de la bille sur laquelle se déroule la réaction. Il est ici important de noter que l'échantillon est dilué au 1/46 par l'appareil. Cette dilution sera à prendre en compte lors du titrage des anticorps présents dans les sérums.

Cette trousse est prévue pour le dépistage et la quantification des IgG humaines anti-HSV-1 ou anti-HSV-2. Lors d'une première étape, les échantillons sont incubés avec une bille de polystyrène recouverte d'antigènes HSV-1/2 provenant d'une culture cellulaire (souche MacIntyre et MS cultivées sur cellules VERO). Les quantités d'antigènes de HSV-1 et de HSV-2 adsorbés à la surface de la bille sont approximativement égales. Les anticorps anti-HSV-1/2, contenus dans le sérum à tester, se fixent aux antigènes de HSV-1/2 adsorbés sur la bille. Un lavage de la bille permet d'éliminer la fraction libre. Les anticorps liés à la bille sont ensuite marqués, au cours d'une seconde étape, avec des anticorps (de chèvre) anti-immunoglobulines G humaines couplés à la peroxydase de raifort. Après une seconde étape de lavage, l'enzyme liée réagit avec le substrat COBAS CORE Substrate® (tétraméthylbenzidine 0,8 mmol/l, H₂O₂ 1,5 mmol/l). L'absorbance mesurée par l'automate est, dans ce test, proportionnelle à la concentration en anticorps anti-HSV dans l'échantillon dans une large plage de concentration. Au delà d'une certaine concentration on observe une saturation du test.

Le test ELISA herpès Cobas Core II est un test qualitatif, c'est-à-dire qu'il permet de classer les échantillons en tant que positifs ou négatifs en comparant le résultat à une valeur de seuil de positivité calculée. La valeur de seuil de positivité est calculée à partir d'un contrôle positif et d'un contrôle négatif, ces deux contrôles étant fournis par le fabricant. Les valeurs des résultats supérieures à la valeur seuil de positivité sont considérées comme étant positives et les valeurs inférieures à ce seuil sont considérées comme étant négatives. Le seuil de positivité est calculé par l'automate Cobas Core II grâce à la formule suivante :

$$\text{Seuil} = a \times R_{pc} + b \times R_{nc} + c$$

a = Coefficient du contrôle positif

b = Coefficient du contrôle négatif

c = Offset constante de standardisation

R_{pc} = ratio du contrôle positif (ratio = absorbance obtenue avec le contrôle positif déduite de l'absorbance obtenue avec le blanc)

R_{nc} = ratio du contrôle négatif (ratio = absorbance obtenue avec le contrôle négatif déduite de l'absorbance obtenue avec le blanc)

Les valeurs de a, b et c sont définies par le fabricant pour chaque trousse.

La valeur rendue à l'issue du test ELISA par l'automate Cobas Core II est un pourcentage qui correspond au rapport entre la valeur obtenue avec l'échantillon testé (déduit de l'absorbance obtenue avec le blanc) et la valeur de seuil de positivité. Dans le cadre de la sérologie humaine anti-HSV, le seuil de positivité humain est donc à 100 avec une zone douteuse comprise entre 90 et 100.

Cette trousse a été utilisée par le LAM pour le dépistage des anticorps anti-CeHV-1 de classe IgG dans le sérum des macaques. Dans ce cadre, on met à profit l'antigénicité croisée entre le CeHV-1 et les HSV-1/2. Nous avons déjà vu dans le chapitre 3, page 80 que la communauté antigénique entre le CeHV-1 et les HSV humains permet aux tests ELISA utilisant des antigènes issus des HSV de détecter les anti-CeHV-1 de macaque avec des sensibilités comparable aux ELISA utilisant des antigènes issus du CeHV-1.

2.2.3. Test ELISA « microplaque » anti-HSV-1 :

Un autre test a également été utilisé au LAM : le test Diasorin. Les spécificités du test sont les suivantes :

- test ELISA sur plaque de 96 puits.
- les antigènes qui revêtent la plaque sont issus du virus HSV-1 (souche MacIntyre cultivée sur cellules VERO).
- les anticorps fixés sur les antigènes sont révélés par des anticorps anti-immunoglobuline G humaine de chèvre couplée à la peroxydase de raifort.
- la présence de l'enzyme de l'immunoconjugué est révélée par réaction sur un substrat chromogène : la tétraméthylbenzidine.

Les résultats du test en DO sont normalisés par rapport à la moyenne des densités optiques d'un échantillon de référence testé trois fois. Ce rapport est ensuite multiplié par un coefficient de correction fourni par le fabricant et qui varie d'un lot de trousse à l'autre. On obtient ainsi une valeur nommée « ISR » pour Immune Status Ratio. Pour plus de commodité, j'ai multiplié cet ISR par 100. La valeur seuil définie par le fabricant dans le cadre du dépistage sérologique de l'infection humaine par le HSV correspond à 100.

Ce test sera dénommé dans la suite de cette thèse « test microplaque »

2.2.4. Sérologie anti-CeHV-1 réalisée par un laboratoire de référence :

Le Dr M.B-S nous a transmis pour certains animaux des résultats provenant de laboratoires de référence. Nous n'avons pris en compte que les résultats obtenus sur le même échantillon de sérum que celui testé dans le LAM. Soit au total :

- 59 échantillons de sérum par VetDiagnostics (London, UK),
- 21 échantillons de sérum par VRL (San Antonio, USA),
- 7 échantillons de sérum par BioReliance (Rockville, USA),
- 3 échantillons de sérum par B Virus Resource Laboratory (Atlanta, USA)
- 2 échantillons par le BPRC (Rijswijk, The Netherlands).

Le type de test réalisé par ces laboratoires (les antigènes viraux utilisés, la technique employée et le type de résultat rendu) a été détaillé dans le tableau 5 au début de ce chapitre.

2.2.5. Isoélectrofocalisation

Une séparation par isoélectrofocalisation sur gel d'agarose 1% en présence d'ampholines a été réalisée sur les échantillons suivants :

- un sérum humain normal (témoin positif),
- un sérum de macaque rhésus,
- un pool de sérums issus de 60 macaques crabiers,
- une immunoglobuline monoclonale IgG1 de macaque crabier purifiée à partir du surnageant de culture d'un hybridome macaque-souris,
- une immunoglobuline monoclonale IgG1 de macaque rhésus purifiée à partir du surnageant de culture d'un hybridome macaque-souris,
- un pool de sérums humains contenant des protéines monoclonales de divers pHi.

Les concentrations d'IgG dans les sérums humains et de macaques ont été dosées par immunonéphélométrie (Image, Beckman Coulter) à l'aide de réactifs polyclonaux anti-IgG. Les échantillons ont été dilués en fonction de la concentration en IgG mesurée par immunonéphélométrie.

Après migration, les protéines contenues dans le gel d'agarose ont été transférées sur une feuille de nitrocellulose. Après saturation en présence de protéines de lait de vache, la feuille de nitrocellulose a été incubée dans une solution contenant une dilution appropriée d'un immunoconjugué polyclonal de lapin anti-immunoglobulines G humaines couplé à la phosphatase alcaline (Dako). La fixation de l'immunoconjugué a été révélée par le substrat BCIP/NBT Solution (5-Bromo-4-Chloro-3'-IndolylPhosphate pToluidine, Nitro-Blue Tetrazolium Chloride) (Uptima).

2.3. Analyse statistique des données :

2.3.1. Détermination du seuil de positivité du test chez le macaque :

Dans le cadre du test Cobas Core II nous avons basé toutes nos études statistiques sur les pourcentages calculés par l'automate que nous avons considérés comme résultats (voir plus haut). Ces résultats ont été analysés tels quels ou après transformation en logarithme. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statview® (Abacus Concepts, Inc.) et les représentations graphiques ont été obtenues grâce au logiciel Prism® (GraphPad Software). Pour le test « microplaque », nous nous sommes servis de l'indice ISR calculé comme prescrit par le fournisseur puis multiplié par 100.

2.3.2. Évaluation la sensibilité et de la spécificité du test :

La sensibilité et la spécificité ont été calculées en prenant pour référence les résultats sérologiques obtenus auprès des laboratoires de référence (N=92) utilisant des tests basés sur

des antigènes issus de CeHV-1. Nous avons également pris en compte les résultats obtenus sur les sérums d'animaux de Maurice (N=239). En effet la population insulaire de Maurice étant indemne du CeHV-1, tous les résultats obtenus sur les animaux provenant de cette île sont, de fait, des résultats provenant d'animaux séronégatifs.

La sensibilité (Se) a été calculée suivant la formule classique :

$$Se = [N_{pos \text{ si } R > S}] / [N_{pos}]$$

[N_{pos si R>S}] = nombre de sérums ayant un résultat supérieur au seuil dans le test ELISA HSV parmi les sérums rendus positifs par un laboratoire de référence

[N_{pos}] = nombre total de sérums rendus positifs par un laboratoire de référence

La spécificité (Sp) a été calculée suivant la formule classique :

$$Sp = [N_{neg \text{ si } R < S}] / [N_{neg}]$$

[N_{neg si R<S}] = nombre de sérums ayant un résultat inférieur au seuil dans le test ELISA HSV parmi les sérums rendus négatifs par un laboratoire de référence

[N_{neg}] = nombre total de sérums rendus négatifs par un laboratoire de référence

Dans les deux formules en considérant comme variable la valeur seuil (S) on peut calculer les valeurs Se et Sp en fonction de (S). La représentation des valeurs Se et Sp en fonction de (S) (diagramme de ROC) permet de déterminer la valeur seuil donnant le meilleur compromis entre la sensibilité et la spécificité.

2.3.3. Évaluation des valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) :

Les VPP et VPN sont calculées d'après les formules classiques :

$$\text{Valeur prédictive positive } VPP = \frac{Pr \times Se}{Pr \times Se + (1 - Pr)(1 - Sp)}$$

$$\text{Fréquence des faux négatifs } FN = \frac{Pr \times (1 - Se)}{Pr \times (1 - Se) + (1 - Pr) \times Sp} = \frac{[N_{pos \text{ si } R < S}]}{[N_{tot \text{ si } R < S}]} = 1 - VPN$$

$$\text{Valeur prédictive négative } VPN = \frac{(1 - Pr) \times Sp}{Pr \times (1 - Se) + (1 - Pr) \times Sp}$$

$$\text{Fréquence des faux positifs } FP = \frac{(1 - Pr) \times (1 - Sp)}{Pr \times Se + (1 - Pr)(1 - Sp)} = \frac{[N_{neg \text{ si } R > S}]}{[N_{tot \text{ si } R > S}]} = 1 - VPP$$

Pr = prévalence (calculée à partir des résultats obtenue au près des laboratoires de référence)

A partir du seuil optimal déduit du diagramme de ROC, nous avons fait varier la prévalence de la séropositivité dans les formules permettant de calculer les VPP et VPN.

Pour la prévalence déduite des résultats rendus par les laboratoires de référence, nous avons calculé les VPP et les VPN à diverses valeurs seuil.

2.3.4. *Évaluation de la reproductibilité du test :*

La reproductibilité du test pour une trousse d'un lot donné a été évaluée par calcul de la moyenne et de l'écart type des résultats obtenus en réalisant dix dosages successifs d'un sérum présentant une réactivité proche du seuil de positivité défini pour les sérums de macaques.

La reproductibilité du test entre des trousse de différents lots a été évaluée par calcul de la moyenne et de l'écart type des résultats obtenus en réalisant cinq dosages d'un témoin positif (sérum humain positif pour HSV) sur une période de quatre mois avec deux lots de trousse différents.

2.4. Tests d'inhibition de la réactivité des sérums dans le test Cobas Core II

Les tests d'inhibition ont été réalisés dans le test Cobas Core II. Pour chaque test il a été dilué 25µl de sérum dans 125µl de diluant (fournit par Roche) et 50µl d'une solution d'antigènes viraux. Les sérums ont donc été dilués systématiquement au 1/8. Il a été défini des unités arbitraires pour la concentration en antigènes lors du test avec 1UA correspondant à la dilution au quart de la solution d'antigène fournie par la fabricant. Les antigènes viraux sont des extraits partiellement purifiés de cellules VERO infectées par HSV-1 souche MacIntyre ou HSV-2 souche G (Advanced Biotechnologies Inc). Les concentrations protéiques des extraits antigéniques fournis par le fabricant étaient de 0,54 mg/ml pour HSV-1 et 1,3 mg/ml pour HSV-2.

Il a été utilisé comme contrôle négatif des extraits antigéniques de cellules VERO. Les cellules VERO nous ont été données par le Docteur Catherine MENGELLE (Laboratoire de virologie de l'Hôpital Purpan, Toulouse). Après culture en milieu RPMI et sérum de veau fœtal (10%), les cellules VERO ont été lysées dans un tampon de type RIPA permettant de solubiliser les protéines. Le tampon de lyse RIPA a ensuite été remplacé par une solution de PBS par dialyse grâce à une chambre de dialyse Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 3.5K MWCO (Pierce Biotechnology). La concentration protéique des extraits antigéniques de cellules VERO en solution dans le PBS était de 4,9 mg/ml.

2.5. Autopsie des animaux

Deux macaques crabiers de sexe mâle (macaques A et B) ont été euthanasiés du fait des risques de contamination qu'ils faisaient courir tant aux autres macaques présents dans l'animalerie qu'au personnel animalier. En effet, deux échantillons de sérum de l'animal A ont été trouvés très fortement positifs et un échantillon de sérum de l'animal B a été trouvé douteux puis trois mois plus tard un second échantillon de sérum de ce même animal a donné

un résultat à la limite du seuil de positivité. L'euthanasie des animaux a été réalisée dans le respect total de toutes les règles d'éthique et de bonne pratique vétérinaire. Les animaux ont reçu par voie intramusculaire une forte dose de kétamine. Les animaux ont été exsangüinés par ponction veineuse. Dans l'heure qui a suivi le décès des animaux, les autopsies ont été réalisées à l'ENVT par le Pr. J. Ducos de Lahitte. Au cours de ces autopsies, le personnel présent a été pleinement informé sur les risques inhérents à l'autopsie d'un macaque séropositif et aux précautions particulières à respecter. Les personnes manipulant les animaux ou leurs tissus étaient vêtus de blouses à usage unique, portaient des lunettes de protection, des masques faciaux, des gants en latex et des charlottes. Le matériel d'autopsie (bac en acier inoxydable, bistouri, pinces, etc.) était soit à usage unique, soit décontaminé une nuit à l'eau de javel (1/10). Le matériel à usage unique a été placé après l'autopsie dans les conteneurs réglementaires pour incinération. Après autopsie, les cadavres d'animaux ont été placés dans un conteneur réglementaire et ont été incinérés.

Lors de ces autopsies, il a été recherché tout d'abord la présence de lésions macroscopiques de type herpétique au niveau des muqueuses buccales, oculaires et ano-génitales. Il a été prélevé des échantillons de muqueuse au niveau des joues, des lèvres, de la langue et du prépuce. Après laparotomie et thoracotomie, tous les organes abdominaux et thoraciques ont été examinés. Afin de prélever les ganglions trijumeaux, il a été pratiqué une craniotomie basse, suivie d'une exérèse de l'encéphale et de la tente du cervelet. Dans l'espace sous-tentorial, nous avons pratiqué la dissection des deux ganglions trijumeaux après sections des branches ophtalmiques, maxillaires et mandibulaires ainsi que des racines sensitivomotrices du nerf trijumeau. Afin de prélever les ganglions sacrés, il a été pratiqué une laminectomie permettant l'exérèse de la partie dorsale de l'arc neural des vertèbres sacrées. Nous avons repéré les ganglions des racines postérieures sacrées et les avons prélevés après sections des racines de part et d'autre des ganglions sacrés. Nous tenons à informer ici le lecteur que le prélèvement des ganglions sacrés chez le macaque est un exercice qui nous est apparu difficile à mettre en œuvre. Les photographies réalisées lors ces autopsies sont rassemblées dans l'annexe 8.

Immédiatement après leur prélèvement, les échantillons des différents tissus ont été plongés dans une solution LSN (acétate de lithium 0.3 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, Tris-HCl 10 mmol/l pH 8 et sodium dodecyl sulphate (SDS) 2%) et congelés dans de la carboglace (-80°C).

2.6. Extraction de l'ADN et protocoles de polymerase chain reaction (PCR)

Les travaux d'extraction puis de PCR ont été réalisés dans le Laboratoire Universitaire de Recherche en Immunogénétique Moléculaire (Université Paul Sabatier, Toulouse). Le

transport des échantillons jusqu'au laboratoire a été réalisé sur carboglace puis les échantillons ont été placés jusqu'à utilisation dans un conteneur triple emballage lui-même et conservé dans un congélateur à -80°C. Les échantillons contenus dans le LSN ont subi une fragmentation à l'Ultra-Turrax® (Janke & Kunkel) puis l'ADN a été purifié par une méthode au phénol–chloroforme puis précipité avec de l'éthanol. Après séchage de l'ADN, celui-ci a été repris dans 100µl de tampon TE (EDTA 1 mmol/l, Tris–HCl 10 mmol/l pH 8).

Le Pr. Antoine Blancher nous a transmis des échantillons prélevés par un vétérinaire chez dix macaques de Tonkean (macaques C à L : dix écouvillons buccaux et dix écouvillons vaginaux) et quatorze macaques crabiers (macaques M à V: dix écouvillons buccaux et dix écouvillons vaginaux prélevés chez des macaques crabiers d'origine mauricienne et W à Z : trois écouvillons buccaux et un écouvillon rectal prélevés chez des macaques crabiers originaires des Philippines). Ces échantillons étaient des prélèvements réalisés avec des écouvillons stériles en coton au niveau des muqueuses buccales ou ano-génitales des animaux. L'ADN a été extrait de ces écouvillons en utilisant le kit d'extraction QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen) en respectant le protocole indiqué par le fabricant pour extraire l'ADN à partir d'écouvillons en coton.

2.6.1. La PCR conventionnelle prenant pour cible la glycoprotéine G du CeHV-1 et nommée « gGS4 »

Des réactions de PCR ont été réalisées sur les extraits d'ADN obtenus à partir des échantillons prélevés lors des autopsies et à partir des écouvillons. La réaction de PCR a été décrite par Hirano en 2000 : les amorces de PCR utilisés sont gGS4 (direct, 5'-CCGCGTACGACTACGAGATCC-3') et gGAS4 (indirect, 5'-GTTCGCGGCCACGATCCA-3') ; le mélange réactionnel contenait 2,5 unités de HotStar Taq DNA Polymerase (Quiagen), 1µmol/l de chaque primer (Proligo) et 1,5 mol/l de bêtaïne (Sigma). La réaction a été exécutée avec un cycle à 95°C pour 15 minutes, 55°C pour 30 secondes, et 72°C pour 2 minutes, suivi de 39 cycles à 95°C pour 15 secondes, 55°C pour 30 secondes, et 72°C pour 2 minutes, enfin une étape finale d'élongation de 7 minutes à 72°C. Le produit de PCR a ensuite été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

2.6.2. La PCR nichée prenant pour cible la glycoprotéine C du CeHV-1 et nommée « gC »

Des réactions de PCR ont été réalisées sur les extraits d'ADN obtenus à partir des échantillons prélevés lors des autopsies. La réaction de PCR a été décrite par Coulibaly en 2004 : une première réaction de PCR est réalisée grâce aux amorces gC_1352_F (direct, 5'-CGAGATGGAGTTCGGGAGCGGCGA-3') et gC_1648_R (indirect, 5'-GGTCACCTGCTG

GCCCACGGGGTC-3') ; le mélange réactionnel contenait 2,5 unités de HotStar Taq DNA Polymerase (Quiagen), 1 µmol/l de chaque primer (Proligo) et 1 mol/l de bétaïne (Sigma). La réaction a été exécutée avec un cycle à 95°C pour 15 minutes, 60°C pour 30 secondes, et 72°C pour 40 secondes, suivi de 39 cycles à 95°C pour 15 secondes, 60°C pour 30 secondes, et 72°C pour 40 secondes, enfin une étape finale d'élongation de 7 minutes à 72°C. Puis une seconde PCR nichée est réalisée grâce aux amorces gC_1410_F (direct, 5'-GTGGAGCTGCAGTGGCTGCT-3') et gC_1558_R (indirect, 5'-AGCCGGCAGGTGTACTCGCT-3'). La réaction a été exécutée avec un cycle identique au premier passage de PCR, excepté la température d'alignement de 56°C. Le produit de PCR a ensuite été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

2.6.3. Les PCR conventionnelles prenant pour cible la polymérase du CeHV-1 et nommée « Herpès-Polymerase »

Des réactions de PCR ont été réalisées sur l'extrait d'ADN issu du ganglion trijumeau du macaque A prélevé lors de son autopsie. La réaction de PCR a été décrite par Miranda en 2005, les amorces de PCR utilisées et les couples employés sont décrits dans le tableau 6 ; le mélange réactionnel contenait 2,5 unités de HotStar Taq DNA Polymerase (Quiagen), 1 µmol/l de chaque primer (Proligo) et 1,5 mol/l de bétaïne (Sigma). La réaction a été exécutée avec un cycle à 95°C pour 15 minutes, 65°C pour 30 secondes, et 72°C pour 2 minutes, suivi de 39 cycles à 95°C pour 15 secondes, 65°C pour 30 secondes, et 72°C pour 2 minutes, enfin une étape finale d'élongation de 7 minutes à 72°C. Le produit de PCR a ensuite été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Tableau 6 : Séquences et couples d'amorces employés pour les PCR « Herpès-Polymerase »

Amorces directes	
HVBdiag03	5'-GCCCCCAAGCGACCCACGG-3'
HVBdiag04	5'-GGCCGGCAGGCCGGCGAGCC-3'
HVBdiag07	5'-ATCAAGGACCGGATCCCGTACGT-3'
HVBdiag10	5'-GCGAGTGCATGAGTTTCGCTTCG-3'
HVBdiag12	5'-GCGATGAGTTTCGCTTCGTCGC-3'
Amorces indirectes	
HVBdiag01R	5'-CCGGTCGGGGACGGGCGGTCC-3'
HVBdiag05R	5'-CGCGGAGGCGGATCGCCGTC-3'
HVBdiag08R	5'-GGCGTCTTGCCAAAGTCCAGG-3'
HVBdiag10R	5'-GGCCCAGGAGCGTAATGACGG-3'
HVBdiag12R	5'-CCAGAAGGCGTCTTGCCAAAGTCC-3'

Amorces directes	Amorces indirectes	Taille du fragment amplifié (paires de bases)
HVBdiag03	HVBdiag05R	270
HVBdiag04	HVBdiag05R	252
HVBdiag07	HVBdiag01R	168
HVBdiag10	HVBdiag10R	356
HVBdiag10	HVBdiag12R	163
HVBdiag12	HVBdiag08R	151

2.6.4. La PCR quantitative prenant pour cible la glycoprotéine G du CeHV-1 et nommée « gG »

Des réactions de PCR quantitative ont été réalisées sur les extraits d'ADN obtenus à partir des échantillons prélevés lors des autopsies et à partir des écouvillons. Cette réaction de PCR quantitative, amplifiant un fragment de 124 paires de bases contenu dans la séquence codante de la glycoprotéine G, a été décrite par Perelygina en 2003. Les amorces de PCR sont gGBV-323F (direct, 5'-TGGCCTACTACCGCGTGG-3') et gGBV-446R (indirect, 5'-TGGTACGTGTGGGAGTAGCG-3') et la sonde est gGBV-403T (5'-CCGCCCTCTCCGAGCACGTG-3') marquée en 5' par le fluorochrome FAM et en 3' par le fluorochrome TAMRA.

Chaque échantillon a été testé en triplicates.

2.6.5. La PCR quantitative prenant pour cible la glycoprotéine B du CeHV-1 et nommée « gB »

Des réactions de PCR quantitative ont été réalisées sur les extraits d'ADN obtenus à partir des échantillons prélevés lors des autopsies et à partir des écouvillons. Cette réaction de PCR quantitative, amplifiant un fragment de 80 paires de bases contenu dans la séquence codante de la glycoprotéine B, a été décrite par Huff en 2003. Les amorces de PCR sont RhBVgB_F (direct, 5'-GGTGATCGACAAGATCAACGC-3') et RhBVgB_R (indirect, 5'-GCCGTGCTCTCCATGTTGTT-3') et la sonde est RhBVgB_P (5'-TCTGCCGCTCGACGGCAAAGTAC-3') marquée en 5' par le fluorochrome FAM et en 3' par le fluorochrome TAMRA.

Chaque échantillon a été testé en triplicates.

Une courbe de calibration a été construite à partir des résultats obtenus avec une gamme de dilution géométrique de raison 10 d'une solution standard d'un plasmide dans lequel a été inséré le fragment d'ADN amplifié par la PCR quantitative. Ce plasmide nous été donné par M. Friedrich Raulf (Novartis, Bâle).

Les résultats de PCR quantitative sont exprimés en équivalent du nombre de copies. Ces nombres de copies ont été calculés à partir de la courbe de calibration.

3. Résultats

3.1. Reproductibilité du test sérologique Cobas Core II

3.1.1. *Reproductibilité intra-essais*

La reproductibilité du test a été estimée en utilisant un sérum donnant des valeurs proches du seuil que nous avons déterminé pour les sérums de macaque (voir plus loin pour le calcul de ce seuil).

Pour la reproductibilité avec une trousse d'un lot donné, le sérum témoin a été analysé dix fois dans le kit Cobas Core II. La moyenne des résultats obtenus pour ce sérum était de 7,3 pour un écart-type de 0,32 (soit 4,4% de la valeur moyenne). Aux environs du seuil de positivité, l'intervalle de confiance à 95% est donc $\pm 0,6$. Concrètement pour un seuil fixé à 6,7 on considérera comme inférieur au seuil tout résultat inférieur à 6,1 et supérieur au seuil tout résultat supérieur à 7,3.

Pour les résultats compris entre 6,1 et 7,3 on peut réaliser des tests supplémentaires. Dans ces conditions on appliquera la formule suivante pour calculer l'intervalle de confiance d'un résultat x testé n fois avec pour moyenne \bar{x} et l'écart type EC (0,32),

$$\bar{x} - \frac{2 \times EC}{\sqrt{n}} \leq x \leq \bar{x} + \frac{2 \times EC}{\sqrt{n}}$$

Dans la pratique réelle, la multiplication des tests pour des valeurs situées dans la zone d'incertitude (seuil $\pm 0,6$) est souvent peu informative. Pour cette raison nous conseillons de renouveler les tests sur un deuxième échantillon prélevé à deux semaines d'intervalle. Le mieux est alors de comparer les résultats obtenus sur le premier sérum (conservé à -80°C) et le deuxième.

3.1.2. *Reproductibilité inter-essais*

La reproductibilité du test inter-lot a été évaluée en réalisant cinq dosages d'un témoin positif (sérum humain positif pour HSV) sur une période de quatre mois avec deux lots de trousse différents. La moyenne des résultats obtenus pour ce sérum était de 293,7 pour un écart-type de 25,5 (soit 8,7% de la valeur moyenne).

La reproductibilité intra-lot et inter-lot du test Cobas Core II est donc excellente ce qui permet de prendre en compte les résultats de manipulations indépendantes pour le calcul du seuil de positivité et d'utiliser ce dernier en prospectif.

3.2. La réactivité croisée des anti-immunoglobulines G humaines avec les immunoglobulines G de macaque

Nous avons comparé l'analyse par isoélectrofocalisation des échantillons humains et simiens afin de visualiser la réactivité croisée des anti-immunoglobulines G humaines avec les immunoglobulines G de macaque. Nous avons obtenu l'image suivante (figure 6) :

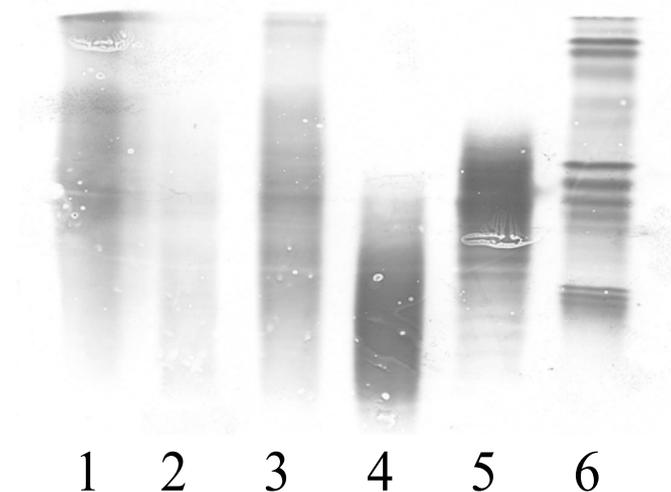


Figure 6 : image de l'analyse par isoélectrofocalisation d'échantillons humains et simiens.
1 = sérum humain, 2 = sérum de macaque rhésus (11,7 g/l*), 3 = pool de sérums de 60 macaques mauriciens (9,4 g/l*), 4 = immunoglobuline monoclonale IgG1 de macaque crabier, 5 = immunoglobuline monoclonale IgG1 de macaque rhésus et 6 = pool de sérums humains contenant des protéines monoclonales de divers pHi.

On peut observer une réactivité des anti-immunoglobulines G humaines, que nous avons employées, vis-à-vis des immunoglobulines de macaque crabier (bandes 3 et 4 sur la figure 6) comparable avec celle observée vis-à-vis des immunoglobulines humaines (bandes 1 et 6 sur la figure 6). On observe une intensité plus faible de la bande 2 sur la figure 6, ce qui pourrait indiquer que la réactivité des anti-immunoglobulines G humaines, que nous avons employées, vis-à-vis des immunoglobulines de macaque rhésus est plus faible que celle observée vis-à-vis des immunoglobulines humaines. Or la bande 5 sur la figure 6 présente une très forte intensité, cela démontre donc que les anti-immunoglobulines G humaines que nous avons employées reconnaissent fortement les immunoglobulines G1 de macaque rhésus. Le résultat obtenu avec le sérum de macaque rhésus pourrait donc être dû à une trop forte dilution du sérum.

Nous avons également réalisé la même expérience mais cette fois en employant l'immunoconjugué fourni par Roche dans la trousse Cobas Core II. Cet immunoconjugué prêt à l'emploi pour un test ELISA est très dilué (en comparaison avec les dilutions employées pour le Western Blot). Nous avons obtenu le même résultat, en particulier pour les immunoglobulines monoclonales de macaque rhésus et crabier, qu'avec l'immunoconjugué précédent mais avec une très faible intensité des bandes (image non montrée). Cela tend donc

à indiquer que cet immunoconjugué présente une bonne réactivité vis-à-vis des immunoglobulines G de macaque.

3.3. Analyse statistique des résultats de sérologie obtenus avec le test ELISA Cobas Core II.

Nous avons analysé 1728 résultats de sérologie herpès obtenus avec le test Cobas Core II sur des sérums de macaques. La distribution en fréquence de ces valeurs (figure 7A) ne suit pas la loi normale. Au contraire, la distribution en fréquence des logarithmes de base 10 de ces valeurs suit une loi normale si on exclut les valeurs extrêmes (figure 7B).

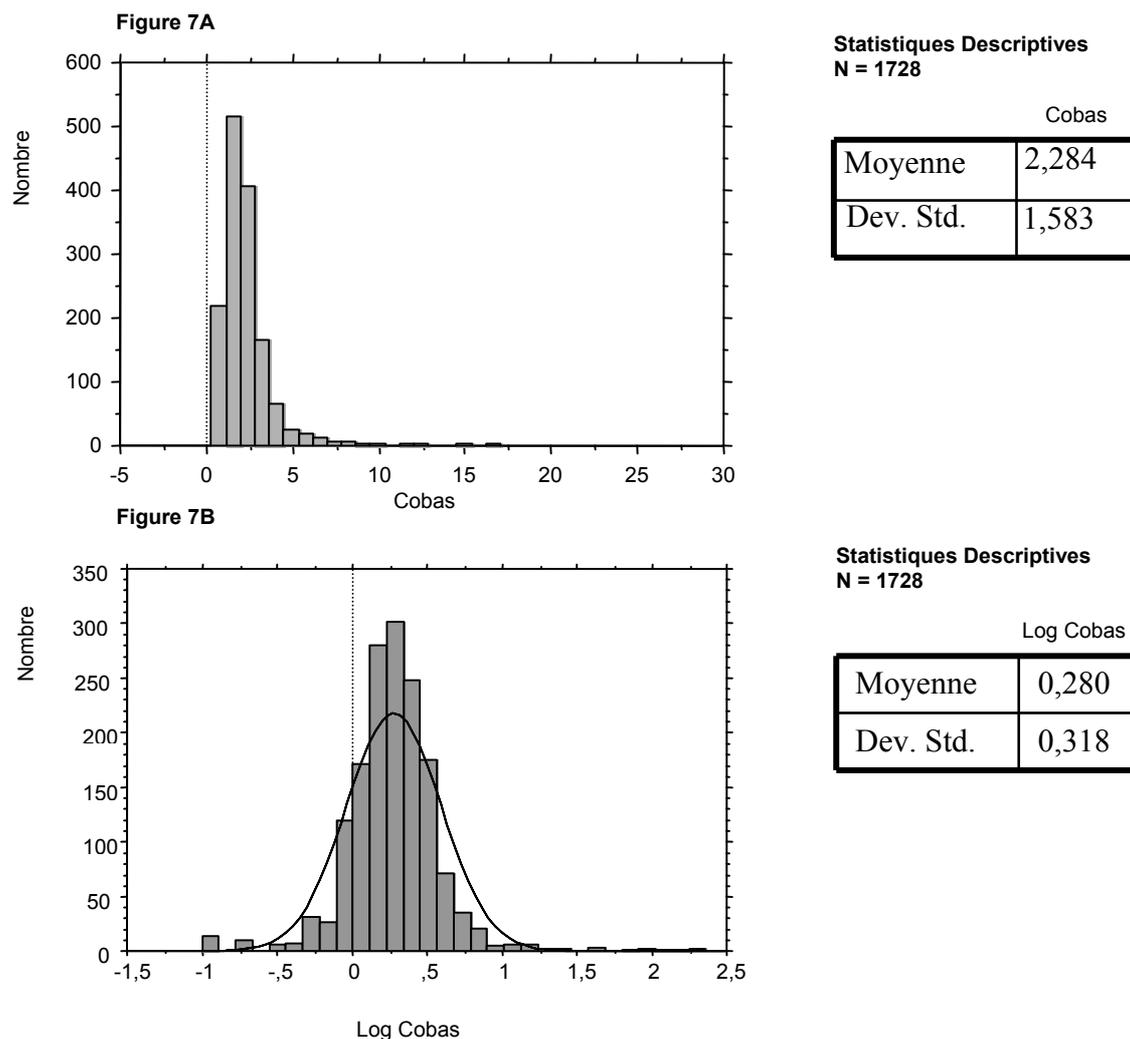


Figure 7 : Distribution en fréquence des résultats obtenus sur les sérums de macaques avec le test ELISA Cobas Core II (a. résultat en valeurs naturelles, b. logarithme des résultats). Les statistiques descriptives sont reportées dans les tableaux ci-dessus.

L'exclusion des valeurs extrêmes permet d'obtenir une distribution de valeurs suivant une loi normale (figure 8a). La normalité de la distribution de ces valeurs a été vérifiée graphiquement par construction d'une droite de Henry en comparaison à une distribution suivant une loi normale d'espérance 0,285 et d'écart type 0,244 (voir figure 8b). Le coefficient de corrélation de la droite de Henry ainsi obtenue est de 0,995 ce qui indique que

logarithmes des résultats obtenus sur les sérums de macaques avec le test ELISA Cobas Core II suivent une distribution quasi-gaussienne (aux effets de bords près). Les animaux testés sont dans la grande majorité des animaux nouvellement importés et sont donc théoriquement sérologiquement négatifs, il a donc été émis l'hypothèse que la répartition des valeurs observée dans la figure 8a correspond à la répartition naturelle des valeurs obtenues chez les animaux séronégatifs. C'est donc à partir de la distribution des résultats des sérums négatifs que nous avons défini la zone douteuse et le seuil de positivité pour le test.

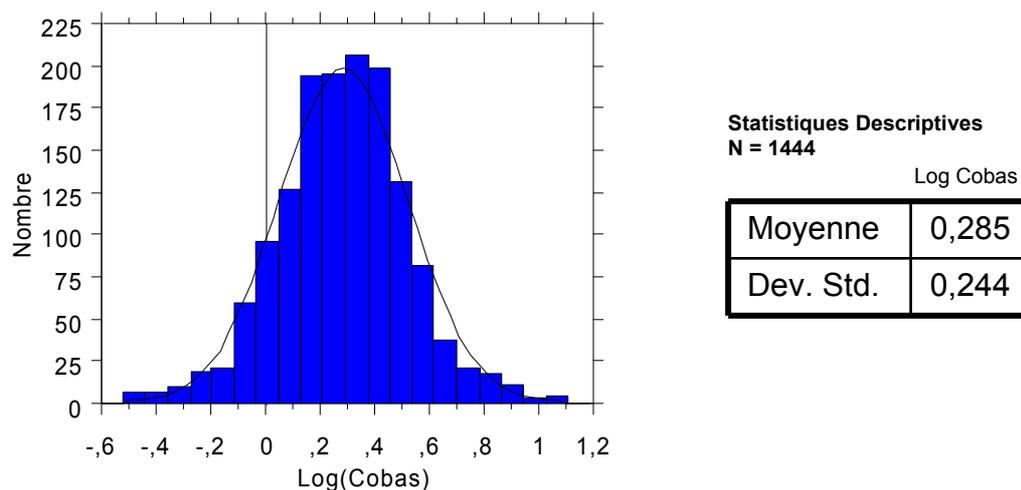


Figure 8a : Distribution des fréquences des logarithmes des résultats ELISA Cobas Core II obtenus avec des animaux séronégatifs.

Dans cette figure, sont pris en compte les résultats inférieurs au seuil de 1,12 en donnée logarithmique (soit 12,9 en valeur naturelle). Les statistiques descriptives des résultats obtenus pour les sérums de macaque sont reportées dans le tableau ci-dessous.

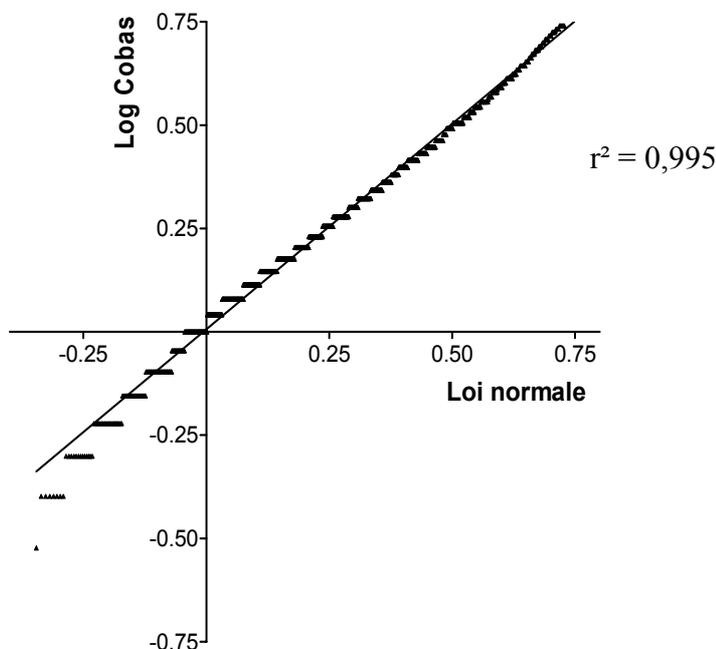


Figure 8b : Droite de Henry. Comparaison entre une distribution suivant une loi normale d'espérance 0,285 et d'écart type 0,244 et des logarithmes des résultats obtenus sur les sérums de macaques avec le test ELISA Cobas Core II

En nous basant sur les valeurs qui suivent une distribution log-normale, nous avons effectué l'analyse statistique des logarithmes des résultats sérologiques. On obtient ainsi une moyenne de 0,285 et un écart-type de 0,244 pour les logarithmes. Dans un second temps nous avons utilisé ces résultats pour définir des valeurs de seuil de positivité en fonction de la moyenne (m) et de l'écart type (ET). Sont définis positifs les valeurs en logarithme situées au-delà de $m+3ET$. Les résultats compris entre $m+2ET$ et $m+3ET$ sont considérés comme douteux. Les valeurs au-dessous de $m+2ET$ sont considérées comme négatives.

On obtient ainsi une zone douteuse comprise entre 0,773 et 1,017 soit respectivement 5,9 et 10,4 en valeurs naturelles. Le seuil de positivité obtenu est de 1,017 soit 10,4 en valeurs naturelles.

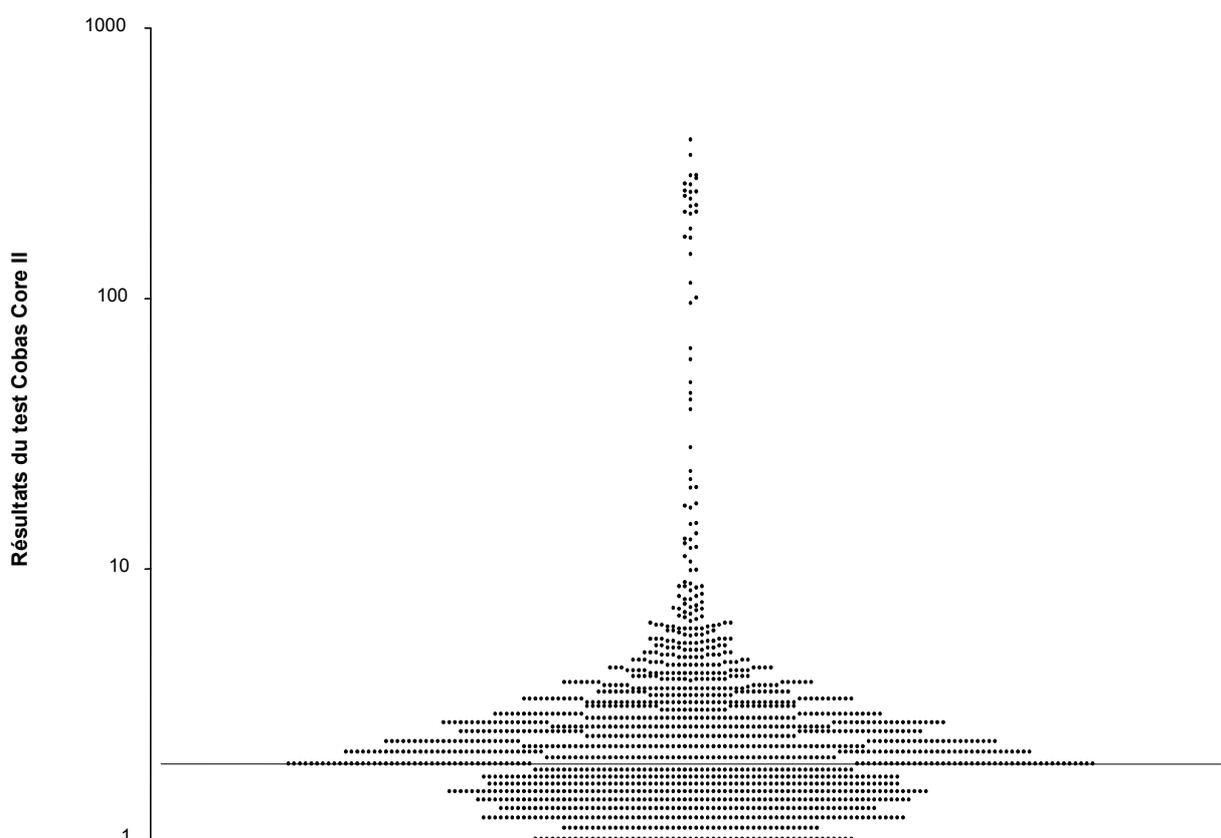


Figure 9: Résultats obtenus pour 1728 sérums de macaque avec le test ELISA Cobas Core II. Les résultats sont indiqués en pourcentages. L'échelle des ordonnées est de type logarithmique pour plus de lisibilité de la figure.

L'analyse séparée des différentes populations de macaque en fonction de leur origine géographique de naissance on peut observer des différences significatives entre ces populations (figure 10 et tableau A). Alors qu'il n'y a pas de différence significative entre les macaques originaires de l'île Maurice et ceux originaires des Philippines, ceux originaires du Vietnam et de Chine présentent des moyennes significativement plus élevées que les animaux des Philippines ou de l'île Maurice. Bien que les différences observées soient significatives, elles sont faibles si bien que nous n'avons pas jugé nécessaire de définir des seuils de positivité spécifique de chaque population de macaque.

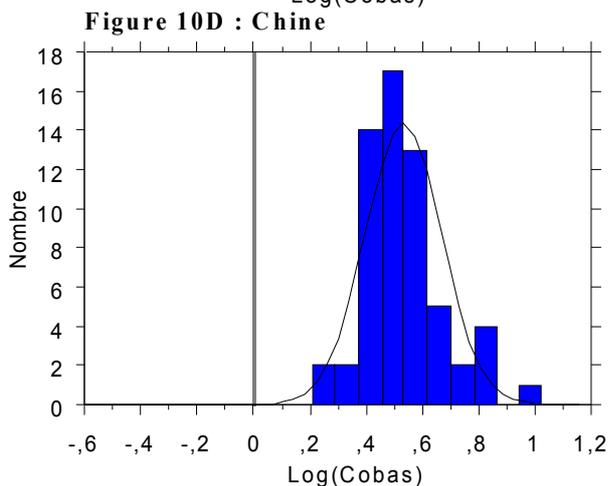
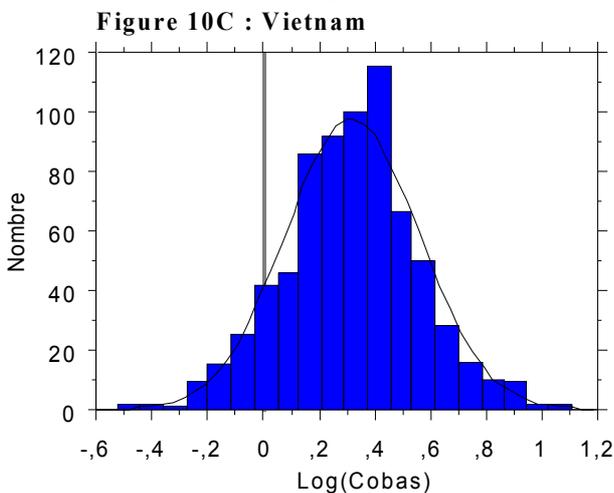
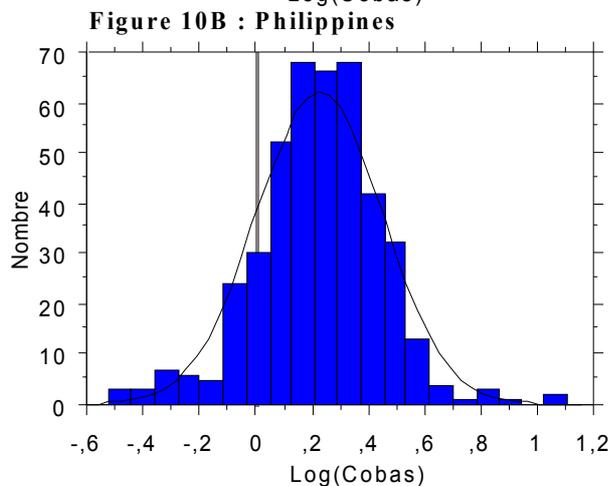
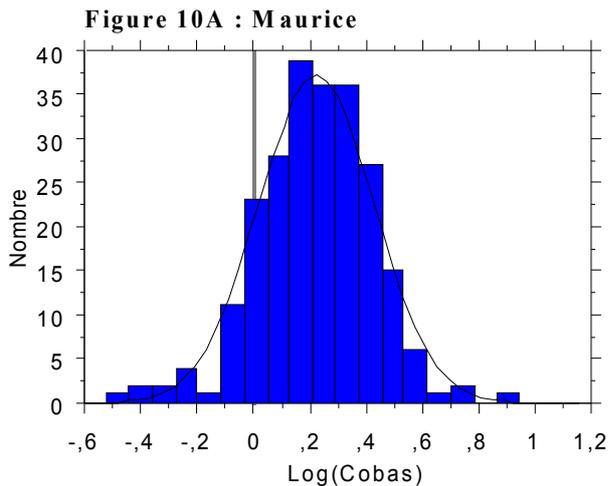


Tableau A : Test de Student

	Log Cobas	
	Δ Moyenne	P
Chine, Maurice	0,340	<0,0001
Chine, Vietnam	0,245	<0,0001
Chine, Philippines	0,333	<0,0001
Maurice, Vietnam	-0,095	<0,0001
Maurice, Philippines	-0,007	0,7004
Vietnam, Philippines	0,088	<0,0001

Statistiques descriptives	Moy	E T	Nb
Fascicularis, Maurice	0,223	0,207	235
Fascicularis, Philippines	0,230	0,234	430
Fascicularis, Vietnam	0,319	0,240	719
Fascicularis, Chine	0,564	0,194	60

Figure 10 : Distribution pour différentes populations des fréquences des logarithmes des résultats ELISA Cobas Core II obtenus avec des macaques fascicularis séronégatifs.

Dans cette figure, sont pris en compte les résultats inférieurs au seuil de 1,12 en donnée logarithmique (soit 12,9 en valeur naturelle). Ce seuil est calculé sur l'ensemble des résultats obtenus (soit toutes populations confondues). Les résultats présentés ont été obtenus sur des sérums de macaques fascicularis prélevés lors de leur quarantaine en France. Nous avons aussi inclus pour 271 animaux le contrôle sérologique pratiqué plusieurs mois après leur quarantaine. L'analyse par le test de Student des différences entre les résultats obtenus sur les sérums de macaques issus de différentes populations est rapportée dans le tableau A.

Figure 11A : Maurice, Fascicularis

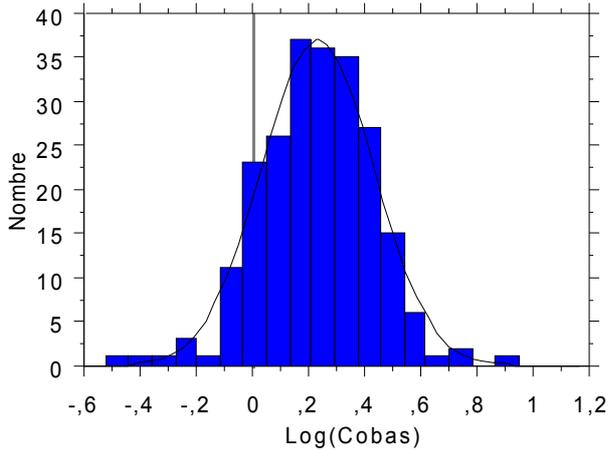


Figure 11B : Philippines, Fascicularis

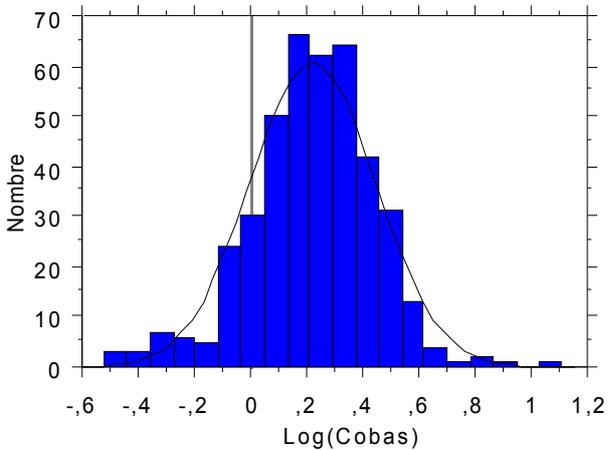


Figure 11C : Vietnam, Fascicularis

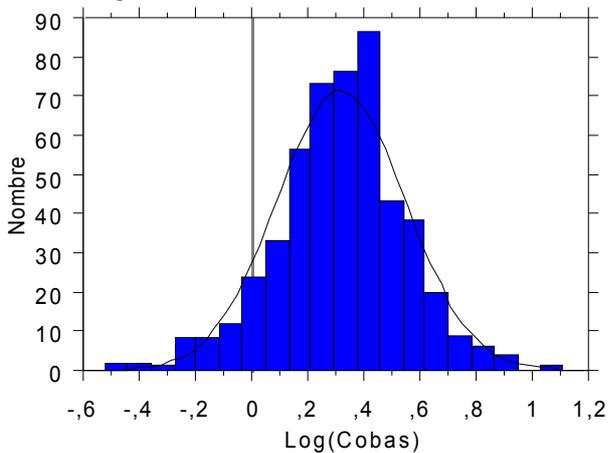


Figure 11D : Chine, Fascicularis

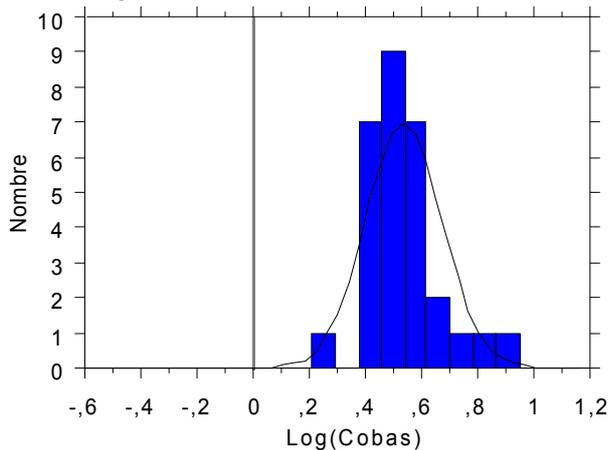


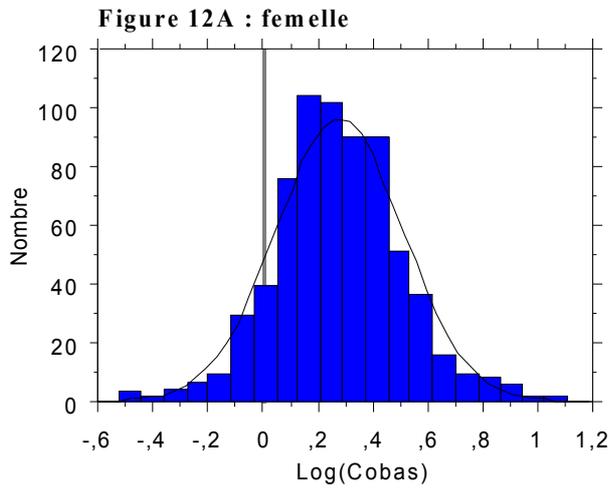
Tableau B : Test de Student

	Δ Moyenne	P
Chine, Maurice	,222	<,0001
Chine, Philippines	,231	<,0001
Chine, Vietnam	,136	<,0001
Maurice, Philippines	,010	,5789
Maurice, Vietnam	-,086	<,0001
Philippines, Vietnam	-,096	<,0001

Statistiques descriptives	Moy	E T	Nb
Total	0,289	0,243	1173
Fascicularis, Maurice	0,232	0,200	227
Fascicularis, Philippines	0,222	0,223	415
Fascicularis, Vietnam	0,317	0,229	502
Fascicularis, Chine	0,576	0,205	29

Figure 11 : Distribution pour différentes populations des fréquences des logarithmes des résultats ELISA Cobas Core II obtenus avec des macaques fascicularis séronégatifs nouvellement importés.

Dans cette figure, sont pris en compte les résultats inférieurs au seuil de 1,12 en donnée logarithmique (soit 12,9 en valeur naturelle). Ce seuil est calculé sur l'ensemble des résultats obtenus (soit toutes populations confondues). Les résultats présentés ont été obtenus sur des sérums de macaques fascicularis prélevés lors de leur quarantaine en France. L'analyse par le test de Student des différences entre les résultats obtenus sur les sérums de macaques issus de différentes populations est rapportée dans le tableau B.



Statistiques Descriptives

		Log Cobas	
		Moy	E T
Femelles	N= 686	0,279	0,23
Mâles	N= 758	0,295	0,24

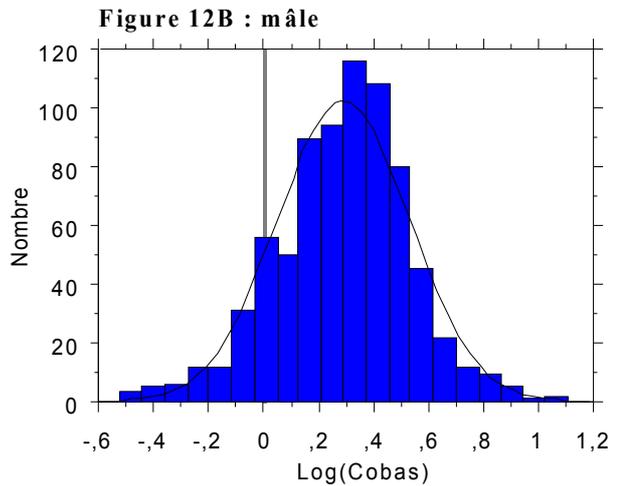
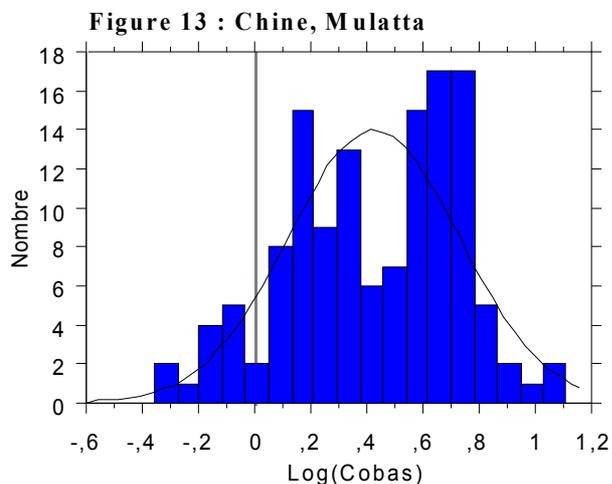


Tableau C : Test de Student

Log Cobas		
	Δ	P
Femelles, Mâles	-0,016	0,226

Figure 12 : Distribution pour les deux sexes des fréquences des logarithmes des résultats ELISA Cobas Core II obtenus avec des macaques fascicularis séronégatifs.

Les statistiques descriptives des résultats obtenus pour les sérums de macaques fascicularis séronégatifs des deux sexes sont reportées dans le tableau ci-dessous. Un test de Student a été réalisé afin de déterminer s'il existe des différences significatives entre les résultats obtenus sur les sérums de macaque mâles et femelles. Les résultats de ce test statistique ont été rapportés dans le tableau C.



Statistiques descriptives	Moy	E T	Nb
Mulatta, Chine	0,424	0,306	131

Figure 13 : Distribution des fréquences des logarithmes des résultats ELISA Cobas Core II obtenus avec des macaques rhésus séronégatifs.

Les statistiques descriptives des résultats obtenus pour les sérums de macaques rhésus séronégatifs sont reportées dans le tableau ci-dessous.

Dans la figure 10, se trouvent les résultats obtenus sur des sérums de macaques prélevés au moment de leur quarantaine en France mais également dans certains cas (pour 271 sérums) plusieurs mois après leur arrivée. Afin de vérifier si le fait que les animaux séjournent en France pendant un certain temps peut influencer les résultats sérologiques, il a été représenté

dans la figure 11 les résultats obtenus sur des sérums de macaques prélevés lors de leur quarantaine à leur arrivée en France. Il apparaît les résultats varient très peu par rapport à ceux de la figure 10. D'autre part il apparaît que les macaques rhésus séronégatifs présentent des résultats certes plus dispersés, mais d'un ordre de grandeur proche des macaques crabiers (figure 13).

On note qu'on n'observe aucune différence entre les macaques mâles et les macaques femelles (figure 12 et tableau C).

3.4. Comparaison des résultats obtenus avec ceux des laboratoires de référence

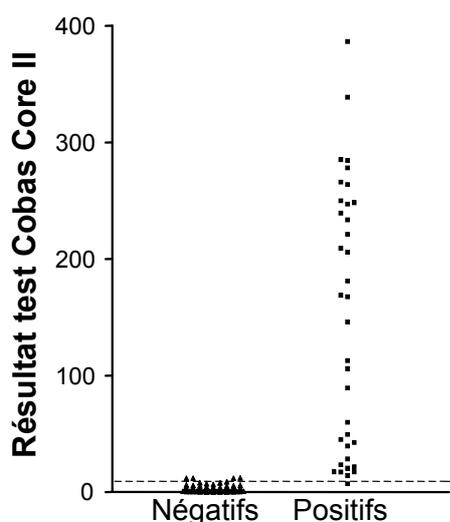


Figure 14 : Répartition des résultats obtenus avec le test Cobas Core II sur des sérums de macaques de statut sérologique connu

(voir Matériels et Méthodes). Les sérums de macaque ont été séparés en positifs et négatifs. Le trait pointillé représente le seuil de positivité de 10,4 défini précédemment.

On peut observer que sur les 39 sérums donnés positifs par les laboratoires de référence, 38 donnent un résultat avec le test Cobas Core II supérieur au seuil de positivité (10,4). Le sérum donné positif par les laboratoires de référence et donnant un résultat inférieur à ce seuil de positivité est en réalité rendu comme douteux par le test Cobas Core II. On observe également que sur les 289 sérums définis comme négatifs (voir Matériels et Méthodes), 285 donnent un résultat inférieur au seuil de positivité du test Cobas Core II.

3.5. Sensibilité et spécificité du test en fonction du seuil

La sensibilité et la spécificité du test ont été calculées comme décrit dans « Matériels et Méthodes ». Pour ces calculs, il a été pris comme référence les résultats sérologiques rendus par les laboratoires experts et en compte les résultats obtenus sur les sérums d'animaux de Maurice, considérés comme des résultats provenant d'animaux séronégatifs. La figure 15 montre l'évolution de la sensibilité et de la spécificité en fonction de la valeur du seuil. La sensibilité du test est de 100% jusqu'à une valeur du seuil de 6,7 et la spécificité du test est alors de 97,2%. On observe que l'optimum entre la sensibilité et la spécificité est atteint pour les valeurs du seuil comprises entre 12,2 et 12,9. La sensibilité est alors de 97,4% et la

spécificité de 100%. Il est important de remarquer ici que le seuil optimal pour la détection des anticorps anti-CeHV-1 (soit 12,9) dans les sérums de macaques est très différent du seuil de détection des anticorps anti-HSV dans les sérums humains (soit 100). D'où l'importance de la validation d'un test lorsque celui-ci n'est pas utilisé dans les conditions exactes définies par son fabricant.

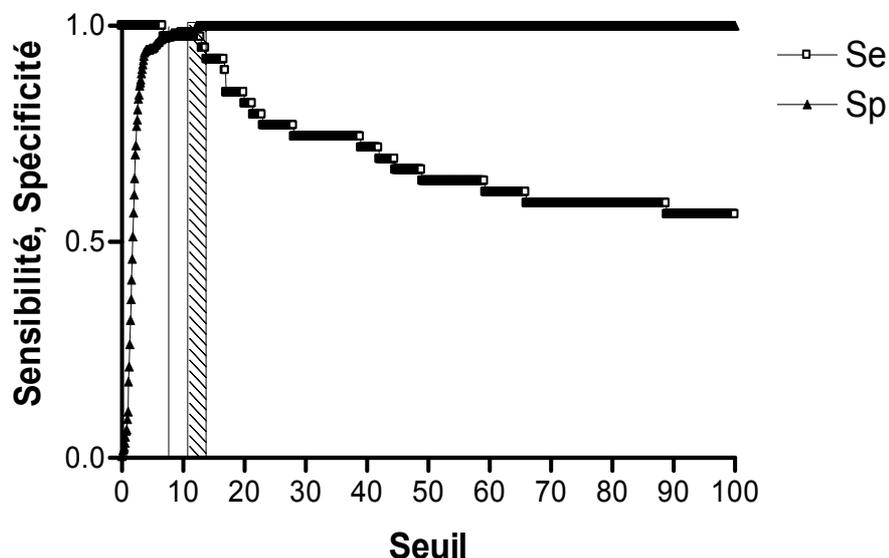


Figure 15 : Diagrammes de ROC du test ELISA Cobas Core II

Les valeurs de la sensibilité et de la spécificité du test Cobas Core II sont représentées simultanément pour toutes les valeurs possibles du seuil de positivité entre 0 et 100 en prenant pour référence le statut sérologique des animaux défini comme indiqué dans « Matériels et Méthodes ». La plage d'optimum entre la sensibilité et la spécificité est représentée par la zone hachurée et la limite de sensibilité maximale (100%) par la droite verticale.

Aux vues des résultats obtenus avec les diagrammes de ROC, il a été décidé de redéfinir les seuils de positivité et de zone douteuse pour le test Cobas Core II dans le cadre de la sérologie CeHV-1 chez le macaque. On obtient ainsi une zone douteuse comprise entre 6,7 et 12,8 et un seuil de positivité à 12,9.

3.6. Valeurs prédictives du test du test Cobas Core II

Les valeurs prédictives du test ont été calculées comme décrit dans « Matériels et Méthodes ». La prévalence des animaux séropositifs est de 10% chez les animaux pour lesquels nous avons obtenu les résultats des laboratoires de référence (la prévalence pour l'ensemble des animaux étudiés est beaucoup plus faible, soit 2,3%).

Les différentes valeurs prédictives ont été calculées pour les deux seuils que nous venons de définir, à savoir 6,7 pour le seuil des douteux et 12,9 pour le seuil des positifs.

La valeur prédictive positive est la probabilité qu'un animal présentant un résultat supérieur au seuil dans le test Cobas Core II soit donné positif dans les laboratoires de référence, c'est-à-dire en fait les résultats « vrai positifs ». Cette valeur prédictive positive est de 83% pour un seuil à 6,7 et de 100% pour un seuil de 12,9.

La valeur prédictive négative est la probabilité qu'un animal présentant un résultat inférieur au seuil dans le test Cobas Core II soit donné négatif dans les laboratoires de référence, c'est-à-dire en fait les résultats « vrai négatifs ». Cette valeur prédictive négative est de 100% pour un seuil à 6,7 et de 99,7% pour un seuil de 12,9.

Pour un seuil fixé à 6,7, la probabilité d'avoir un résultat faux négatif est de 0% et la probabilité d'avoir un résultat faux positif est de 17%. Pour un seuil fixé à 12,9, la probabilité d'avoir un résultat faux négatif est de 0,3% et la probabilité (pour une séroprévalence de 10%) d'avoir un résultat faux positif est de 0%.

3.7. Analyse du test « microplaque »:

L'analyse statistique des résultats de ce test a été réalisée suivant une méthode identique à celle employée pour le test Cobas Core II.

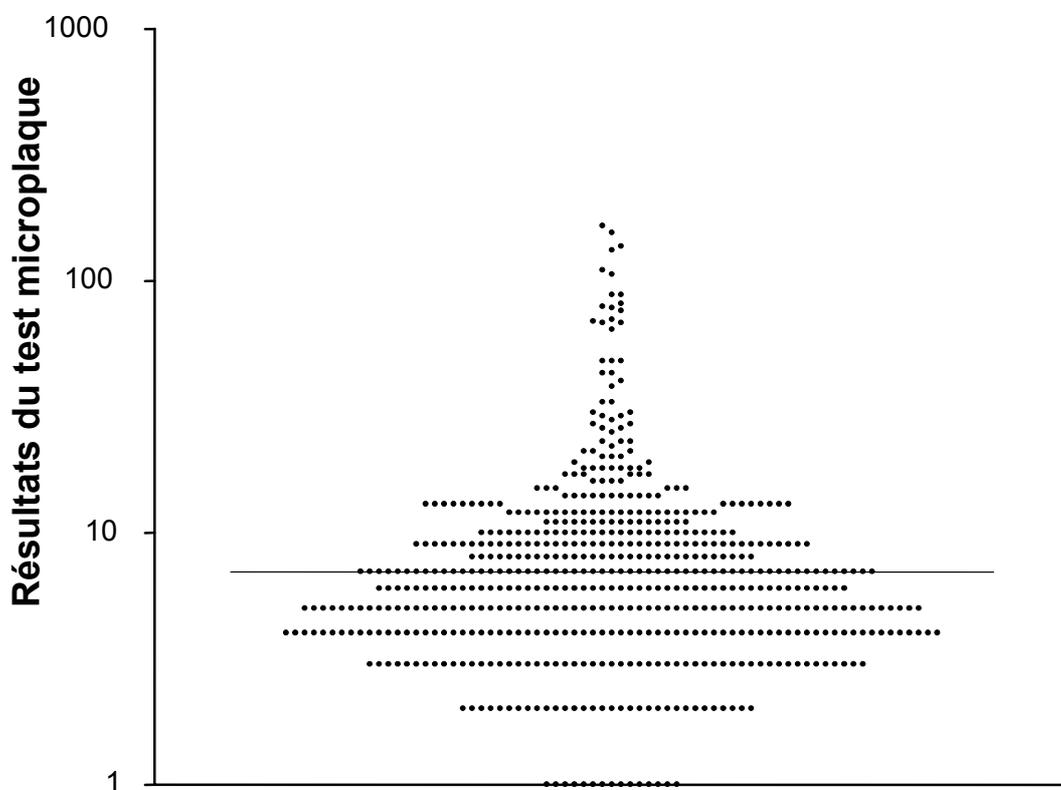


Figure 16: Résultats obtenus pour 588 sérums de macaque avec le test ELISA « microplaque ». Les résultats sont indiqués en $ISR \times 100$. L'échelle des ordonnées est de type logarithmique pour plus de lisibilité de la figure.

De la même manière que pour le test ELISA Cobas Core II, sont définis positifs les valeurs en logarithme situées au-delà de $m+3ET$. Les résultats compris entre $m+2ET$ et $m+3ET$ sont considérés comme douteux. Les valeurs au-dessous de $m+2ET$ sont considérées comme négatives. Il a ainsi été déterminé un seuil de positivité de 39 et une zone douteuse pour les valeurs comprises entre 21,1 et 39.

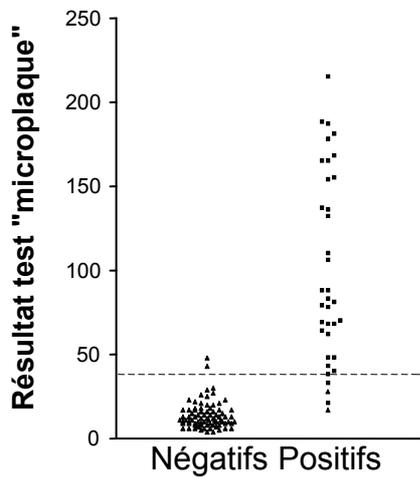


Figure 17: Répartition des résultats obtenus avec le test « microplaque » sur des sérums de macaques de statut sérologique connu (voir Matériels et Méthodes).
 Les sérums de macaque ont été séparés en positifs et négatifs. Le trait pointillé représente le seuil de positivité de 39 défini précédemment.

On peut observer, grâce à la figure 17, que sur les 36 sérums donnés positifs par les laboratoires de référence, 31 donnent un résultat avec le test « microplaque » supérieur au seuil de positivité (39). Les trois sérums donnés positifs par les laboratoires de référence et donnant un résultat inférieur à ce seuil de positivité sont en réalité rendus comme douteux par le test « microplaque ». On observe également que sur les 79 sérums définis comme négatifs (voir Matériels et Méthodes), 77 donnent un résultat inférieur au seuil de positivité du test « microplaque ».

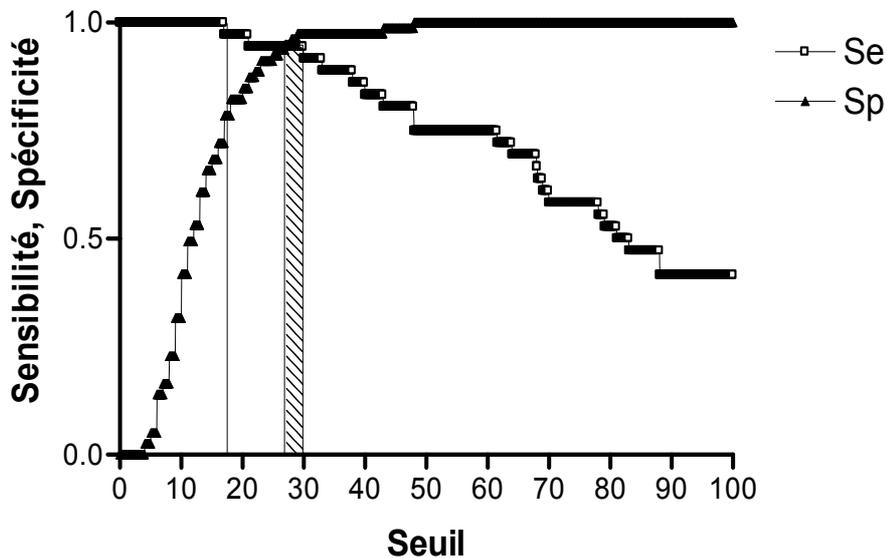


Figure 18 : Diagrammes de ROC du test ELISA « microplaque ».

Les valeurs de la sensibilité et de la spécificité du test ELISA « microplaque » sont représentées simultanément pour toutes les valeurs possibles du seuil de positivité entre 0 et 100 en prenant pour référence le statut sérologique des animaux défini comme indiqué dans « Matériels et Méthodes ». La plage d'optimum entre la sensibilité et la spécificité est représentée par la zone hachurée et la limite de sensibilité maximale (100%) par la droite verticale.

L'analyse de la sensibilité et de la spécificité de ce test démontre que la sensibilité du test reste maximale (100%) jusqu'à une valeur du seuil de 16,9 et la spécificité du test est alors de

72,2%. On observe que l'optimum entre la sensibilité et la spécificité est atteint pour les valeurs du seuil comprises entre 29 et 29,9. La sensibilité est alors de 94,4% et la spécificité de 97,5% (voir figure 18). Comme dans le cas du test Cobas Core II, on remarquera la différence importante entre le seuil humain défini par le fabricant (soit 100) et le seuil optimal de détection des anticorps anti-CeHV-1 dans les sérums de macaque (soit 29,9).

Aux vues des résultats obtenus avec les diagrammes de ROC, on obtient ainsi une zone douteuse comprise entre 16,9 et 29,8 et un seuil de positivité à 29,9.

La sensibilité et la spécificité du test sont respectivement de 100% et 72,2% pour un seuil fixé à 16,9 (soit le seuil douteux définit précédemment) et respectivement de 94,4% et 97,5% pour un seuil fixé à 29,9 (soit le seuil de positivité définit précédemment).

La valeur prédictive positive ou pourcentage de résultats « vrai positifs », est de 62,1% pour un seuil à 16,9 et de 94,4% pour un seuil de 29,9.

La valeur prédictive négative ou pourcentage de résultats « vrai négatifs », est de 100% pour un seuil à 16,9 et de 97,5% pour un seuil de 29,9.

Pour un seuil fixé à 16,9, la probabilité d'avoir un résultat faux négatif est de 0% et la probabilité d'avoir un résultat faux positif est de 37,9%. Pour un seuil fixé à 29,9, la probabilité d'avoir un résultat faux négatif est de 2,5% et la probabilité d'avoir un résultat faux positif est de 5,6% (pour une séroprévalence de 10%).

Nous avons effectué cette même analyse pour le test « microplaque ». Les résultats de cette analyse sont visibles dans la figure 19. Il apparaît clairement que les macaques originaires de l'île Maurice, de Chine et du Vietnam présentent des moyennes comparables et très nettement supérieures à celle des macaques originaires des Philippines. Ces résultats sont donc différents de ceux obtenus avec le test Cobas Core II (voir figure 10). Il apparaît donc que le type de test, voire le type d'antigène, employé puisse avoir une influence importante sur les résultats obtenus avec les sérums de macaques séronégatifs, c'est-à-dire sur le niveau de réactivité basal de ces sérums.

Figure 19C : Vietnam

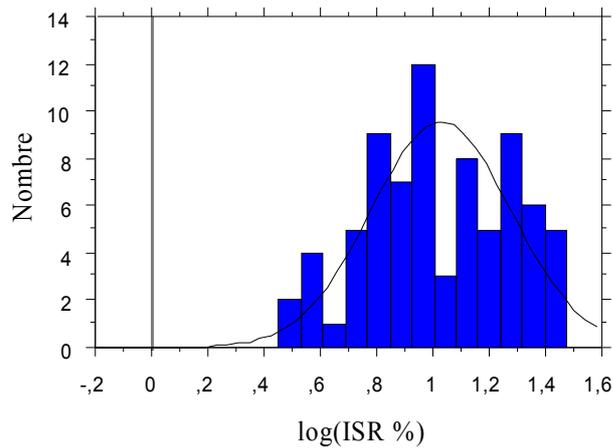


Figure 19D : Chine

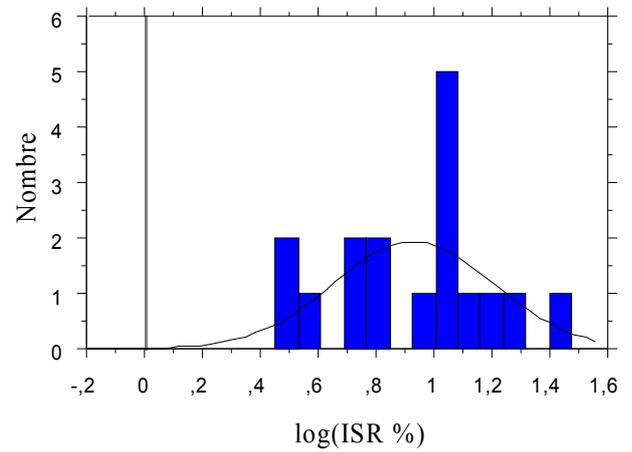


Figure 19B : Philippines

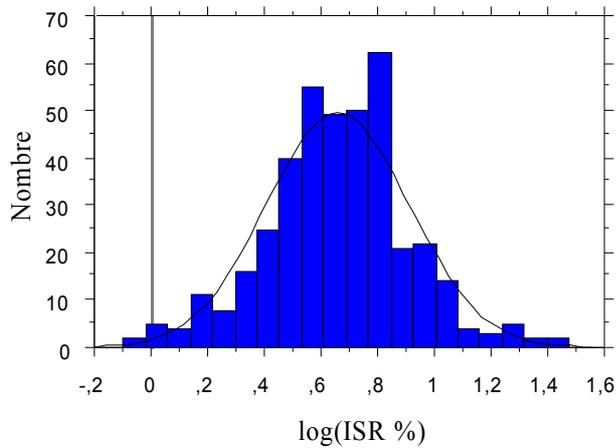
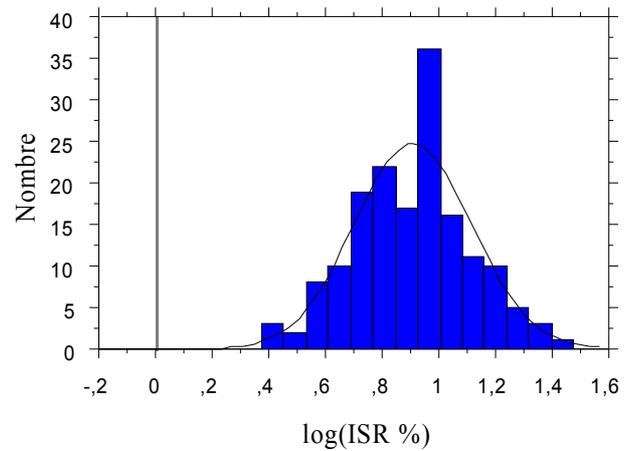


Figure 19A : Maurice

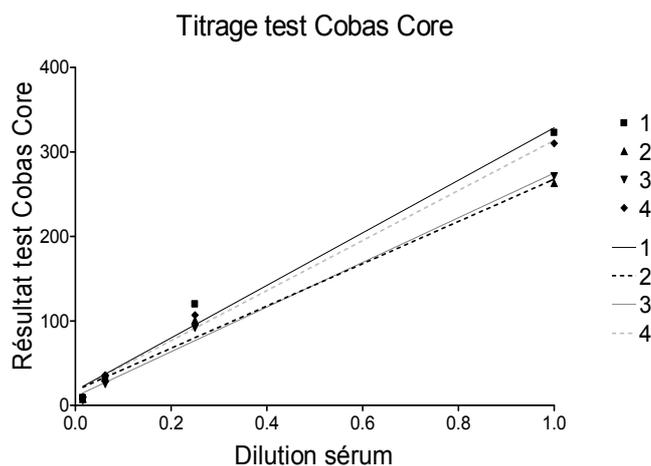


	Nombre	Moyenne	E T		Ecart moyen	P
Chine	17	0.929	0.278	Chine, Maurice	0.020	0.7141
Maurice	163	0.908	0.207	Chine, Philippines	0.269	<0.0001
Philippines	400	0.660	0.253	Chine, Vietnam	-.100	0.1480
Vietnam	76	1.029	0.51	Maurice, Philippines	0.249	<0.0001
				Maurice, Vietnam	-0.120	0.0001
				Philippines, Vietnam	-0.369	<0.0001

Figure 19 : Distribution pour différentes populations des fréquences des logarithmes des résultats ELISA « microplaque » obtenus avec des macaques fascicularis séronégatifs.

Dans cette figure, sont pris en compte les résultats inférieurs au seuil de 1,12 en donnée logarithmique (soit 30 en valeur naturelle). Ce seuil est calculé sur l'ensemble des résultats obtenus (soit toutes populations confondues). L'analyse par le test de Student des différences entre les résultats obtenus sur les sérums de macaques issus de différentes populations est rapportée dans le tableau A.

3.8. Titrage du test Cobas Core II et « microplaque »



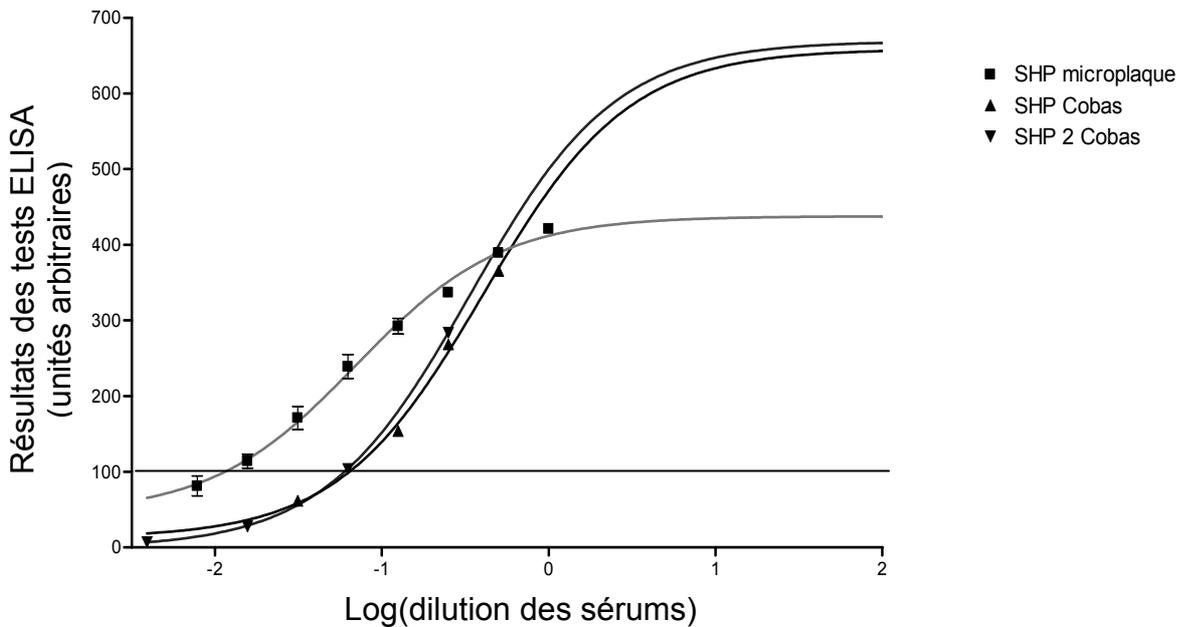
Sérum	Mois 1	Mois 2	Mois 3	Mois 4
R ²	0.986	0.984	0.993	0.993
Y-intercept	17.82	17.76	10.94	17.43
X-intercept	-0.057	-0.071	-0.041	-0.059

Figure 20 : Titrage d'un pool de sérums humains avec le test Cobas Core II.

Un pool de sérums humains positifs pour le HVS-1 a été titré quatre fois à mois d'intervalle. Les résultats obtenus sont représentés en fonction de la dilution effectuée. Des régressions linéaires ont été ensuite réalisées et dont les résultats sont rapportés dans le tableau ci-dessus.

On observe grâce à la figure 20 que d'une part le test Cobas Core II reste fortement reproductible au cours du temps, y compris dans le cadre du titrage de sérums.

Les régressions linéaires à partir de ces résultats présentent des coefficients de corrélation très proche de 1, ce qui permet donc de conclure que l'absorbance mesurée par l'automate est bien, dans le cas du test Cobas Core II, proportionnelle à la concentration en anticorps dans l'échantillon (dans la plage de concentration d'utilisation du test en l'occurrence de 0 à 400).



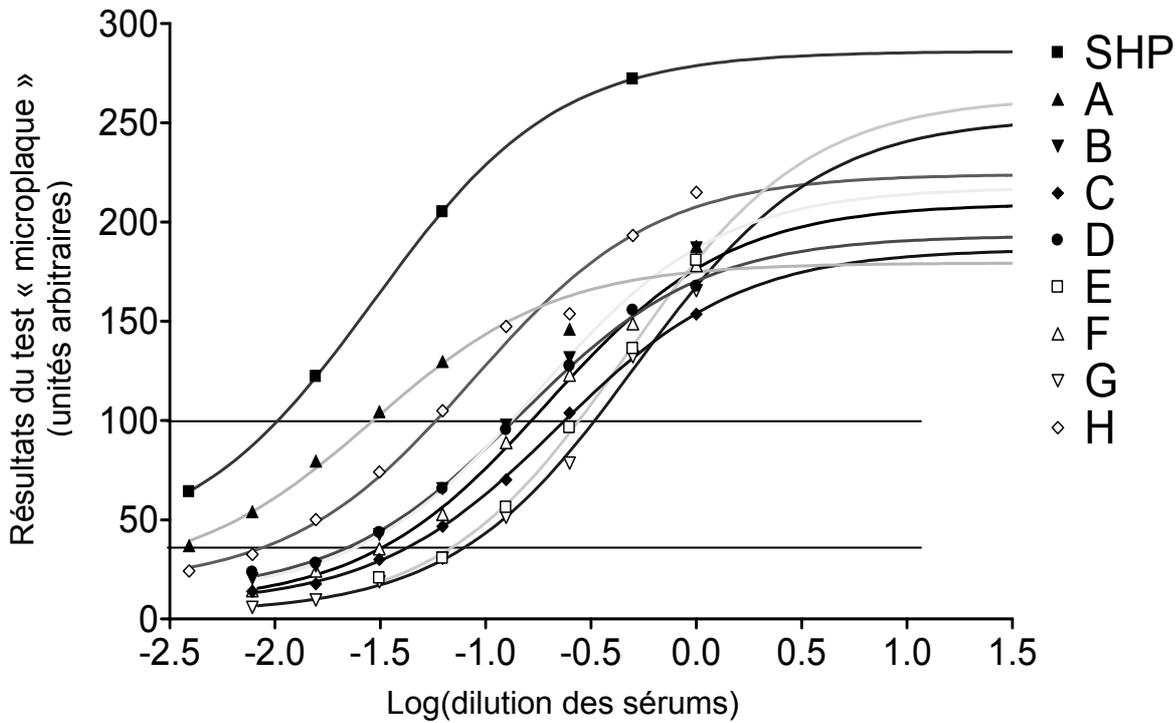
	SHP microplaque	SHP Cobas	SHP 2 Cobas
minimum	44.81	12.43	-0.7716
maximum	437.7	658.6	669.0
Logdil(max/2)	-1.153	-0.3903	-0.4712
Dil(max/2)	0.07024	0.4071	0.3379
R ²	0.9883	0.9957	1.000

Figure 21 : Comparaison du plateau de saturation théorique dans les tests Cobas Core II et microplaque.

Les sérums titrés correspondent à des pools de sérums humains positifs pour HSV. Deux pools de sérums différents ont été utilisés : SHP et SHP2.

Les plateaux théoriques en coordonnées semi logarithmiques ont été déduits des courbes de régression sigmoïdes (PRISM). Les coefficients de régression sont toujours supérieurs à 0,9 (voir figure 21). On déduit de la comparaison des courbes de saturation les points suivants :

- Le sérum humain sature le test microplaque pour des dilutions plus faibles que celles requises pour la saturation du test Cobas Core II.
- Deux pools de sérum humains différents donnent des résultats pratiquement identiques dans la technique Cobas Core II.
- Il n'y a pas de différence entre les deux pools de sérum humains pour le signal maximum théorique en Cobas Core II.
- La Dil(max/2) dans le test microplaque est 5,7 fois plus faible que celle calculée pour le test Cobas Core II.
- Le seuil de positivité pour les sérums humains est de 100% dans les deux tests. On remarquera que la dilution au seuil de positivité est respectivement de 1/15 pour le test Cobas Core II et de 1/87 pour le test « microplaque » qui est donc le test le plus sensible pour les sérums humains.



	SHP	A	B	C	D	E	F	G	H
minimum	34.94	20.63	10.87	6.987	12.08	2.199	7.286	2.779	17.13
maximum	286.0	179.4	217.5	186.4	193.2	263.2	209.3	252.9	224.2
Logdil(max/2)	-1.530	-1.534	-0.7580	-0.6566	-0.8392	-0.3343	-0.7114	-0.2861	-1.060
Dil(max/2)	0.02951	0.02922	0.1746	0.2205	0.1448	0.4631	0.1944	0.5175	0.08706
R ²	1.000	0.9723	0.9999	0.9995	0.9988	0.9989	0.9982	0.9967	0.9893

Figure 22 : Comparaison des plateaux de saturation théorique dans le test microplaque avec sept sérums de macaque, un sérum de babouin (A à H) et un pool de sérum humain positif (SHP). Les résultats obtenus sont représentés en fonction du logarithme de base dix des dilutions. Des régressions de type sigmoïde ont ensuite été réalisées et les paramètres remarquables des courbes de régression sont rapportés dans le tableau ci dessus.

	SHP	A	B	C	D	E	F	G	H
Titre au seuil de 100	97	34	8	4	7	4	6	3	17
Titre au seuil de 30	∞	545	56	31	63	18	41	16	173

Tableau 7 : Comparaison des titre en anticorps anti-HSV-1 obtenus dans le test microplaque avec sept sérums de macaque, un sérum de babouin (A à H) et un pool de sérum humain positif (SHP).

Pour la comparaison des titres, il a été utilisé deux seuils de positivité : le seuil de positivité humain et le seuil de positivité défini précédemment pour les macaques. Les titres en anticorps correspondent à l'inverse de la dilution permettant d'obtenir un signal égal au seuil.

	Maximum	Espèce
A	179,4	Macaca arctoides
C	186,4	Macaca mulatta
D	193,2	Macaca arctoides
F	209,3	Papio sp.
B	217,5	Macaca mulatta
H	224,2	Macaca mulatta
G	252,9	Macaca mulatta
E	263,2	Macaca arctoides

Tableau 8 : Comparaison de la hauteur des plateaux de saturation dans le test microplaque en fonction de l'espèce de primate dont sont issus les sérums.

On obtient en effet des courbes parfaitement sigmoïdes lorsque l'on représente les résultats obtenus, pour chacun des sérums, en fonction du logarithme de la dilution réalisée. Cela indique donc que le test ELISA « microplaque » sature rapidement.

Les plateaux théoriques en coordonnées semi-logarithmiques ont été déduits des courbes de régression sigmoïdes (PRISM). Les carrés des coefficients de régression (r^2) sont toujours supérieurs à 0,9 (voir figure 22). On déduit de la comparaison des courbes de saturation les points suivants :

- Avec les sérums de macaque, les plateaux sont toujours plus bas qu'avec le pool de sérums humains. Ceci nous amène à l'hypothèse suivante : les anticorps de primate ne reconnaissent qu'une fraction des antigènes reconnus par les anticorps humains. Cette fraction varie d'un sérum de primate à l'autre. De quoi l'on déduit que le niveau de réactivité croisée entre les anticorps anti-*Simplexvirus* des primates (CeHV-1 ou CeHV-16) et le virus HSV-1 varie d'un animal à l'autre. Malgré tout, on remarquera que ce niveau de réactivité croisée est très élevé puisque le plateau de saturation obtenu avec les sérums de primate est entre 63 et 92% du plateau de saturation obtenu avec le pool de sérums humains.
- La hauteur des plateaux de saturation obtenus avec les sérums de primates varie d'un sérum à l'autre. L'espèce n'est pas en cause (voir tableau 8).
- Les dilutions au seuil de positivité humain (100%) ou au seuil de positivité des macaques (30%) sont présentées dans le tableau 7. Il apparaît clairement l'intérêt de valider le seuil de positivité des macaques afin d'optimiser la sensibilité du test. Ceci ne fait que confirmer ce que nous avons obtenu avec le diagramme de ROC.

Afin de mieux comparer les résultats obtenus entre les deux tests, nous avons choisi de représenter l'inverse de dilution donnant 50% de la DO maximum déterminée plus haut ($1/Dil(max/2)$) pour sept sérums titrés en fonction du résultat brut obtenu avec le test Cobas Core II (voir figure 23).

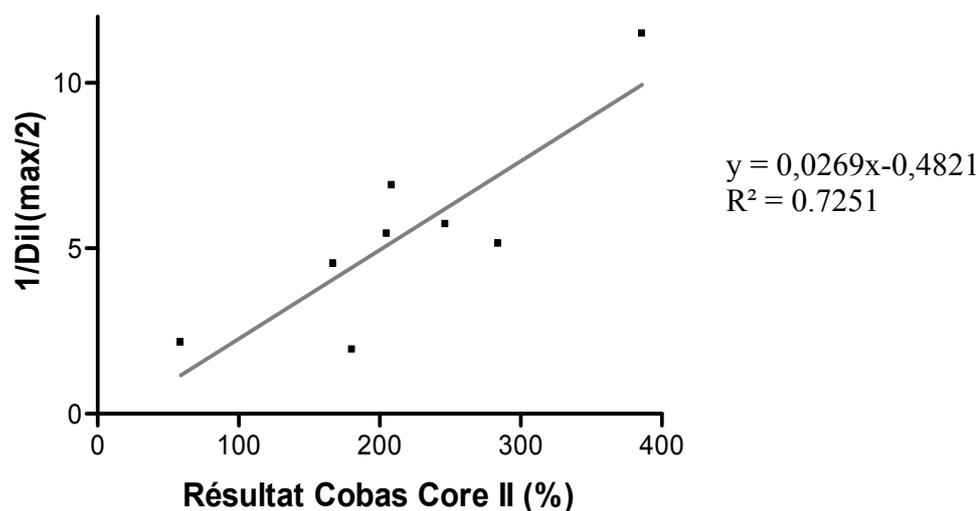


Figure 23 : Corrélation entre l'inverse de la Dil(max/2) déterminé en test « microplaque » et les résultats bruts Cobas Core II pour les mêmes sérums.

On peut observer sur la figure 23 que l'inverse de la dilution donnant 50% du maximum déterminé à partir du titrage de sept sérums de primates positifs est bien corrélé au résultat brut du test Cobas Core II ($R^2 = 0,73$).

3.9. Corrélation entre les kits Cobas Core II et « microplaque »

La figure 24 montre la relation entre les résultats obtenus pour 238 sérums avec les kits Cobas Core II et « microplaque ». On peut ainsi voir que les deux tests ELISA utilisés à Toulouse présentent une corrélation relativement bonne ($R^2 = 0,82$).

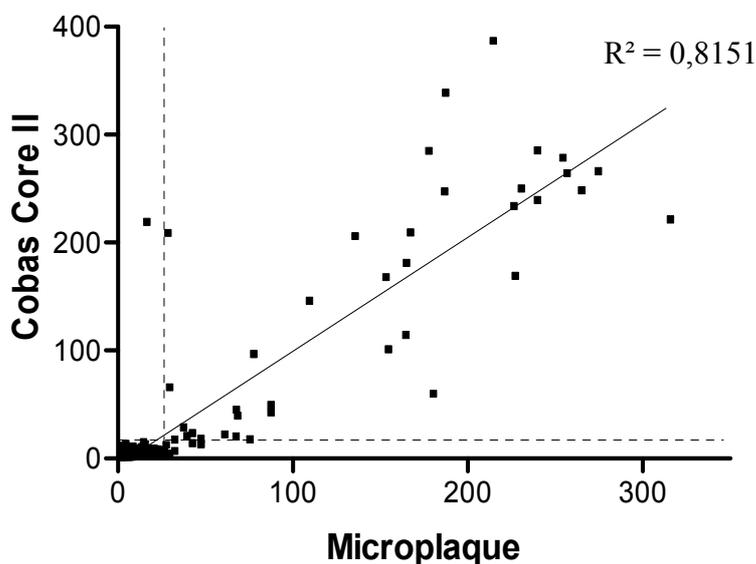


Figure 24 : Réactivité relative des sérums de macaque entre les tests ELISA Cobas Core II et « microplaque ».

Les droites en pointillés représentent les valeurs du seuil de positivité respectives des deux tests.

3.10. Cas de discordance entre les résultats rendus par les laboratoires de référence.

sérum	BioR (seuil = 0,4)	VetD	VRL (seuils = 0,15 / 0,19)	B virus Resource Laboratory	Microplaque (seuils = 16,9 / 29,9)	Cobas Core II (seuils = 6,7 / 12,9)	PCR
1	Neg (0,1)	Pos	nt	nt	Dout (21)	Neg (6)	nt
2	Neg (0,09)	Pos	nt	nt	Dout (23)	Neg (6,5)	nt
3	Neg (0,05)	Pos	nt	nt	Dout (26)	Dout (7,2)	Pos
4	nt	Pos	Neg (0,139)	nt	Pos (48)	Dout (12)	nt
5	nt	Neg	nt	Pos (ELISA <1:5000)	Dout (23)	Pos (215)	nt
6	nt	Neg	nt	Pos (ELISA <1:5000)	Pos (30)	Pos (63)	nt

Tableau 9 : récapitulatif des résultats discordants rendus par les laboratoires de référence et comparaison avec les résultats obtenus avec les tests ELISA Cobas Core II et « microplaque ».

Les valeurs seuils ont été indiquées lorsque celles-ci sont disponibles avec le cas échéant les valeurs des seuils douteux et de positivité. Les résultats rendus par le laboratoire « B virus Resource Laboratory » ont été confirmés par un Western Blot CeHV-1. Les résultats de PCR obtenus à partir d'écouvillonnages muqueux sont indiqués lorsqu'ils sont disponibles. BioR : BioReliance, VetD : VetDiagnostics, VRL : Virus Reference Laboratory. Neg : négatif, Dout : douteux, Pos : positif.

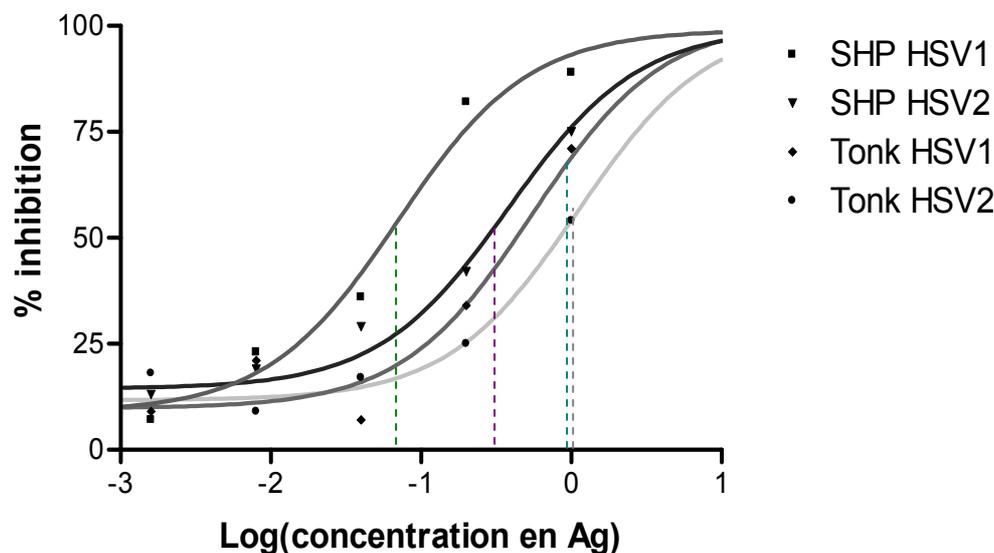
Tous les cas de discordance observés entre les résultats rendus par des laboratoires de référence à propos de la sérologie CeHV-1 sur un même sérum sont rapportés dans le tableau 9. On observe de fortes discordances pour six sérums sur les vingt-deux testés (soit 25%) par au moins deux laboratoires de référence différents.

Il est important de noter que dans le cas du sérum 3 du tableau 9 (donné positif par VetDiagnostics, négatif par BioReliance et douteux dans les deux tests ELISA que nous avons utilisés à Toulouse) nous avons eu accès à un frottis de muqueuse rectale prélevé par écouvillon chez l'animal correspondant. Nous avons extrait l'ADN de l'écouvillon et recherché par PCR la présence du génome viral du CeHV-1. Toutes les réactions de PCR se sont révélées positives. Ce sérum 3 provient du macaque crabier désigné sous la lettre Y dans le paragraphe ci-dessous traitant de la PCR. Ceci signifie que l'animal était bel et bien porteur du virus CeHV-1 mais que le taux d'anticorps sérique était relativement bas de telle sorte que l'un des laboratoires experts (BioReliance) a conclu à la négativité du sérum.

Quand aux sérums 5 et 6, il s'agit des sérums de macaque vietnamiens dont nous reparlerons avec beaucoup plus de détails dans le paragraphe 3.10.2. de ce chapitre. Nous insistons simplement sur la discordance flagrante entre les résultats rendus par deux laboratoires de référence et entre les résultats rendus par les deux tests que nous avons pratiqués.

3.11. Tests d'inhibition de la réactivité des sérums dans le test Cobas Core II par des antigènes viraux issus de HSV-1 et HSV-2.

3.11.1. Les anticorps anti-CeHV-1 de macaque détectés par le test Cobas Core II sont inhibables par les antigènes solubles de HSV-1 et de HSV-2.



	SHP HSV1	SHP HSV2	Tonk HSV1	Tonk HSV2
min	8,7%	13,9%	10,4%	11,6%
max	97,9%	92,1%	122,7%	98,1%
C°(inh. 50%) en UA et µg/ml	0,067 UA 9,05µg/ml	0,297 UA 96,5µg/ml	0,846 UA 114,2µg/ml	1,04 UA 338µg/ml
R ²	0,9796	0,9729	0,9435	0,9479

Figure 25 : Comparaison des courbes d'inhibition par les antigènes HSV-1 et HSV-2 des anticorps anti-HSV humains (pool de 4 sérums humains anti-HSV positifs) et des anticorps anti-CeHV-1 d'un macaque Tonkean porteur du virus (PCR positive).

C°(inh. 50%) = concentration en antigène permettant d'obtenir 50% de l'inhibition maximale.

Les concentrations sont exprimées en UA = unité arbitraires avec 1UA correspondant à la dilution au quart de la solution d'antigène fournie par la fabriquant.

SHP = pool de sérums humains positifs, Tonk = sérum de macaque Tonkean.

Les plateaux théoriques d'inhibition maximale ont été déduits des courbes de régression sigmoïdes (PRISM). Les coefficients de régression sont toujours supérieurs à 0,9 (voir tableau). On déduit de la comparaison des courbes d'inhibition (figure 25) les points suivants :

- La réactivité du pool de sérums humains est inhibée par les antigènes issus de HSV-1 pour des concentrations plus faibles que celles requises pour l'inhibition du même pool de sérums humains par les antigènes issus de HSV2. En effet, la C°(inh. 50%) est de 0,067 UA avec HSV-1 (soit 9,05 microgrammes /ml) et de 0,297 UA avec HSV-2 (soit 96,5 microgrammes /ml).
- La réactivité du sérum de macaque est inhibée de manière équivalente par les antigènes issus de HSV-1 et de HSV-2. Les valeurs de C°(inh. 50%) sont plus importantes que celles observées avec les anticorps humains.

On peut donc en déduire que les anticorps, présents dans le pool de sérums humains et donnant une réponse dans le test Cobas Core II, présentent une plus forte affinité pour les antigènes issus de HSV-1 que pour ceux issus de HSV-2. Ces observations sont en accord avec la plus forte probabilité que les individus dont les sérums ont été poolés soient porteurs du virus HSV-1 (prévalence de la séropositivité chez l'adulte = 90%) et à la plus faible probabilité qu'ils soient porteurs du virus HSV-2 (prévalence de la séropositivité chez l'adulte 20% pour HSV2).

En ce qui concerne les anticorps de macaque anti-CeHV-1, on peut déduire de nos résultats que les anticorps de macaque présentent une affinité moindre que celle des anticorps humains pour les antigènes issus de HSV-1 et de HSV-2. Avec le sérum étudié ici, il n'y a pas de différence entre les deux C° (inh. 50%) pour les deux virus humains. Bien que l'affinité des anticorps de macaque soit plus faible que celle des anticorps humains pour HSV-1 et proche de celle des anticorps humains pour HSV-2, les résultats que nous rapportons permettent d'affirmer que la positivité des tests Cobas Core II avec les anticorps anti-CeHV-1 est due à une réaction antigène – anticorps spécifique.

3.11.2. Expertise d'un sérum de macaque crabier positif en Cobas Core II, négatif dans le test microplaque et positif pour les anticorps anti-CeHV-1.

Le sérum d'un macaque crabier d'origine vietnamienne présente une réactivité forte dans le test Cobas Core II (résultat = 215, soit très supérieur au seuil de positivité = 12,9) et un résultat douteux dans le test « microplaque » (résultat = 23, compris entre le seuil douteux = 16,9 et le seuil de positivité = 29,9). Cette différence entre les deux tests peut découler de la différence entre les antigènes utilisés par les deux trousse : le Cobas Core II utilise des antigènes viraux issus de HSV-1 et HSV-2 tandis que le test microplaque n'utilise que des antigènes HSV-1. Dans les deux tests les virus sont produits par culture sur cellules VERO.

Dans un premier temps nous avons recherché la présence éventuelle dans ce sérum d'anticorps réagissant avec des antigènes issus de cellules VERO. Les tests d'immunofluorescence sur cellules VERO que nous avons pratiqués avec le Docteur Françoise OKSMAN (Laboratoire d'immunologie de l'Hôpital Rangueil, Toulouse) se sont tous révélés négatifs avec ce sérum. Ceci qui nous a permis d'exclure une réactivité de ce sérum vis-à-vis des antigènes de cellules VERO.

Nous avons tenté d'inhiber la réactivité de ce sérum dans le test Cobas Core II par des antigènes HSV-1 et HSV-2 produits sur cellules VERO. Nous avons pris comme contrôle négatif des protéines extraites de cellules VERO non infectées par les virus HSV.

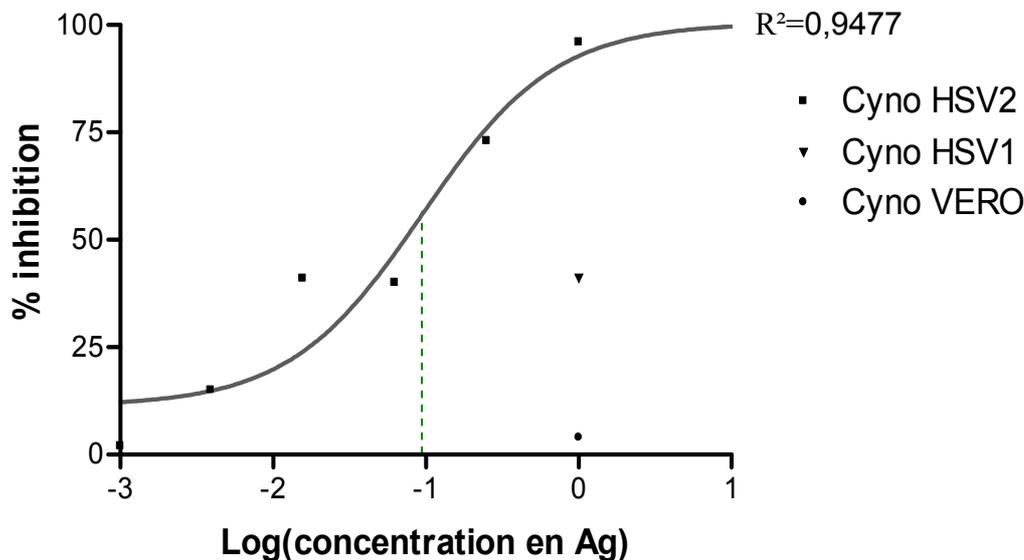


Figure 26 : Courbes d'inhibition du sérum de macaque crabier particulier par les antigènes issus de VERO, HSV-1 et HSV-2

Le plateau théorique d'inhibition maximale a été déduit de la courbe de régression sigmoïde (PRISM). Le coefficient de régression est supérieur à 0,9. On déduit de la comparaison de cette courbe d'inhibition (figure 26) avec celles obtenues précédemment (figure 25) les points suivants :

- La réactivité du sérum du macaque n'est pas du tout inhibée par les antigènes issus de cellules VERO.
- La réactivité du sérum de macaque n'est que faiblement inhibée par les antigènes viraux issus de HSV-1. De ce fait, nous n'avons pas étudié le pouvoir inhibiteur à de plus fortes dilutions de la solution antigénique.
- La réactivité du sérum de macaque est fortement inhibée par les antigènes viraux issus de HSV-2. De plus les concentrations en antigène nécessaires à cette inhibition sont relativement faibles et comparables à celles nécessaires pour l'inhibition du pool de sérums humains par les antigènes issus de HSV-1. En effet la $C^{\circ}(\text{inh. } 50\%)$ est de 0,067 UA (soit 9,05 microgrammes /ml) pour le pool de sérums humains avec HSV-1 et de 0,095 UA (soit 30,08 microgrammes /ml) pour le sérum de macaque avec HSV-2.
- La réactivité du sérum de cet animal est inhibée par les antigènes HSV-2 pour des concentrations beaucoup plus faibles que celles requises pour l'inhibition des anticorps anti-CeHV1 du macaque Tonkean étudié plus haut.

On peut donc ici en conclure que la positivité de ce sérum de macaque crabier dans le test Cobas Core II est due à la présence d'anticorps réagissant spécifiquement avec les antigènes de HSV-2 mais pas (ou très faiblement) avec les antigènes de HSV-1 (d'où la négativité dans le test microplaque).

En dehors de ce sérum, nous n'avons trouvé jusqu'à présent qu'un seul autre cas de

discordance nette entre le test Cobas Core II (positif fort) et le test microplaque (négatif). Cependant la plus faible réactivité de ce second sérum ne nous a pas permis de mener les tests d'inhibition. Un fait important à noter est que ces deux animaux proviennent du même élevage et sont arrivés en France ensemble. Le plus fort des deux (celui pour lequel nous avons réalisé les tests d'inhibition) était positif d'emblée tandis que le second animal était d'abord trouvé négatif puis positif six mois après le premier test.

Des échantillons de sérum de ces deux macaques cynomolgus ont été expertisés par le laboratoire de référence B virus Resource Laboratory qui les a tous les deux donnés positifs. Ils ont tous les deux été rendus fortement positif en ELISA utilisant des antigènes issus du CeHV-1 (titre <1:5000) et positif en Western Blot. Ce laboratoire expert utilise le virus CeVH-1 dans son test ELISA et pour le Western Blot, ceci permet d'affirmer que nous sommes en présence d'une réactivité croisée entre les antigènes de HSV-2 et de CeHV-1 pour les anticorps produits par ces deux animaux. Malgré la proche parenté entre HSV-1 et HSV-2, les anticorps produits par cet animal ne réagissent qu'avec les antigènes de HSV-2 ce qui démontre l'importance dans certains cas d'utiliser un test combinant HSV-1 et HSV-2 pour le dépistage des macaques séropositifs pour le CeHV-1.

Quelle que soit les hypothèses que l'on formule, soit les deux animaux sont porteurs d'un virus capable uniquement de susciter l'apparition d'anticorps qui ne reconnaissent que les antigènes HSV-2, soit les deux animaux présentent une réaction immunitaire humorale particulière ne les autorisant à produire que ce type d'anticorps. La conclusion la plus vraisemblable est que ces animaux sont infectés par un virus d'un type particulier et dont les anticorps qu'il suscite chez les animaux infectés ne reconnaissent que le HSV-2 et pas le HSV-1.

3.12. Autopsie de deux macaques séropositifs.

Lors de ces autopsies aucune lésion macroscopique caractéristique d'une infection par le virus CeHV-1 chez le macaque n'a été détectée. Les muqueuses buccales et génitales de ces animaux ne présentaient aucune lésion macroscopique. Le foie, la rate, les poumons et les glandes surrénales des animaux ne présentaient également aucune lésion macroscopique. Il a été prélevé des échantillons de muqueuse buccale, de muqueuse génitale, de ganglion trijumeau et de ganglion des racines postérieures sacrées comme indiqué dans « matériels et méthodes ». Les photographies réalisées lors ces autopsies sont rassemblées dans l'annexe 8. Celles-ci ont été légendées pour une meilleure compréhension du lecteur.

3.13. Résultats obtenus par PCR

3.13.1. La PCR conventionnelle « gGS4 »

Comme on peut le voir sur la figure 27, un fragment amplifié de 209 paires de bases a été détecté dans le produit de PCR réalisée à partir d'un échantillon d'ADN extrait du ganglion trijumeau du macaque A. Suivant la présence ou l'absence d'une bande au poids moléculaire attendu et le cas échéant l'intensité de cette bande, les résultats des PCR conventionnelles « gGS4 » ont été interprétés comme négatif, positif faible, positif ou positif fort (voir tableau 11)

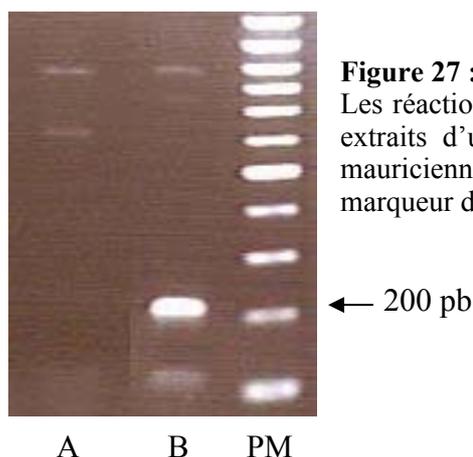


Figure 27 : Résultats de PCR conventionnelle « gGS4 ».
Les réactions de PCR ont été réalisées à partir d'échantillons d'ADN extraits d'un écouvillonnage buccal chez le macaque M d'origine mauricienne (A) et du ganglion trijumeau du macaque A (B). PM : marqueur de poids moléculaire.

3.13.2. La PCR nichée « gC »

Un fragment amplifié de 148 paires de bases a été détecté dans le produit de PCR réalisée à partir d'un échantillon d'ADN extrait du ganglion trijumeau du macaque A (voir figure 28).

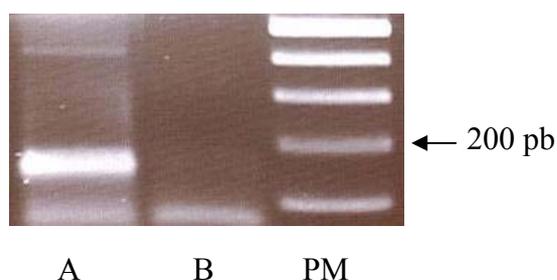


Figure 28 : Résultats de PCR nichée « gC ».

Les réactions de PCR ont été réalisées à partir d'échantillons d'ADN extraits du ganglion trijumeau du macaque A (A) et d'un écouvillonnage buccal chez le macaque M d'origine mauricienne (B). PM : marqueur de poids moléculaire.

3.13.3. Les PCR conventionnelles « Polymerase »

Nous avons testé les six réactions de PCR publiées par Miranda *et al.* permettant d'amplifier spécifiquement des fragments du gène de l'ADN polymérase du CeHV-1. Les auteurs ont montré que ces six réactions de PCR permettaient d'amplifier des fragments du gène de l'ADN polymérase du CeHV-1 mais pas du HSV-1 ou du HSV-2. Les auteurs n'ont cependant pas testé ces réactions de PCR dans le cadre de la détection de l'ADN viral du

CeHV-1 dans des échantillons prélevés chez des macaques. Plus précisément, dans le cas où un faible nombre de copies du génome du CeHV-1 sont noyées dans une grande quantité d'ADN génomique de macaque. Aucune de ces six réactions de PCR que nous avons testées sur l'ADN issus du ganglion trijumeau du macaque A, qui est fortement positif avec les PCR « gGS4 », « gC » et « gB » (voir paragraphe 3.12.5.), ne nous a permis d'amplifier spécifiquement des fragments du gène de l'ADN polymérase. Il est donc possible que ces réactions de PCR ne soient pas assez sensibles pour la détection d'un nombre limité de copies du génome du CeHV-1, ou que la présence de grande quantité de génome de macaque puisse inhiber la réaction.

3.13.4. La PCR quantitative « gG »

Nous avons testé cette réaction de PCR quantitative « gG » sur nos différents échantillons d'ADN dont l'ADN issus du ganglion trijumeau du macaque A, qui est fortement positif avec les PCR conventionnelle « gGS4 », nichée « gC » et quantitative « gB » (voir paragraphe 3.12.5.). Nous n'avons pas obtenu de résultat positif par cette technique. Cette réaction de PCR quantitative a été développée par Perelygina *et al.* pour détecter spécifiquement une portion du gène de la glycoprotéine G du CeHV-1. Les auteurs ont utilisé différentes souches de virus pour tester leur réaction de PCR quantitative cependant la séquence des gènes codant pour certaines glycoprotéines du CeHV-1 peut varier de manière importante suivant les souches du virus étudiées. Cela est particulièrement vrai pour le gène de la glycoprotéine G qui est le gène le plus variable chez les virus du genre *Simplexvirus* (Perelygina, 2003). L'une des hypothèses probables est donc que cette réaction de PCR quantitative puisse ne fonctionner pas avec toutes les souches de CeHV-1. Ainsi il est possible que, pour les souches de CeHV-1 qui infectaient les macaques crabiers ou Tonkean que nous avons étudiés, la séquence du fragment spécifiquement amplifié par la PCR quantitative « gG » variait trop par rapport à celles des souches virales employées par les auteurs.

3.13.5. La PCR quantitative « gB »

La courbe de dilution standard obtenue est montrée dans la figure 30.

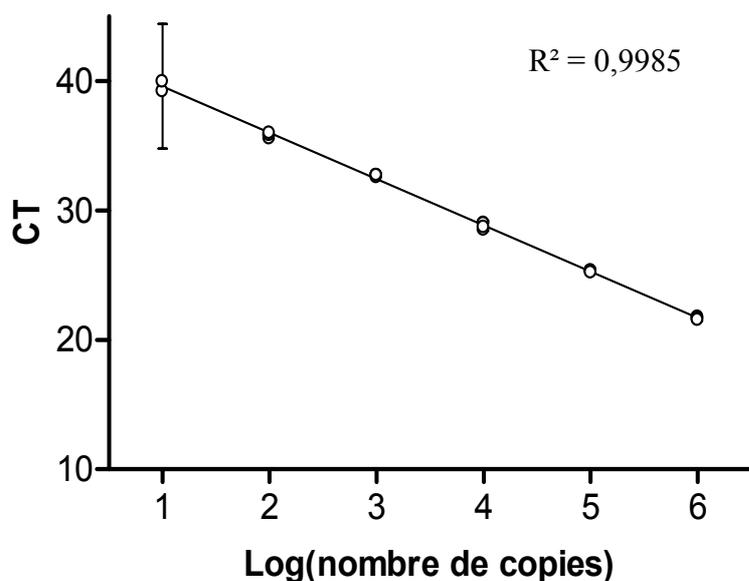


Figure 29 : Courbe standard de la PCR quantitative

Cette courbe représente le CT, ou Threshold Cycle, en fonction du logarithme de base 10 du nombre de copies. Le CT correspond au nombre de cycle à partir duquel le signal fluorescent donné par la réaction sort du bruit de fond, c'est-à-dire que le signal fluorescent dépasse le seuil de bruit de fond fixé. Le nombre de copies correspond au nombre de copies du plasmide présentes au total dans le mélange réactionnel. Pour cette gamme, chaque concentration de plasmide a

été analysée en quadruplicates. Les concentrations en plasmide variaient de 1 à 10^6 copies par réaction. Aucune des quatre réactions réalisées avec 1 copie par réaction n'a donné de signal supérieur au bruit de fond. Une des quatre réactions réalisées avec 10 copies par réaction n'a donné de signal supérieur au bruit de fond, la valeur du CT indiqué sur la courbe correspond donc à la moyenne des trois réactions ayant donné un résultat positif.

Les résultats de PCR quantitative obtenus avec la gamme de dilution du plasmide contenant le fragment d'ADN amplifié par la PCR quantitative nous ont donc permis de tracer une courbe standard (voir figure 29) sur laquelle il nous suffit de reporter le CT obtenu à l'issue d'une réaction de PCR quantitative pour déterminer le nombre de copies présentes lors de la réaction. Ces résultats obtenus avec la gamme de dilution nous indiquent également que la limite de détection de la méthode est d'environ dix copies (de plasmide) par réaction. Pour chaque réaction de PCR quantitative sur les échantillons d'ADN, il a été déterminé le nombre de copies présentes par réaction. Les résultats de PCR quantitative pour chaque échantillon indiqué dans le tableau 10 ci-dessous correspondent à la moyenne du nombre de copies estimé rapporté au total de chaque échantillon.

Les résultats obtenus avec les réactions de PCR conventionnelle et de PCR quantitative sont résumés dans les tableaux 10 a) et b) ci-dessous.

Tableau 10: Résultats de PCR. Ces PCR ont été réalisés avec l'ADN extrait à partir de différents échantillons prélevés chez des macaques de statut sérologique connu.

L'origine de ces échantillons était soit des morceaux de tissus prélevés lors d'une autopsie, soit des écouvillons buccaux, génitaux ou anaux. Fasci. = macaque Fascicularis ou crabier, Phil. = macaque originaire des Philippines et Viet. = macaque originaire du Vietnam.

a) Résultats de PCR obtenus à partir des échantillons prélevés lors des autopsies pratiquées sur les macaques A et B.

Animal		Type	PCR conventionnelle « gGS4 »	PCR quantitative « gB »	Sérologie « microplaque »	Sérologie Cobas	Expert
N°	espèce						
A	Fasci. Phil.	Ganglions trijumeaux	positif fort	40000	110 (+)	145,6 (+)	+
A	Fasci. Phil.	Ganglions sacrés	négatif	0	110 (+)	145,6 (+)	+
A	Fasci. Phil.	Muqueuse génitale	négatif	0	110 (+)	145,6 (+)	+
A	Fasci. Phil.	Muqueuse joue	négatif	320	110 (+)	145,6 (+)	+
A	Fasci. Phil.	Muqueuse lèvre	négatif	320	110 (+)	145,6 (+)	+
A	Fasci. Phil.	Muqueuse langue	négatif	0	110 (+)	145,6 (+)	+
B	Fasci. Viet.	Ganglions trijumeaux	négatif	0	nt	13 (+/-)	nt
B	Fasci. Viet.	Ganglions sacrés	négatif	0	nt	13 (+/-)	nt
B	Fasci. Viet.	Muqueuses buccales	négatif	0	nt	13 (+/-)	nt
B	Fasci. Viet.	Muqueuse génitale	négatif	0	nt	13 (+/-)	nt

b) Résultats de PCR obtenus à partir des échantillons prélevés par écouvillonnages muqueux sur les macaques C à P.

Animal		Type	PCR conventionnelle « gGS4 »	PCR quantitative « gB »	Sérologie « microplaque »	Sérologie Cobas	Expert
N°	espèce						
C	Tonkean	Ecouvillon vaginal	négatif	0	240 (+)	284,9 (+)	+
C	Tonkean	Ecouvillon buccal	positif faible	0	240 (+)	284,9 (+)	+
D	Tonkean	Ecouvillon vaginal	positif	100	240 (+)	238,9 (+)	+
D	Tonkean	Ecouvillon buccal	positif faible	50	240 (+)	238,9 (+)	+
E	Tonkean	Ecouvillon vaginal	négatif	0	265 (+)	247,9 (+)	+
E	Tonkean	Ecouvillon buccal	négatif	100	265 (+)	247,9 (+)	+
F	Tonkean	Ecouvillon vaginal	négatif	25	nt	nt	+
F	Tonkean	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	nt	+
G	Tonkean	Ecouvillon vaginal	positif	200	231 (+)	249,5 (+)	+
G	Tonkean	Ecouvillon buccal	négatif	100	231 (+)	249,5 (+)	+
H	Tonkean	Ecouvillon vaginal	positif	100	228 (+)	168,5 (+)	+
H	Tonkean	Ecouvillon buccal	positif faible	25	228 (+)	168,5 (+)	+
I	Tonkean	Ecouvillon vaginal	négatif	275	255 (+)	277,7 (+)	+
I	Tonkean	Ecouvillon buccal	positif	25	255 (+)	277,7 (+)	+
J	Tonkean	Ecouvillon vaginal	négatif	150	nt	nt	+
J	Tonkean	Ecouvillon buccal	positif	125	nt	nt	+
K	Tonkean	Ecouvillon vaginal	négatif	100	nt	nt	+
K	Tonkean	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	nt	+
L	Tonkean	Ecouvillon vaginal	positif faible	100	227 (+)	233,1 (+)	+
L	Tonkean	Ecouvillon buccal	négatif	50	227 (+)	233,1 (+)	+
M	Fasci. Mauri.	Ecouvillon vaginal	négatif	0	nt	(-)	nt
M	Fasci. Mauri.	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	(-)	nt
N	Fasci. Mauri.	Ecouvillon vaginal	négatif	0	nt	(-)	nt
N	Fasci. Mauri.	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	(-)	nt
O	Fasci. Mauri.	Ecouvillon vaginal	négatif	0	nt	(-)	nt
O	Fasci. Mauri.	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	(-)	nt
P	Fasci. Mauri.	Ecouvillon vaginal	négatif	0	nt	(-)	nt
P	Fasci. Mauri.	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	(-)	nt
Q	Fasci. Mauri.	Ecouvillon vaginal	négatif	0	nt	(-)	nt
Q	Fasci. Mauri.	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	(-)	nt
R	Fasci. Mauri.	Ecouvillon du prépuce	négatif	0	nt	(-)	nt
R	Fasci. Mauri.	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	(-)	nt
S	Fasci. Mauri.	Ecouvillon du prépuce	négatif	0	nt	(-)	nt
S	Fasci. Mauri.	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	(-)	nt
T	Fasci. Mauri.	Ecouvillon du prépuce	négatif	0	nt	(-)	nt
T	Fasci. Mauri.	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	(-)	nt
U	Fasci. Mauri.	Ecouvillon du prépuce	négatif	0	nt	(-)	nt

Animal		Type	PCR conventionnelle « gGS4 »	PCR quantitative « gB »	Sérologie « microplaque »	Sérologie Cobas	Expert
N°	espèce						
U	Fasci. Mauri.	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	(-)	nt
V	Fasci. Mauri.	Ecouvillon du prépuce	négatif	0	nt	(-)	nt
V	Fasci. Mauri.	Ecouvillon buccal	négatif	0	nt	(-)	nt
W	Fasci. Phil.	Ecouvillon buccal	négatif	50	165 (+)	113,8 (+)	+
X	Fasci. Phil.	Ecouvillon buccal	positif faible	330	155 (+)	100,5 (+)	+
Y	Fasci. Phil.	Ecouvillon anal	positif	130	26 (+/-)	8 (+/-)	+ et - (*)
Z	Fasci. Phil.	Ecouvillon buccal	positif	400	48 (+)	12,8 (+)	+

(*) positif pour VetDiagnostics et négatif pour BioReliance (voir 3.9. de ce chapitre)

Comme indiqué dans le tableau ci-dessus, le macaque A présentait une sérologie par les tests ELISA Cobas Core II et « microplaque » fortement positive, respectivement 145,6 et 110 pour des seuils de positivité fixés à 12,9 et 30. Ce résultat sérologique positif a été confirmé par VetDiagnostics. Les réactions de PCR ont permis de détecter la présence du génome du CeHV-1 en grande quantité dans ses ganglions trijumeaux et en quantité réduite dans ses muqueuses buccales. Les produits de PCR obtenus lors des réactions de PCR conventionnelle gGS4 / gGAS4 et nichée gC_1410_F / gC_1558_R ont été séquencés, les séquences ainsi obtenues étaient respectivement identiques à 96% et 100% avec les séquences publiées dans Genbank. Le génome viral n'a pas été détectable dans les ganglions sacrés prélevés chez cet animal, ni dans la muqueuse génitale prélevée.

Le second macaque autopsié présentait un résultat de sérologie douteux avec le test ELISA Cobas Core II. Au cours du suivi sérologique de cet animal, une première sérologie herpès donna un résultat négatif à 4 avec le test Cobas Core II puis trois mois après une sérologie douteuse à 8 (zone douteuse : 6,7 / 12,9) et enfin à nouveau trois mois après une sérologie à 13 (seuil de positivité à 12,9). Le dernier résultat de sérologie pratiqué sur le sérum prélevé le jour de l'autopsie était douteux (7,5). Les réactions de PCR réalisées sur les échantillons prélevés lors de l'autopsie (ganglions trijumeaux et sacrés, muqueuses buccales et génitales) n'ont pas permis de mettre en évidence le génome viral dans ces échantillons¹.

Les écouvillons ont été obtenus chez deux types d'animaux : des macaques crabiers et de Tonkean rendus séropositifs par un laboratoire de référence et des macaques crabiers originaires de l'île Maurice nouvellement importés et donc indemnes de toute infection par le CeHV-1. Tous les écouvillons prélevés chez les macaques crabiers originaires de l'île Maurice ont donné des résultats négatifs en PCR conventionnelle et négatifs en PCR quantitative. En ce qui concerne les écouvillons prélevés chez des animaux séropositifs, on

¹ Après la publication de cette thèse, nous avons réalisé de nouvelles réactions de PCR quantitative en adaptant le protocole décrit page 140 (2.6.5.) sur l'appareil Taqman® (Roche). La prise d'échantillon sur cet appareil est de 50 microlitres soit cinq fois plus que dans le protocole décrit dans la thèse. Les réactions se sont avérées positives sur les ganglions trijumeaux et lombosacrés (respectivement 2 et 5 copies de virus). Le second animal autopsié était donc bien porteur du virus CeHV-1.

observe que la majorité (20 sur 24) donne un résultat positif avec au moins une des techniques de PCR. Sur ces vingt-trois échantillons, douze ont été donnés positifs avec les deux techniques de PCR et dix ont été donnés positifs uniquement par PCR quantitative « gB » et un seul a été donné positif uniquement par PCR conventionnelle « gGS4 ». Dans tous les cas on observe que le nombre de copies trouvées dans l'ADN extrait de ces écouvillons est faible en comparaison avec l'ADN extrait des ganglions trijumeaux du macaque A.

3.13.6. Contrôle de spécificité vis-à-vis des virus humains

Cette vérification est essentielle car les expérimentateurs peuvent souiller les échantillons par les virus HSV dont ils sont porteurs. Les réactions de PCR conventionnelle gGS4 / gGAS4 et nichée gC_1410_F / gC_1558_R et de PCR quantitative gB ont été testées sur de l'ADN viral extrait culture de HSV-1 et HSV-2. Ces deux réactions de PCR n'ont pas permis d'amplification sur l'ADN de HSV-1 ou HSV-2. La PCR quantitative n'a pas permis d'obtenir de signal positif avec HSV-1 ou HSV-2. Nous avons séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% les produits obtenus à l'issue des réactions de PCR quantitative réalisées avec les ADN extrait de HSV-1 et HSV-2. Comme nous pouvons le voir sur la figure 30, aucune amplification n'a été obtenue avec l'ADN extrait de HSV-2. Au contraire avec l'ADN extrait de HSV-1, la réaction de PCR quantitative a permis l'amplification d'un fragment de taille attendu. L'absence de signal positif lors de la réaction de PCR quantitative s'explique donc par l'absence d'hybridation de la sonde sur le fragment amplifié.

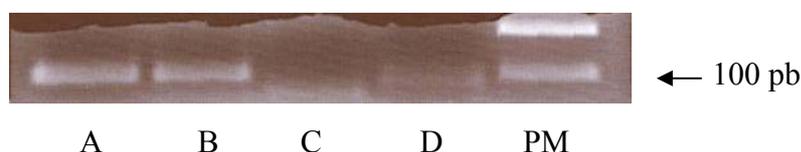


Figure 30 : Résultats de PCR quantitative « gB ».

Les réactions de PCR ont été réalisées à partir du plasmide contenant le fragment d'ADN amplifié par la PCR quantitative (A : 1000 copies par réaction, B : 100 copies par réaction) et à partir d'échantillons d'ADN extraits de culture virale de HSV-2 (C) et HSV-1 (D). PM : marqueur de poids moléculaire.

Il apparaît donc que les réactions de PCR que nous avons testées ne permettent pas de réactivité croisée avec les HSV humains. Cela permet donc d'exclure toute possibilité de réaction de PCR faussement positive par contamination de l'échantillon par les HSV humains que ce soit lors du prélèvement par écouvillonnage sur l'animal ou lors de la manipulation de l'échantillon au laboratoire d'analyse. Cette dernière remarque est importante en raison de la grande sensibilité de ces différentes méthodes de détection de l'ADN viral du CeHV-1 et de la très forte prévalence de l'infection buccale par le HSV-1 chez l'homme adulte (environ 90% de séoprévalence).

4. Discussion

L'analyse des résultats des tests sérologiques herpès réalisés chez le macaque démontre que les tests ELISA Cobas Core II et « microplaque », commercialisés pour le dépistage des anticorps anti-HSV chez l'homme, permettent une détection efficace des anticorps anti-CeHV-1 dans les sérums de macaque. Ceci est plus particulièrement vrai avec le test ELISA Cobas Core II dont la sensibilité est de 97,4% et la spécificité de 100%.

Ces valeurs de sensibilité et de spécificité sont proches de celles rapportées par différents auteurs qui ont mis au point des tests ELISA non commerciaux utilisant des antigènes issus des virus HSV-1 (~95%), herpès papio 2 (~98%) ou SA8 (~98%) (Takano 2001, Ohsawa 1999). Les pourcentages de sensibilité et de spécificité cités ici ont été calculés en prenant pour référence des tests ELISA utilisant des antigènes issus de CeHV-1. En théorie, les résultats obtenus avec les virus herpès papio 2 ou SA8 devraient être meilleurs que les résultats obtenus avec les virus humains HSV1 HSV2. En effet ces virus animaux sont plus proches du CeHV-1 que les virus herpès simplex humains. Cependant notre expérience avec les trousse commerciales utilisant des extraits antigéniques totaux de HSV démontre que ces tests ont des performances comparables.

Par rapport aux tests préparés par les laboratoires de référence, les trousse commerciales présentent de nombreux avantages. Elles répondent aux normes en vigueur en terme de sécurité pour leurs utilisateurs, chaque nouveau lot produit par le fabricant de ces trousse est validé par ses soins et calibré par rapport aux lots précédents ce qui assure une grande reproductibilité au cours du temps comme nous avons pu le démontrer dans notre expérience.

Nous rappellerons par ailleurs qu'il ne paraît pas très crédible de développer des tests basés sur la culture extensive de l'herpès virus simien CeHV-1. Ce virus est classé parmi les agents biologiques de niveau 3 en Europe et de niveau 4 aux USA. La réelle dangerosité de préparer les extraits antigéniques est à mettre en parallèle avec le faible bénéfice en terme de sensibilité et de spécificité.

Le fait d'utiliser des tests ELISA basés sur des antigènes des virus humains (HSV1 et HSV2) ne gêne en rien l'interprétation des résultats positifs car les macaques sont résistants à l'infection par les HSV humains.

Il est toutefois très important de noter que les tests ELISA anti-HSV commerciaux utilisés lors de cette étude sont tous des tests ELISA basés sur des antigènes viraux totaux issus de culture des virus HSV-1 ou HSV-1 et HSV-2. Il est ici exclu d'envisager l'emploi de tests ELISA anti-HSV commerciaux basés sur des protéines recombinantes des virus HSV-1 ou HSV-2. Ces tests sont de plus en plus utilisés en médecine humaine car ceux-ci, en particulier les tests utilisant la glycoprotéine G, peuvent permettre dans une certaine mesure de

différencier chez l'homme les anticorps dirigés contre le HSV-1 et le HSV-2. Ces tests ne sont pas adaptés à la détection des anticorps anti-CeHV-1 dans les sérums de macaque. Nous avons testé les performances d'un test de ce type fourni par les laboratoires Bio-Rad et nous avons confirmé l'inadaptation de ce genre de test. L'emploi de tests basés sur des antigènes viraux totaux permet de garantir un maximum de réactivité croisée entre les anticorps de macaque anti-CeHV-1 et les antigènes viraux utilisés.

Les deux tests ELISA anti-HSV commerciaux que nous avons étudiés (Cobas Core II et Diasorin) présentent des performances proches sur le plan de la sensibilité et de la spécificité pour la détection des anticorps anti-CeHV-1 dans les sérums de macaque. On peut cependant noter que le test Cobas Core II présente une spécificité plus importante pour les anticorps dirigés contre le CeHV-1 que le test « microplaque » soit respectivement 100% et 97,5%. De plus, le test Cobas Core II utilise des antigènes de HSV-1 et HSV-2 ce qui élargit le panel de détection des anticorps dirigés contre le CeHV-1, ce qui comme nous l'avons vu dans le paragraphe 3.10.2. de ce chapitre est essentiel dans certains cas afin de détecter les anticorps chez certains animaux séropositifs pour le CeHV-1. Enfin le test est pris en charge par un automate qui assure le pipetage des échantillons et toutes les étapes d'incubation et de lavage de la bille sur laquelle se déroule la réaction, ce qui évite grandement les erreurs de manipulation et assure ainsi une plus grande fiabilité des tests sérologiques.

Aux vues des résultats de l'analyse statistique que nous avons réalisée, nous avons pu définir un seuil de positivité et une zone douteuse pour les sérums de macaque.

En pratique, les résultats de sérologie ont été interprétés jusqu'à présent en fonction de seuils déterminés d'après la moyenne et l'écart type des logarithmes des résultats obtenus avec des sérums de macaque herpès virose B négatifs.

- Ce type de calcul des seuils a conduit à des révisions des seuils en fonction des résultats accumulés au fil du temps. Les derniers seuils déterminés par cette méthode sont indiqués ci-après :

- Pour le test Cobas Core II,

seuil de positivité = $10,4 (\text{Exp}^{\text{My(Log)}+3\text{ET(Log)}})$

résultat douteux : entre $5,9 (\text{Exp}^{\text{My(Log)}+2\text{ET(Log)}})$ et $10,3 (\text{Exp}^{\text{My(Log)}+3\text{ET(Log)}})$

- Pour le test « microplaque »,

seuil de positivité = $39 (\text{Exp}^{\text{My(Log)}+3\text{ET(Log)}})$ et

résultat douteux : entre $21,1 (\text{Exp}^{\text{My(Log)}+2\text{ET(Log)}})$ et $38,9 (\text{Exp}^{\text{My(Log)}+3\text{ET(Log)}})$

- Pour les seuils établis plus hauts la sensibilité, la spécificité et les fréquences de faux positifs et de faux négatifs sont les suivantes :

Cobas Core II

Seuil	Sensibilité	Spécificité	Faux positif	Faux négatif
5,9 (douteux)	100%	96,2%	22%	0%
10,4 (positivité)	97,4%	98,6%	9,5%	0,3%

Microplaque

Seuil	Sensibilité	Spécificité	Faux positif	Faux négatif
21,1 (douteux)	94,4%	87,3%	22,7%	2,8%
39 (positivité)	86,1%	97,5%	6,1%	6,1%

- Plus récemment, l'accumulation de résultats validés par différents laboratoires de référence nous a permis l'étude des diagrammes de ROC pour les deux tests. L'interprétation de ces diagrammes nous a conduit à optimiser les seuils. En fonction des seuils optimisés que nous proposons désormais on note une augmentation des spécificités et sensibilités et une diminution des fréquences des faux positifs et faux négatifs :

Cobas Core II

Seuil	Sensibilité	Spécificité	Faux positif	Faux négatif
6,7 (douteux)	100%	97,2%	17%	0%
12,9 (positivité)	97,4%	100%	0%	0,3%

Microplaque

Seuil	Sensibilité	Spécificité	Faux positif	Faux négatif
16,9 (douteux)	100%	72,2%	37,9%	0%
29,9 (positivité)	94,4%	97,5%	5,6%	2,5%

- Nous rappellerons que pour apprécier la spécificité et la sensibilité des tests, nous sommes contraints de nous référer aux résultats rendus par des laboratoires de référence. Comme nous l'avons déjà indiqué, pour un même sérum, les résultats rendus par les laboratoires de référence sont parfois discordants. Cela complique le travail de validation des tests dans la mesure où les laboratoires de référence n'assurent pas entre eux la standardisation de leurs méthodes.
- Dans le cas d'un résultat rendu douteux, nous insisterons sur le fait qu'aucune conclusion ne peut être tirée sans que la sérologie de l'animal soit vérifiée sur un deuxième prélèvement effectué au minimum 15 jours après le premier. Les résultats obtenus avec les deux sérums testés le même jour seront comparés afin de rechercher une éventuelle séroconversion chez cet animal. Jusqu'à ce jour, nous avons observé une fréquence d'environ 2% de résultats douteux.

Enfin, un fait marquant reste à souligner : la quasi-totalité des animaux testés étaient des animaux nouvellement importés en France. Chez tous ces animaux, un test sérologique herpès virose B a donc systématiquement été pratiqué par un laboratoire de référence au maximum 40 jours avant l'exportation vers la France, et tous les animaux étaient séronégatifs. Pourtant, à leur arrivée en France, nous avons trouvés positifs certains de ces animaux. De plus, la plupart de ces résultats ont été confirmés par un laboratoire de référence. Deux hypothèses découlent de cette remarque : soit le test réalisé par le laboratoire de référence avant

importation de l'animal n'était pas assez sensible pour diagnostiquer la séropositivité de l'animal, soit ce dernier s'est séroconverti entre la première sérologie et la seconde. Le fait que la séropositivité que nous avons mise en évidence soit confirmée par un laboratoire expert peut signifier que le laboratoire expert qui a corroboré nos résultats était plus sensible que le premier. Nous rappellerons à ce propos qu'il existe des discordances fréquentes entre les résultats rendus par les experts pour un même sérum (voir page 160).

De plus, le diagnostic sérologique dans ces laboratoires étrangers a de nombreux inconvénients. Tout d'abord l'envoi des sérums des animaux puis la réalisation du test et enfin le retour des résultats au commanditaire nécessite un temps généralement long qui avec certains laboratoires peut dépasser un mois. Ce temps relativement long n'est pas compatible avec une demande en urgence pour cause d'accident d'exposition humaine à un macaque ou plus généralement dans le cadre d'un dépistage sérologique lors d'une quarantaine. Les coûts de transport pour l'acheminement des prélèvements sanguins ou de sérum sont également très élevés en particulier pour les envois vers les USA où sont domiciliés la majorité des laboratoires de référence. Enfin, et c'est généralement le plus contraignant, l'envoi de sérums de macaque à un laboratoire étranger nécessite entre autre l'obtention d'un CITES qui constitue une démarche administrative lourde.

On peut également déplorer le manque de transparence de certains de ces laboratoires de référence comme VetDiagnostics et l'absence de validation officielle des tests réalisés dans ces laboratoires de référence. En particulier une validation des différents laboratoires entre eux à partir d'une banque commune de sérums de macaque serait par exemple souhaitable et limiterait sans doute les discordances entre les résultats rendus par les experts.

Au regard de la législation française, l'arrêté du 19 Juillet 2002 fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural, exige qu'un vétérinaire officiel certifie que tous les animaux du genre *Macaca* importés ou transitant sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer en provenance des pays tiers destinés à des établissements de présentation au public à caractère mobile « ont été soumis [...] à une épreuve de dépistage sérologique annuelle avec résultat négatif de l'herpès virose B, réalisée [...] dans un laboratoire autorisé ou à une épreuve de dépistages sérologique avec résultat négatif de l'herpès virose B, réalisée dans les 40 jours précédant le chargement ». Or il apparaît qu'il n'existe actuellement aucune liste désignant ces laboratoires autorisés à réaliser ces épreuves de dépistage sérologique de l'herpès virose B. Il n'existe pas non plus de détail concernant les conditions que doit remplir le laboratoire

qui réalise ces tests sérologiques.

La législation française interdit l'importation de macaques séropositifs vis-à-vis du CeHV-1 sur le sol français mais aucun texte ne fixe de règle, ni concernant le dépistage sérologique des animaux déjà présents sur le sol français, ni concernant les mesures à prendre en cas de découverte d'un animal séropositif sur le sol français. De ce point de vue, l'euthanasie systématique des animaux dépistés séropositifs n'est pas obligatoirement la seule solution envisageable. En effet dans le cadre de l'expérimentation animale, l'emploi d'animaux séropositifs n'est pas obligatoirement exclu, en particulier dans le cadre de protocoles courts, sous réserve de pouvoir isoler efficacement ces animaux des autres animaux du laboratoire et que le personnel en contact soit informé des mesures de prévention à prendre dans de tels cas. A titre d'information, l'importation et l'expérimentation sur des macaques séropositifs vis-à-vis du CeHV-1 est autorisé aux USA malgré le classement du virus dans la catégorie 4 des agents pathogènes.

Dans le cadre de l'expérimentation animale où les animaux réalisent des séjours relativement courts dans les animaleries et souvent dans des cages isolées, le dépistage sérologique de l'infection par le CeHV-1 chez le macaque devrait être envisagé à l'entrée des animaux dans l'animalerie puis ce dépistage n'est sans doute plus nécessaire si les animaux sont correctement isolés. Dans le cas des élevages ou des parcs zoologiques, la situation est différente. En effet, les animaux y vivent sur une longue période et s'y reproduisent. Les contacts entre animaux sont donc fréquents et les possibilités de transmission du virus entre un animal infecté et des animaux indemnes sont très importantes. Dans ces conditions, il sera évidemment toujours nécessaire de réaliser un dépistage sérologique de l'infection par le CeHV-1 chez les macaques qui seront introduits dans l'élevage ou le parc, mais il serait également important de réaliser un dépistage sérologique systématique chez tous les animaux suivant une périodicité pouvant varier de six mois à un an. Ce dépistage sérologique systématique ayant pour objet de détecter le maximum d'animaux infectés afin de pouvoir les isoler des animaux séronégatifs.

Le dépistage sérologique de l'infection par le CeHV-1 chez le macaque est la méthode actuellement la plus sensible qui existe. En effet la détection directe du virus est rendue difficile et aléatoire en raison de sa capacité à entrer en latence dans des sites anatomiques inaccessibles du vivant de l'animal (ganglions nerveux). Le dépistage sérologique n'est cependant pas une méthode infaillible. De nombreux exemples ont été décrits dans cette thèse, en particulier dans le chapitre 3 pages 83 à 85, d'animaux porteurs du virus CeHV-1 et pourtant séronégatifs quelque soit le test sérologique employé. Un autre point important attire

l'attention. Il existe de manière fréquente, 20% dans notre cas, des discordances dans les résultats rendus par deux laboratoires de référence pour un même sérum. Tout ceci montre bien que le dépistage sérologique de l'infection par le CeHV-1 chez le macaque est certes la méthode la plus fiable et la plus sensible disponible actuellement, mais elle ne permet malheureusement pas de détecter tous les animaux porteurs du virus. Il conviendra donc, comme le CDC le conseille, de considérer tout macaque comme potentiellement porteur du virus CeHV-1 et de prendre toutes les mesures de prévention adéquates.

La détection directe du virus par PCR à partir d'ADN extrait d'écouvillonnages muqueux est une méthode de dépistage envisageable chez le macaque. Cette méthode est cependant déconseillée en routine en raison de son manque de sensibilité évident quant on connaît la biologie du virus, comme rappelée dans le paragraphe précédent. Les travaux que nous avons réalisés montrent, par exemple, que sur vingt-quatre écouvillonnages réalisés chez des animaux séropositifs, la détection du génome du virus à partir d'ADN extrait d'écouvillonnages muqueux n'a donné des résultats positifs dans au moins une réaction de PCR que pour vingt de ces écouvillonnages.

La PCR peut parfois permettre d'obtenir un diagnostic de certitude quant à l'infection d'un animal par le CeHV-1 en cas de sérologie douteuse, comme dans le cas de l'animal 3 ou O dont nous avons parlé à la page 166 de ce chapitre. Toutefois le dépistage par PCR de l'infection par le CeHV-1 chez le macaque n'est pas conseillé en routine, y compris dans des cas similaires, car un résultat négatif par PCR à partir d'un écouvillon muqueux ne permet d'aboutir à aucune conclusion. Le seul diagnostic de quasi certitude en ce qui concerne l'absence d'infection d'un animal par le CeHV-1 ne peut être obtenu que par PCR en employant de l'ADN extrait des ganglions trijumeaux et sacrés de l'animal. Ce résultat ne peut donc pas être obtenu du vivant de l'animal. Le macaque B, séropositif et autopsié à l'ENVT, est un exemple d'animal positif en sérologie et pour lequel on a un résultat de PCR négatif sur les ganglions trijumeaux et sacrés de l'animal. On peut donc en déduire, avec une quasi certitude, que cet animal n'était pas infecté par le CeHV-1 et qu'il présentait un résultat faux positif en sérologie herpès.

Dans tous les cas il faudra retenir que la sérologie reste une méthode de choix pour le dépistage du portage viral du CeHV-1. Cependant il s'agit d'une méthode indirecte de diagnostic. Cette méthode ne permet en aucun cas un diagnostic de certitude quant à l'infection ou non d'un animal par le CeHV-1, quelque soit le laboratoire de référence qui a pratiqué le test. La seule méthode de diagnostic de certitude disponible actuellement reste l'euthanasie de l'animal en cause suivie de la recherche par PCR de la présence du génome du virus dans les ganglions trijumeaux et lombo-sacrés de l'animal (méthode que nous avons

validée à Toulouse).

Conclusion et perspectives

L'herpès virose B du macaque due au CeHV-1 doit être une maladie connue de toutes les personnes amenées à être en contact avec des macaques ou leurs tissus. Le CeHV-1 induit certes une maladie la plus part du temps bénigne chez le macaque infecté mais il peut également être responsable d'une zoonose grave. Ainsi l'homme, lorsqu'il est infecté par le CeHV-1, peut développer une encéphalomyélite le plus souvent mortelle en l'absence de traitement. La gestion du risque infectieux lié au CeHV-1 passe par différentes mesures de prévention qui concernent l'animal et l'homme. Le dépistage sérologique de l'infection par le CeHV-1 chez le macaque est une mesure préventive qui doit être mise en place chez l'animal afin de limiter la diffusion du virus aux animaux indemnes et bien sûr à l'homme. Cette mesure préventive n'est cependant pas suffisante et la mise en place de mesures de prévention des accidents d'exposition au virus chez l'homme est également nécessaire. De telles mesures de prévention devront être prises par les personnes amenées à manipuler des macaques ou leurs tissus. Enfin, en cas d'accident d'exposition à un macaque chez l'homme, un traitement préventif précoce pourra être mis en place en fonction du contexte clinique et sanitaire.

Le dépistage de l'infection des macaques par le CeHV-1 pose encore aujourd'hui des problèmes. La méthode la plus sensible actuellement reste la sérologie. Il existe cependant des animaux porteurs du virus, voire malades, et pourtant séronégatifs. Le dépistage sérologique de l'infection des macaques par le CeHV-1 avec isolement des animaux séropositifs reste la mesure de prévention majeure, mais cela ne garantit malheureusement pas totalement l'absence d'animal porteur de virus et séronégatif. D'où l'importance de considérer que tout macaque puisse être porteur du CeHV-1 et de prendre en conséquence toutes les mesures de prévention possibles quelque soit le statut sérologique de l'animal.

De nombreuses questions restent actuellement encore en suspend. Les facteurs de virulence du CeHV-1 pour l'homme ne sont pas connus, on ne peut ainsi pas expliquer pourquoi le CeHV-1 induit une encéphalomyélite chez l'homme. La rareté des cas d'infection humaine par le CeHV-1 est également inexpliquée. L'apparente facilité de transmission de ce virus dans certains cas décrits de contamination humaine tranche avec l'absence de cas déclaré de contamination humaine dans les zones de forte endémie du virus où les accidents d'exposition humaine au virus sont très fréquents. Devant ces observations on peut évoquer soit une variabilité de la virulence des souches de CeHV-1 pour l'homme, soit une variabilité interindividuelle de la sensibilité humaine, soit une variabilité interindividuelle du pouvoir contaminant des macaques.

Enfin, nos travaux nous ont permis de valider le test ELISA Cobas Core II pour le dépistage sérologique de l'infection par le CeHV-1 chez le macaque et également de démontrer, pour ce dépistage, l'importance d'utiliser un test ELISA basé sur des antigènes issus de HSV-1 et HSV-2.

ANNEXES

Annexe 1 : Génome de l'herpès virus B et comparaison

ORF ou séquence	Localisation		Brin	longueur (codons)	Identité avec HVB (%)		Caractéristiques et fonction(s) prédite(s) ^a
	début	fin			HSV-1	HSV-2	
<i>a</i> sequence	1	223					Répétition terminale directe
TRL	1	9021					Copie terminale d'une grande région de répétition
RL2			+	701	43.5	40.1	Immediate-early protein ICP0; protéine multifonctionnelle régulatrice
Exon 1	2194	2241	+	16			
Exon 2	2461	3003	+	181			
Exon 3	3125	4636	+	504			
UL	9022	116837					Grande région unique
UL1	9072	9746	+	225	65.5	53.4	Glycoprotéine L de membrane de virion; dans un complexe avec gH; fusion de membrane
UL2	9814	10575	+	254	71.3	68.9	Uracil-DNA glycosylase; réparation de l'ADN
UL3	10711	11394	+	228	61.8	61.8	Colocalisation avec ICP22 et UL4 dans des petits corps nucléaires denses
UL4	12120	11509	-	204	56.1	56.5	Colocalisation avec ICP22 et UL3 dans des petits corps nucléaires denses
UL5	14820	12172	-	883	82.7	83.0	Composant du complexe hélicase-primase
UL6	14819	16870	+	684	69.5	71.6	Protéine de capsid ; clivage de l'ADN/empaquetage
UL7	16821	17711	+	297	65.2	65.2	Protéine de capsid ; clivage de l'ADN/empaquetage
UL8	20171	17886	-	762	58.2	60.4	Composant du complexe hélicase-primase
UL9	22847	20223	-	875	78.3	78.8	Protéine de liaison <i>ori</i> ; activité hélicase
UL10	22714	24132	+	473	65.2	65.1	Glycoprotéine M de membrane de virion ; rôle proposé dans l'enveloppement de la capsid
UL11	24733	24437	-	99	50.0	53.1	Protéine de tégument myristylée ; enveloppement de la capsid
UL12	26553	24679	-	625	67.8	69.1	DNase; endoexonucléase; traitement des intermédiaires de réplication de l'ADN
UL13	28097	26553	-	515	66.9	68.8	Protéine kinase de virion
UL14	28513	27869	-	215	65.6	66.5	Protéine mineure de tégument
UL15			+	739	87.5	87.5	Clivage de l'ADN/empaquetage ; transitoirement lié aux capsides en cours de maturation
Exon 1	28599	29624	+	342			
Exon 2	33199	34389	+	397			
UL16	30898	29795	-	368	64.2	66.7	Associée à la capsid ; clivage de l'ADN/empaquetage ; situé dans l'intron UL15
UL17	33015	30919	-	699	66.8	69.5	Protéine de tégument ; clivage de l'ADN/empaquetage
UL18	35574	34618	-	319	82.8	82.4	Protéine VP23 de capsid ; forme des triplex avec VP19C qui relie des pentons et des hexons dans les capsides
UL19	39918	35785	-	1,378	86.9	85.5	Protéine principale VP5 de capsid ; forme les pentons et hexons de capsid

ORF ou séquence	Localisation		Brin	longueur (codons)	Identité avec HVB (%)		Caractéristiques et fonction(s) prédite(s)
	début	fin			HSV-1	HSV-2	
UL20	40783	40112	-	224	64.6	66.4	Protéine de membrane de virion ; sortie des virions ; locus <i>syn5</i>
UL21	41384	42964	+	527	66.2	68.3	Phosphoprotéine nucléotidyliée ; interagit avec les microtubules et facilite le transport intracellulaire du virus
UL22	45736	43193	-	848	59.1	60.9	Glycoprotéine H de membrane de virion ; dans un complexe avec gL ; fusion de membrane, entrée, diffusion de cellule à cellule
UL23	47107	45995	-	371	59.8	60.7	Thymidine kinase
UL24	47042	47842	+	267	66.4	66.4	Protéine nonglycosylée associée à la membrane ; locus <i>syn5</i>
UL25	48036	49775	+	580	79.8	79.8	Protéine mineure de capsid ; Empaquetage de l'ADN ; rôle possible dans ancrage de l'ADN
UL26	49937	51763	+	609	65.7	65.4	Protéase de maturation des capsides
UL26.5	50834	51763	+	310	58.8	57.0	Protéine d'échafaudage
UL27	54815	52137	-	893	79.9	80.4	Glycoprotéine B de membrane de virion ; entrée de la cellule ; contient le locus <i>syn3</i>
UL28	57192	54835	-	786	84.0	84.8	Clivage de l'ADN/empaquetage ; transitoirement lié aux capsides en cours de maturation
UL29	61257	57667	-	1,197	82.7	82.2	Protéine liant l'ADN simple brin ; rôle principal dans l'assemblage des protéines de réplication de l'ADN
<i>oriL1</i>	61592	61789					Centre d'origine de réplication <i>oriL1</i>
<i>oriL2</i>	61795	61992					Centre d'origine de réplication <i>oriL2</i>
UL30	62173	65916	+	1,248	79.6	80.0	Sous unité catalytique de polymérase d'ADN ; complexe avec UL42
UL31	66766	65861	-	302	80.9	81.3	Phosphoprotéine nucléaire ; interagit avec UL34 ; sortie de la capsid du noyau
UL32	68531	66759	-	591	74.2	74.5	Empaquetage de l'ADN ; non lié aux capsides
UL33	68530	68928	+	133	72.1	72.9	Empaquetage de l'ADN ; non lié aux capsides
UL34	68988	69803	+	272	66.8	71.3	Phosphoprotéine associée à la membrane nucléaire de type II ; interagit avec UL31 ; sortie de la capsid du noyau
UL35	69939	70283	+	115	51.8	47.3	Protéine phosphorylée basique VP26 de capsid
UL36	80356	70490	-	3,289	61.2	62.2	Protéine très grande de tégument ; interagit avec UL19 et UL37
UL37	84145	80624	-	1,174	69.4	68.7	Protéine mineure de tégument
UL38	84598	85974	+	459	70.6	69.1	Protéine VP19C de capsid, forme des triplex avec VP23 qui relie les pentons et hexons dans les capsides
UL39	86392	89385	+	998	66.7	66.0	Grande sous-unité de réductase de ribonucléotide
UL40	89434	90450	+	339	79.7	80.4	Petite sous-unité de réductase de ribonucléotide
UL41	92073	90619	-	485	72.3	73.0	Phosphoprotéine de tégument
UL42	92575	94002	+	476	48.6	48.8	Protéine liant l'ADN bicaténaire, sous-unité de polymérase d'ADN
UL43	94131	95270	+	380	44.4	49.1	Protéine associée à la membrane

ORF ou séquence	Localisation		Brin	longueur (codons)	Identité avec HVB (%)		Caractéristiques et fonction(s) prédite(s)
	début	fin			HSV-1	HSV-2	
UL44	95527	96930	+	468	49.9	51.5	Glycoprotéine C de membrane de virion ; attachement aux cellules ; blocage de l'immuno-réaction de l'hôte
UL45	97166	97690	+	175	63.6	59.0	Protéine de membrane de type II ; rôle possible dans la fusion aux cellules
UL46	100140	97978	-	721	57.7	58.9	Phosphoprotéine VP11/12 de tégment ; module l'activité du facteur alpha trans-inducteur
UL47	102327	100267	-	687	59.9	58.5	Phosphoprotéine VP13/14 de tégment ; O-glycosylée ; module l'activité de α -TIF ; lie l'ARN
UL48	104246	102783	-	488	69.3	69.2	Protéine principale VP16 (α -TIF) de tégment ; <i>trans</i> -activateur des gènes α
UL49	105449	104580	-	290	45.9	45.0	Protéine principale VP22 de tégment ; lie l'ARN ; porteur des ARNm des cellules infectées aux non infectées
UL49A	106092	105853	-	80	40.5	43.0	Protéine d'enveloppe
UL50	106107	107216	+	370	55.9	54.3	Triphosphatase de désoxyuridine
UL51	108064	107381	-	228	67.5	69.3	Phosphoprotéine associée à la capsidie et au tégment
UL52	108126	111302	+	1,059	73.0	73.1	Composant du complexe helicase-primase
UL53	111254	112267	+	338	66.0	68.6	Glycoprotéine K de membrane ; sortie des virions ; contient le locus <i>synI</i>
UL53A			-	300			Protéine hypothétique prévue par GeneMark et GeneMark.hmm
Exon 2	112186	112495	-	197			
Exon 1	112755	113344	-	103			
UL54	112644	114116	+	491	59.1	60.8	Immediate-early protéine ICP27 ; régule l'expression de gènes early et late
UL55	114429	115001	+	191	62.0	64.3	Protéine associée à la matrice nucléaire
UL56	115834	115154	-	227	39.7	42.9	Protéine de membrane de type II ; impliquée dans la pathogénicité du virus
IRL	116837	125634					Copie interne de la grande région de répétition
RL2			-	701	43.5	40.1	Immediate-early protéine ICP0 ; protéine de régulation multifonctionnelle
Exon 3	122733	121222	-	504			
Exon 2	123397	122855	-	181			
Exon 1	123664	123617	-	16			
<i>a</i> sequence	125635	125857					Copie inversée de <i>a</i> -sequence
IRS	125858	133868					Copie interne d'une petite région de répétition
RS1	131284	127724	-	1,187	65.0	66.8	Immediate-early protéine ICP4 ; régulation de l'expression de gènes
Oris1	132795	132796					Centre d'origine de réplication <i>oriS1</i>
Oris2	132998	132999					Centre d'origine de réplication <i>oriS2</i>
Us	133869	148554					Petite région unique
US1	133900	135252	+	451	41.1	43.5	Immediate-early protéine ICP22 ; requis pour l'expression optimale de ICP0
US2	136386	135478	-	303	56.1	54.0	Protéine de tégment
US3	136708	138084	+	459	60.8	61.1	Protéine kinase ; activité antiapoptotique

ORF ou séquence	Localisation		Brin	longueur (codons)	Identité avec HVB (%)		Caractéristiques et fonction(s) prédite(s)
	début	fin			HSV-1	HSV-2	
US4	138221	140242	+	674	29.2	39.2	Glycoprotéine G de membrane de virion ; entrée dans les cellules polarisées
US5	140465	140830	+	122	34.0	26.6	Glycoprotéine J ; bloque l'apoptose
US6	141296	142480	+	395	57.0	59.0	Glycoprotéine D de membrane de virion ; entrée dans les cellules ; interagit avec les récepteurs cellulaires
US7	142680	143885	+	402	46.1	51.0	Glycoprotéine I de membrane de virion ; dans un complexe avec la gE ; diffusion virale basolatérale
US8	144253	145872	+	540	46.0	48.0	Glycoprotéine E de membrane de Virion ; dans un complexe avec le gI ; diffusion virale basolatérale
US8.5	145817	146185	+	123	42.3	45.9	Phosphoprotéine nucléolaire
US9	146309	146581	+	91	58.9	57.3	Protéine de tégument
US10	148139	147204	-	312	43.7	45.9	Protéine de tégument
US11	148290	147847	-	148	45.2	46.7	Protéine de tégument liant l'ARN ; interagit avec la protéine kinase R
US12	148555	148310	-	82	26.8	26.8	Immediate-early protéine ICP47 ; inhibe la présentation d'antigène
TRs	148556	156566					Copie terminale d'une petite région de répétition
<i>oriS2</i>	149425	149426					Centre d'origine de réplication <i>oriS1</i>
<i>oriS1</i>	149628	149629					Centre d'origine de réplication <i>oriS2</i>
RS1	151140	154700	+	1187	65.0	66.8	Immediate-early protéine ICP4 ; régulation d'expression de gènes
<i>a</i> sequence	156567	156789					Répétition terminale directe

^a Les caractéristiques et fonctions des protéines de l'herpès virus B ont été déduites des propriétés des protéines homologues de HSV-1 et de HSV-2 connues (Perelygina 2003).

Annexe 2 : Laboratoires de référence

Laboratoire	Tests disponibles
<p>Dr. Julia Hilliard B Virus Research and Resource Laboratory Georgia State University PO Box 4118 Atlanta, GA 30302-4118 - USA <i>Tel : (404) 651-0808</i> E-Mail: biojkh@panther.gsu.edu</p>	<p>Culture, tests sérologiques et PCR sur échantillons simiens et humains</p>
<p>Dr. David Brown Enteric, Respiratory, and Neurological Virus Laboratory Central Public Health Laboratory 61 Colindale Ave. London NW9 5HT - England <i>Tel : (44) 208-200-4400</i> E-Mail: dbrown@phls.org.uk</p>	<p>Culture, tests sérologiques et PCR sur échantillons simiens et humains</p>
<p>VRL Laboratories 7540 Louis Pasteur Drive San Antonio, Texas 78229 - USA <i>Tel : (877) 615-7275</i> <i>Fax : (877) 615-7771</i> Site Web : http://www.vrllabs.com/</p>	<p>Culture, tests sérologiques et PCR sur échantillons simiens uniquement</p>
<p>BioReliance Simian Diagnostic Laboratory 14920 Broschart Road Rockville, MD 20850 - USA <i>Tel : (301) 610-2227</i> <i>Fax : (301) 610-2587</i> E-Mail: ahs@bioreliance.com Site Web : http://www.bioreliance.com/simian.html</p>	<p>Tests sérologiques sur échantillons simiens uniquement</p>
<p>Vet Diagnostics Victoria House Small Dole BN5 9XE - Henfield West Sussex - United Kingdom</p>	<p>Tests sérologiques sur échantillons simiens uniquement</p>
<p>Primate Viral Diagnostic Biomedical Primate Research Centre Lange Kleiweg 139 2288 GJ Rijswijk The Netherlands <i>Phone : +31 (0) 15.284.2855</i> <i>Fax : +31 (0) 15.284.3986</i> email : niphuis@bprc.nl</p>	<p>Tests sérologiques sur échantillons simiens uniquement</p>
<p>Shin Nakamura Department of Cellular and Molecular Biology Primate Research Institute Kyoto University Inuyama, Aichi 484-8506 - Japan</p>	<p>Tests sérologiques sur échantillons simiens uniquement</p>

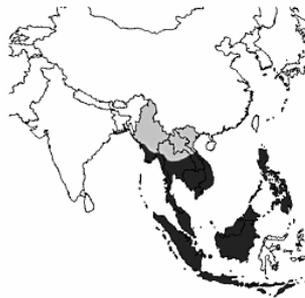
Annexe 3: Répartition géographique de différentes espèces de primate

Les espèces de primates (citées dans cette thèse) sont indiquées en italique et leur *Simplexvirus* inféodé en gras. Les zones en gris foncé représentent les aires de répartition des animaux et les zones en gris clair, les pays concernés.



Macaca arctoides

CeHV-1



Macaca fascicularis

CeHV-1



Macaca mulatta

CeHV-1



Macaca silenus

CeHV-1



Macaca radiata

CeHV-1



Macaca tonkeana

CeHV-1



Macaca nemestrina

CeHV-1



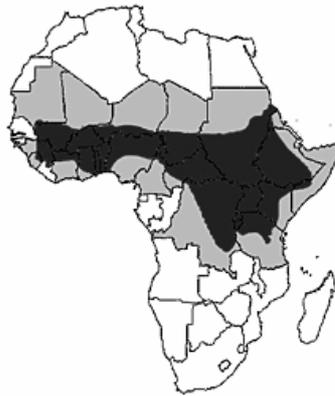
Macaca thibetana

CeHV-1



Macaca sylvanus

aucun



Papio anubis

CeHV-16



Papio cynocephalus

CeHV-16



Pan paniscus

ChHV



Pan troglodytes

ChHV



Gorilla sp.

soupçonné



Chlorocebus aethiops

CeHV-2



Pongo abelii

aucun



Pongo pygmaeus

aucun

Annexe 4 : Textes réglementaires

Arrêté 19 Juillet 2002

Arrêté fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural

NOR : AGRG0201612A

Article Annexe 5 En vigueur
Créé par Arrêté 2002-07-19 JORF 2 août 2002.

En vigueur depuis le 2 Août 2002

Certificat sanitaire pour l'importation et le transit sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer de primates non humains en provenance des pays tiers destinés à des établissements de présentation au public à caractère mobile.

Numéro du certificat, pays tiers d'expédition, autorité d'émission compétente, numéro de permis CITES Export (si nécessaire).

1. Identification des animaux.

Nom scientifique et nom commun, pays d'origine et de provenance, numéro d'identification individuel (tatouage ou transpondeur implantable), endroit du marquage, sexe, date de naissance ou âge, nombre total d'animaux.

2. Origine et destination.

Les animaux visés ci-dessus sont expédiés de ... (établissement d'origine, adresse, pays), par le moyen de transport suivant :

nature, numéro d'immatriculation, numéro du vol ou le nom, selon le cas, nom et adresse de l'exportateur ou de l'importateur, nom et adresse des locaux de première destination.

3. Renseignements sanitaires.

Je soussigné, vétérinaire officiel, certifie que les animaux décrits ci-dessus répondent aux conditions suivantes :

a) Sont originaires et proviennent d'un pays tiers dans lequel aucun cas de fièvres hémorragiques simiennes (fièvre de Crimée-Congo, fièvre jaune, fièvre de Mayaro, maladies à virus Ebola, maladie de Marburg, maladie à virus Kungunya) n'a été constaté au cours des 2 dernières années ;

b) Sont originaires d'un établissement placé sous surveillance vétérinaire depuis au moins 6 mois, où est appliqué un programme de surveillance sanitaire adapté des animaux au regard des maladies contagieuses de l'espèce, incluant des analyses microbiologiques et parasitologiques ainsi que des autopsies, dans lequel :

- tous les animaux ont été inspectés quotidiennement pour rechercher tout signe éventuel de maladie et être soumis, si nécessaire, à un examen clinique ;

- tous les animaux trouvés morts pour quelque raison que ce soit ont fait l'objet d'une autopsie complète dans un laboratoire habilité à cette fin par l'autorité compétente ;

- la cause de toute morbidité ou mortalité a été déterminée avant que le groupe auquel appartiennent les animaux soit expédié ;

c) Sont nés dans l'établissement d'origine et y sont restés depuis leur naissance ou ont été introduits dans l'établissement d'origine depuis au moins 6 mois ;
d) Sont originaires et proviennent d'un établissement dans lequel aucun cas de tuberculose et de rage ou d'autres zoonoses n'a été constaté au cours des 2 dernières années ;
e) Ont été soumis à au moins deux traitements annuels contre les parasites internes et externes le ... et le ... au cours des 40 jours précédant l'exportation avec le(s) produit(s) suivant(s) : ... (préciser les molécules actives et les doses de produit utilisées).
f) Ont été soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves de dépistage de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*, *bovis*, *africanum*), effectuées au début et à la fin de la quarantaine le ... et le ..., ou ont été soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves annuelles de dépistage de la tuberculose, la dernière épreuve ayant été effectuée dans les 40 jours précédant le chargement ;

g) Ont été soumis à une épreuve diagnostique annuelle, avec résultat négatif, pour la recherche des entérobactéries pathogènes ou ont été soumis à une épreuve diagnostique, avec résultat favorable, pour la recherche des entérobactéries pathogènes dans les 40 jours précédant le chargement ;

h) Ont été soumis, pour les macaques (*Macaca spp.*), à une épreuve de dépistage sérologique annuelle avec résultat négatif de l'herpès virose B, réalisée le ... dans un laboratoire autorisé ou à une épreuve de dépistages sérologique avec résultat négatif de l'herpès virose B, réalisée dans les 40 jours précédant le chargement ;

i) Soumis, à J 0, à une épreuve de recherche, avec résultats négatifs, des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire) réalisée le ..., puis vaccinés à J 0 par injection d'un vaccin inactivé d'au moins une unité antigénique internationale (norme OMS Organisation mondiale de la santé) le ..., avec le vaccin suivant (nom du vaccin et numéro du lot) et soumis à nouveau J 30 à une épreuve de titrage des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire), relevant un titre sérique au moins égal à 0,5 unité internationale par millilitre 30 jours après la vaccination le ... et expédiés à J 120 (1).

Dans le cas d'animaux qui ont fait l'objet d'une revaccination sans rupture du protocole vaccinal prescrit par le fabricant, les animaux ont été soumis à une épreuve de titrage des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire), relevant un titre sérique au moins égal à 0,5 unité internationale par millilitre, 30 jours après ce rappel ;

j) Ont été examinés le jour de leur chargement et ne présentent aucun signe clinique de maladie ou de suspicion de maladie et ont été jugés aptes au transport ;

k) Sont accompagnés d'un carnet de santé et de suivi individuel reprenant les informations définies suivantes :

- nom du propriétaire de l'animal ;
- adresse ;
- date de naissance de l'animal ;
- lieu de naissance de l'animal ;
- date d'acquisition de l'animal ;
- sexe de l'animal ;
- identification de l'animal (numéro de tatouage, numéro du transpondeur implantable micropuce et endroit du marquage) ;
- nom scientifique et nom commun de l'animal ;
- origine et provenance ;
- enregistrement des vaccinations (date des vaccinations, lieu des vaccinations, nom du vaccin, numéro de lot, nom en lettres capitales du vétérinaire, signature et cachet du

vétérinaire) ;

- contrôles sanitaires effectués par des laboratoires (date des prélèvements, lieu de réalisation des analyses, résultats des analyses) ;
 - date des examens vétérinaires, résultats des examens vétérinaires ; nom en lettres capitales du vétérinaire, signature et cachet du vétérinaire ;
 - date des traitements vétérinaires, produits utilisés,
- que j'ai reçu du propriétaire ou de son représentant une déclaration attestant :
- que, jusqu'à leur arrivée sur le territoire français, les animaux décrits dans le présent certificat ne seront pas en contact avec des animaux ne présentant pas un statut sanitaire équivalent ;
 - que tous les véhicules de transport et conteneurs, dans lesquels les animaux seront embarqués conformément aux normes internationales applicables au transport d'animaux vivants, seront préalablement nettoyés et désinfectés avec le produit suivant ..., et ils sont conçus de telle sorte que les déjections, la litière ou l'alimentation ne puissent pas s'écouler pendant le transport.

Ce certificat est valable 5 jours à compter de sa date de signature.

Fait à ..., le ...

Cachet et signature du vétérinaire officiel (la signature et le cachet doivent être d'une couleur différente de celle du texte imprimé).

Nom en lettres capitales, titre et qualification du vétérinaire officiel.

(1) La disposition J 120 est applicable à compter du 1er décembre 2002.

Textes appliqués :Code rural L236-1.

Arrêté 19 Juillet 2002

Arrêté fixant les conditions sanitaires pour l'importation et le transit, sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer, des animaux vivants et de certains de leurs produits visés à l'article L. 236-1 du code rural

NOR : AGRG0201612A

Article Annexe 4 En vigueur
Créé par Arrêté 2002-07-19 JORF 2 août 2002.

En vigueur depuis le 2 Août 2002

Certificat sanitaire pour l'importation et le transit sur le territoire métropolitain et dans les départements d'outre-mer de primates non humains, destinés à des établissements d'expérimentation animale, des établissements d'élevage spécialisés, des établissements fournisseurs (au sens du décret n° 87-848 modifié du 19 octobre 1987) et des établissements de présentation au public à caractère fixe, en provenance des pays tiers.

Numéro du certificat, pays tiers d'expédition, autorité d'émission compétente, numéro de permis CITES Export (si nécessaire).

1. Identification des animaux.

Nom scientifique et nom commun, pays d'origine et de provenance, numéro d'identification individuel (tatouage ou transpondeur implantable), endroit du marquage, sexe, date de naissance ou âge, nombre total d'animaux.

2. Origine et destination.

Les animaux visés ci-dessus sont expédiés de ... (établissement d'origine, adresse, pays), par le moyen de transport suivant :

nature, numéro d'immatriculation, numéro du vol ou le nom selon le cas, nom et adresse de l'exportateur ou de l'importateur, nom et adresse des locaux de première destination.

3. Renseignements sanitaires.

Je soussigné, vétérinaire officiel, certifie que les animaux décrits ci-dessus répondent aux conditions suivantes :

a) Sont originaires et proviennent d'un pays tiers dans lequel aucun cas de fièvres hémorragiques simiennes (fièvre de Crimée-Congo, fièvre jaune, fièvre de Mayaro, maladies à virus Ebola, maladie de Marburg, maladie à virus Kungunya) n'a été constaté au cours des deux dernières années ;

b) Sont originaires d'un établissement placé sous surveillance vétérinaire, où est appliqué un programme de surveillance sanitaire adapté des animaux au regard des maladies contagieuses de l'espèce, incluant des analyses microbiologiques et parasitologiques ainsi que des autopsies ;

c) Sont nés dans l'établissement d'origine et y sont restés depuis leur naissance ou ont été introduits dans l'établissement d'origine depuis au moins 6 mois ou ont été introduits dans l'établissement d'origine depuis au moins 60 jours et moins de 6 mois ;

d) Sont originaires et proviennent d'un établissement dans lequel aucun cas de tuberculose et

de rage n'a été constaté au cours des deux dernières années ;

e) Ont été placés, préalablement à leur exportation, dans une station de quarantaine conformément aux dispositions du code zoosanitaire international de l'Office international des épizooties pour une durée d'au moins 40 jours (date d'entrée en quarantaine le ..., date de sortie de la quarantaine le ..., dans laquelle, durant cette période :

- tous les animaux ont été inspectés quotidiennement pour rechercher tout signe éventuel de maladie et être soumis, si nécessaire, à un examen clinique ;
- tous les animaux trouvés morts pour quelque raison que ce soit ont fait l'objet d'une autopsie complète dans un laboratoire habilité à cette fin par l'autorité compétente ;
- la cause de toute morbidité ou mortalité a été déterminée avant que le groupe auquel appartiennent les animaux soit libéré de la quarantaine ;

f) Ont été soumis à au moins deux traitements contre les parasites internes et externes le ... et le ... au cours des 40 jours précédant l'exportation avec le(s) produit(s) suivant(s) : ... (préciser les molécules actives et les doses de produit utilisées).

g) Ont été soumis, avec résultat négatif, à deux épreuves de dépistage de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*, *Bovis*, *Africanum*), effectuées au début et à la fin de la quarantaine le ... (préciser la date) et le ... (préciser la date). Cette disposition ne s'applique pas aux microcèbes (*Microcebus* sp.), chirogales (*Cheirogalus* sp.), allocèbes (*Allocebus* sp.), tarsier spectral (*Tarsius spectrum*) et ouistiti pygmée (*Cebuella pygmea*) destinés à des établissements de présentation au public à caractère fixe ;

h) Ont été soumis à une épreuve diagnostique, avec résultat négatif, pour la recherche des entérobactéries pathogènes. Cette disposition ne s'applique pas aux microcèbes (*Microcebus* sp.), chirogales (*Cheirogalus* sp.), allocèbes (*Allocebus* sp.), galagos (*Galagos* sp.), tarsiers spectraux (*Tarsius spectrum*), ouistitis pygmées (*Cebuella pygmea*) et loris grêle (*Nyctebus tardigradus*) destinés à des établissements de présentation au public à caractère fixe qui ont été soumis à un traitement antibiotique pendant la quarantaine ;

i) Ont été soumis, pour les macaques (*Macaca* spp.)

à une épreuve de dépistage sérologique avec résultat négatif de l'herpès virale B, réalisé le Cette disposition ne s'applique pas aux macaques à longue queue ou macaques crabiers (*Macaca fascicularis*) originaires et en provenance de l'île Maurice ;

j) Ont été :

- soumis, dans le cas des animaux non vaccinés contre la rage, à deux épreuves de recherche, avec résultats négatifs, des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire) réalisées à l'entrée des animaux en quarantaine le ..., et dans les 10 jours précédant l'expédition le ... ;

- soumis, à J 0 à une épreuve de recherche, avec résultats négatifs, des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire) réalisées à l'entrée des animaux en quarantaine le ..., puis vaccinés à J 0 par injection d'un vaccin inactivé d'au moins une unité antigénique internationale (norme OMS Organisation mondiale de la santé) le ... avec le vaccin suivant ... (nom du vaccin et numéro du lot) et soumis à nouveau J 30 à une épreuve de titrage des anticorps neutralisant le virus rabique par un laboratoire officiel (nom et adresse du laboratoire), relevant un titre sérique au moins égal à 0,5 unité internationale par millilitre 30 jours après la vaccination le ... et expédiés à J 120 (1) ;

- proviennent d'un pays tiers indemne de rage au sens du code zoosanitaire international de l'Office international des épizooties dans lequel ils ont séjourné sans discontinuité ;

k) Ont été examinés le jour de leur chargement et ne présentent aucun signe clinique de maladie ou de suspicion de maladie et ont été jugés aptes au transport, que j'ai reçu du propriétaire ou de son représentant une déclaration attestant :

- que jusqu'à leur arrivée sur le territoire français les animaux décrits dans le présent certificat

ne seront pas en contact avec des animaux ne présentant pas un statut sanitaire équivalent ;
- que tous les véhicules de transports et conteneurs dans lesquels les animaux seront embarqués conformément aux normes internationales applicables au transport d'animaux vivants seront préalablement nettoyés et désinfectés avec le produit suivant :
et ils sont conçus de telle sorte que les déjections, la litière ou l'alimentation ne puissent pas s'écouler pendant le transport.

Ce certificat est valable 5 jours à compter de sa date de signature.

Fait à ..., le ...

Cachet et signature du vétérinaire officiel (la signature et le cachet doivent être d'une couleur différente de celle du texte imprimé).

Nom en lettres capitales, titre et qualification du vétérinaire officiel.

(1) La disposition J 120 est applicable à compter du 1er décembre 2002.

Textes appliqués :Code rural L236-1.

**MINISTÈRE DU TRAVAIL, DE L'EMPLOI
ET DE LA FORMATION PROFESSIONNELLE**

**Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste
des agents biologiques pathogènes**

NOR : TEFT9400844A

Le ministre du travail, de l'emploi et de la formation professionnelle, le ministre de l'agriculture et de la pêche et le ministre délégué à la santé,

Vu la directive n° 93/88/C.E.E. du conseil du 12 octobre 1993 modifiant la directive n° 90/679/C.E.E. concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (septième directive particulière au sens de l'article 16, paragraphe 1, de la directive n° 89/391/C.E.E.);

Vu l'article R. 231-61-1 du code du travail relatif à la classification des agents biologiques;

Vu l'avis du Conseil supérieur de la prévention des risques professionnels;

Vu l'avis de la Commission nationale d'hygiène et de sécurité en agriculture,

Arrêtent :

Art. 1^{er}. - Les dispositions annexées au présent arrêté fixent la liste des agents biologiques pathogènes et les classent au sein des groupes 2, 3 ou 4 tels que définis à l'article R. 231-61-1 du code du travail.

Art. 2. - Le directeur des relations du travail, le directeur général de la santé et le directeur des exploitations, de la politique sociale et de l'emploi sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 18 juillet 1994.

*Le ministre du travail, de l'emploi
et de la formation professionnelle,*

Pour le ministre et par délégation :

Par empêchement du directeur
des relations du travail :

Le chef de service,

F. BRUN

Le ministre de l'agriculture et de la pêche,

Pour le ministre et par délégation :

Par empêchement du directeur des exploitations,
de la politique sociale et de l'emploi :

L'administrateur civil,

J.-J. RENAULT

Le ministre délégué à la santé,

Pour le ministre et par délégation :

Par empêchement du directeur général de la santé :

Le sous-directeur de la veille sanitaire,

Y. COQUIN

ANNEXE

PARTIE I

Liste des agents biologiques pathogènes des groupes 2, 3 et 4

Tableau A

Les bactéries

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	2	
<i>Actinomadura madurae</i>	2	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Actinomadura pelletieri</i>	2	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	2	
<i>Actinomyces israelii</i>	2	
<i>Actinomyces pyogenes</i>	2	
<i>Actinomyces spp</i>	2	
<i>Arcanobacterium haemolyticum (Corynebacterium haemolyticum)</i>	2	
<i>Bacillus anthracis</i>	3	
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	
<i>Bartonella bacilliformis</i>	2	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	2	
<i>Bordetella parapertussis</i>	2	
<i>Bordetella pertussis</i>	2	V
<i>Borrelia burgdorferi</i>	2	
<i>Borrelia duttonii</i>	2	
<i>Borrelia recurrentis</i>	2	
<i>Borrelia spp</i>	2	
<i>Brucella abortus</i>	3	
<i>Brucella canis</i>	3	
<i>Brucella melitensis 1</i>	3	
<i>Brucella suis</i>	3	
<i>Campylobacter fetus</i>	2	
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	
<i>Campylobacter spp</i>	2	
<i>Cardiobacterium hominis</i>	2	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	2	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2	
<i>Chlamydia psittaci (souches aviaires)</i>	3	
<i>Chlamydia psittaci (souches non aviaires)</i>	2	
<i>Clostridium botulinum</i>	2	T
<i>Clostridium perfringens</i>	2	
<i>Clostridium tetani</i>	2	T, V
<i>Clostridium spp</i>	2	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2	T, V
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	2	
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	2	
<i>Corynebacterium spp</i>	2	
<i>Coxiella burnetii</i>	3	
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	
<i>Ehrlichia sennetsui (Rickettsia sennetsui)</i>	2	
<i>Ehrlichia spp</i>	2	
<i>Eikenella corrodens</i>	2	
<i>Enterobacter aerogenes cloacae</i>	2	
<i>Enterobacter spp</i>	2	
<i>Enterococcus spp</i>	2	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	2	
<i>Escherichia coli (à l'exception des souches non pathogènes)</i>	2	
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	2	
<i>Fluoribacter bozemanae (Legionella)</i>	2	
<i>Francisella tularensis (type A)</i>	3	
<i>Francisella tularensis (type B)</i>	2	
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	2	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2	
<i>Haemophilus ducreyi</i>	2	
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	V
<i>Haemophilus spp</i>	2	
<i>Helicobacter pylori</i>	2	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	
<i>Klebsiella spp</i>	2	
<i>Legionella pneumophila</i>	2	
<i>Legionella spp</i>	2	
<i>Leptospira interrogans</i> (tous sérotypes).....	2	
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	
<i>Listeria ivanovii</i>	2	
<i>Morganella morganii</i>	2	
<i>Mycobacterium africanum</i>	3	V
<i>Mycobacterium avium/intracellulare</i>	2	
<i>Mycobacterium bovis</i> (à l'exception de la souche B.C.G.).....	3	V
<i>Mycobacterium chelonae</i>	2	
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	2	
<i>Mycobacterium kansasii</i>	2	
<i>Mycobacterium leprae</i>	3	
<i>Mycobacterium mageritense</i>	2	
<i>Mycobacterium marinum</i>	2	
<i>Mycobacterium microti</i>	3	(*)
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	2	
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	2	
<i>Mycobacterium simiae</i>	2	
<i>Mycobacterium szulgai</i>	2	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3	V
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	3	(*)
<i>Mycobacterium xenopi</i>	2	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2	
<i>Neisseria meningitidis</i>	2	V
<i>Nocardia asteroides</i>	2	
<i>Nocardia brasiliensis</i>	2	
<i>Nocardia farcinica</i>	2	
<i>Nocardia nova</i>	2	
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	2	
<i>Pasteurella multocida</i>	2	
<i>Pasteurella spp</i>	2	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	
<i>Porphyromonas spp</i>	2	
<i>Prevotella spp</i>	2	
<i>Proteus mirabilis</i>	2	
<i>Proteus penneri</i>	2	
<i>Proteus vulgaris</i>	2	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	2	
<i>Providencia rettgeri</i>	2	
<i>Providencia spp</i>	2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	
<i>Pseudomonas mallei</i>	3	
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	3	
<i>Rhodococcus equi</i>	2	
<i>Rickettsia akari</i>	3	(*)
<i>Rickettsia canada</i>	3	(*)
<i>Rickettsia conorii</i>	3	
<i>Rickettsia montana</i>	3	(*)
<i>Rickettsia typhi (Rickettsia mooseri)</i>	3	
<i>Rickettsia prowazekii</i>	3	
<i>Rickettsia rickettsii</i>	3	
<i>Rickettsia tsutsugamushi</i>	3	
<i>Rickettsia spp</i>	2	
<i>Rochalimaea quintana</i>	2	
<i>Salmonella arizonae</i>	2	
<i>Salmonella enteritidis</i>	2	
<i>Salmonella typhimurium</i>	2	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Salmonella paratyphi A, B, C</i>	2	V
<i>Salmonella typhi</i>	3	V (*)
<i>Salmonella</i> (autres variétés sérologiques).....	2	
<i>Serpulina spp</i>	2	
<i>Shigella boydii</i>	2	
<i>Shigella dysenteriae</i> (type 1).....	3	T (*)
<i>Shigella flexneri</i>	2	
<i>Shigella sonnei</i>	2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	2	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	
<i>Streptococcus spp</i>	2	
<i>Treponema carateum</i>	2	
<i>Treponema pallidum</i>	2	
<i>Treponema pertenue</i>	2	
<i>Treponema spp</i>	2	
<i>Vibrio cholerae</i> (y inclus <i>Ei Tor</i>).....	2	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	
<i>Vibrio spp</i>	2	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	
<i>Yersinia pestis</i>	3	V
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	2	
<i>Yersinia spp</i>	2	

Tableau B

Les virus

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Adenoviridae</i>	2	
<i>Arenaviridae</i> :		
Virus Junin.....	4	
Virus Lassa.....	4	
Virus de la chorioméningite lymphocytaire (souches neurotropes).....	3	
Virus de la chorioméningite lymphocytaire (autres souches).....	2	
Virus Machupo.....	4	
Virus Mopeia et virus du complexe Tacaribe.....	2	
<i>Astroviridae</i>	2	
<i>Bunyaviridae</i> :		
Virus Bunyamwera.....	2	
Virus Oropouche.....	3	
Virus de l'encéphalite de Californie.....	2	
Hantavirus :		
Hantaan (fièvre hémorragique avec syndrome rénal).....	3	
Virus Séoul.....	3	
Virus Puumala.....	2	
Virus Prospect Hill.....	2	
Autres Hantavirus.....	2	
Nairovirus :		
Virus de la fièvre hémorragique de Crimée/Congo.....	4	
Virus Hazara.....	2	
Phlébovirus :		
Fièvre de la vallée du Rift.....	3	V
Fièvre à phlébotomes.....	2	
Virus Toscana.....	2	
Autres Bunyavirus connus comme pathogènes.....	2	
<i>Caliciviridae</i> :		
Norwalk Virus.....	2	
Autres <i>Caliciviridae</i>	2	
<i>Coronaviridae</i>	2	
<i>Filoviridae</i> :		
Virus Ebola.....	4	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
Virus de Marbourg.....	4	
<i>Flaviviridae</i> :		
Encéphalite d'Australie (encéphalite de la vallée de Murray).....	3	V (*) (a)
Encéphalite à tiques d'Europe centrale	3	V (a)
Absetarov.....	3	V (a)
Hanzalova.....	3	V (a)
Hypr.....	3	V (a)
Kumlinge.....	3	V (a)
Virus de la dengue, types 1-4.....	3	
Virus de l'hépatite C.....	3	(*)
Encéphalite B japonaise.....	3	V
Maladie de la forêt de Kyasanur.....	3	V
Louping ill.....	3	(*)
Fièvre hémorragique d'Omsk.....	3	V
Powassan.....	3	
Rocio.....	3	
Encéphalite verno-estivale russe.....	3	V (a)
Encéphalite de Saint-Louis.....	3	
Wesselsbron.....	3	(*)
West Nile.....	3	
Fièvre jaune.....	3	V
Autres Flavivirus connus pour être pathogènes.....	2	
<i>Hepadnaviridae</i> :		
Virus de l'hépatite B.....	3	V (*)
Virus de l'hépatite D (delta).....	3	V (*) (b)
<i>Herpesviridae</i> :		
Cytomégalovirus.....	2	
Virus d'Epstein-Barr.....	2	
Virus du cercopithèque type 1 (virus B du singe).....	3	
Virus de l'herpès humain, types 1 et 2	2	
<i>Varicellovirus</i>	2	
Virus lymphotrope B humain (HBLV-HHV 6).....	2	
<i>Orthomyxoviridae</i> :		
Virus grippal (influenza) types A, B et C.....	2	V (c)
<i>Orthomyxoviridae</i> transmis par les tiques : virus Dhori et Thogoto.....	2	
<i>Papovaviridae</i> :		
Birus BK et JC.....	2	
Papillomavirus humain.....	2	
<i>Paramyxoviridae</i> :		
Virus de la rougeole.....	2	V
Virus des oreillons.....	2	V
Virus de la maladie de Newcastle.....	2	
Virus parainfluenza, types 1 à 4.....	2	
Virus respiratoire syncytial.....	2	
<i>Parvoviridae</i> :		
Parvovirus humain (B 19).....	2	
<i>Picomaviridae</i> :		
Virus de la conjonctivite aiguë hémorragique (AHC).....	2	
Virus Coxsackie.....	2	
Virus Echo.....	2	
Virus de l'hépatite A (hépatovirus).....	2	V
Virus poliomyélitique.....	2	V
Rhinovirus.....	2	
<i>Poxviridae</i> :		
Virus de la variole du buffle.....	2	(d)
Virus de la variole bovine.....	2	
Virus de la variole de l'éléphant.....	2	(e)
Virus du nodule des trayeurs.....	2	
Virus du <i>Molluscum contagiosum</i>	2	
Virus de la variole du singe.....	3	V
Virus Orf.....	2	
Virus de la variole du lapin.....	2	(f)
Virus de la vaccine.....	2	
Virus de la variole (majeure et mineure).....	4	V
Virus de la variole blanche.....	4	V
Virus Tana et Yaba.....	2	
<i>Reoviridae</i> :		
Coltivirus.....	2	
Rotavirus humains.....	2	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
Orbivirus.....	2	
Reovirus.....	2	
<i>Retroviridae</i> :		(g)
Virus de l'immunodéficience humaine	3	
Virus de leucémies humaines à cellules T (HTLV), types 1 et 2.....	3	
<i>Rhabdoviridae</i> :		
Virus de la rage.....	3	V (*)
Virus de la stomatite vésiculeuse.....	2	
<i>Togaviridae</i> :		
Alphavirus :		
Encéphalomyélite équine Est-américaine.....	3	V
Virus Bebaru.....	2	
Virus Chikungunya.....	3	(*)
Virus Everglades.....	3	(*)
Virus Mayaro.....	3	
Virus Mucambo.....	3	(*)
Virus Ndumu.....	3	
Virus O'nyong-nyong.....	2	
Virus de la rivière Ross.....	2	
Virus de la forêt de Semliki.....	2	
Virus Sindbis.....	2	
Virus Tonate.....	3	(*)
Encéphalomyélite équine du Venezuela.....	3	V
Encéphalomyélite équine Ouest-américaine.....	3	V
Autres Alphavirus connus.....	2	
Rubivirus (virus de la rubéole).....	2	V
<i>Toroviridae</i>	2	
Virus non classés :		
Virus d'hépatites à transmission sanguine non encore identifiés.....	3	(*)
Virus de l'hépatite E.....	3	(*)
Agents non classiques associés avec les affections suivantes :		(h)
Maladie de Creutzfeldt-Jakob.....	3	(*)
Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.....	3	(*)
Kuru.....	3	(*)

Tableau C

Les parasites

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	2	
<i>Ancylostoma duodenale</i>	2	
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	2	
<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	2	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2	A
<i>Ascaris suum</i>	2	A
<i>Babesia divergens</i>	2	
<i>Babesia microti</i>	2	
<i>Balantidium coli</i>	2	
<i>Brugia malayi</i>	2	
<i>Brugia pahangi</i>	2	
<i>Capillaria philippinensis</i>	2	
<i>Capillaria</i> spp.....	2	
<i>Clonorchis sinensis</i>	2	
<i>Clonorchis viverrini</i>	2	
<i>Cryptosporidium parvum</i>	2	
<i>Cryptosporidium</i> spp.....	2	
<i>Dipetalonema streptocerca</i>	2	
<i>Diphyllobothrium latum</i>	2	
<i>Dracunculus medinensis</i>	2	
<i>Echinococcus granulosus</i>	3	
<i>Echinococcus multilocularis</i>	3	
<i>Echinococcus vogeli</i>	3	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Entamoeba histolytica</i>	2	
<i>Fasciola gigantica</i>	2	
<i>Fasciola hepatica</i>	2	
<i>Fasciolopsis buski</i>	2	
<i>Giardia lamblia</i> (<i>Giardia intestinalis</i>)...	2	
<i>Hymenolepis diminuta</i>	2	
<i>Hymenolepis nana</i>	2	
<i>Leishmania brasiliensis</i>	3	
<i>Leishmania donovani</i>	3	
<i>Leishmania ethiopica</i>	2	
<i>Leishmania mexicana</i>	2	
<i>Leishmania peruviana</i>	2	
<i>Leishmania tropica</i>	2	
<i>Leishmania major</i>	2	
<i>Leishmania spp</i>	2	
<i>Loa loa</i>	2	
<i>Mansonella ozzardi</i>	2	
<i>Mansonella perstans</i>	2	
<i>Naegleria fowleri</i>	3	
<i>Necator americanus</i>	2	
<i>Onchocerca volvulus</i>	2	
<i>Opisthorchis felineus</i>	2	
<i>Opisthorchis spp</i>	2	
<i>Paragonimus westermani</i>	2	
<i>Plasmodium falciparum</i>	3	
<i>Plasmodium</i> (humain et simien) spp...	2	
<i>Sarcocystis suihominis</i>	2	
<i>Schistosoma haematobium</i>	2	
<i>Schistosoma intercalatum</i>	2	
<i>Schistosoma japonicum</i>	2	
<i>Schistosoma mansoni</i>	2	
<i>Schistosoma mekongi</i>	2	
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2	
<i>Strongyloides spp</i>	2	
<i>Taenia saginata</i>	2	
<i>Taenia solium</i>	3	
<i>Toxocara canis</i>	2	
<i>Toxoplasma gondii</i>	2	
<i>Trichinella spiralis</i>	2	
<i>Trichuris trichiura</i>	2	
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	2	
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	2	
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	3	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	3	
<i>Wuchereria bancrofti</i>	2	

Tableau D

Les champignons

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	A
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>).....	3	
<i>Candida albicans</i>	2	A
<i>Coccidioides immitis</i>	3	A
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>).....	2	A
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i> (<i>Filobasidiella bacillispora</i>).....	2	A
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>parva</i>	2	
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>crecens</i>	2	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	2	A
<i>Fonsecaea compacta</i>	2	
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	2	
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> (<i>Ajellomyces capsulatus</i>).....	3	

AGENT BIOLOGIQUE	CLASSIFICATION	SIGLES et symboles
<i>Histoplasma capsulatum duboisii</i>	3	
<i>Madurella grisea</i>	2	
<i>Madurella mycetomatis</i>	2	
<i>Microsporium</i> spp.....	2	A
<i>Neotestudina rosatii</i>	2	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3	
<i>Penicillium marneffei</i>	2	A
<i>Sporothrix schenckii</i>	2	
<i>Trichophyton rubrum</i>	2	
<i>Trichophyton</i> spp.....	2	

PARTIE II

Lexique des sigles et symboles

A. - Lexique général

(*)	Accolé à certains agents biologiques pathogènes du groupe 3, cet astérisque indique qu'ils peuvent présenter un risque d'infection limité car ils ne sont normalement pas infectieux par l'air.
A	Agent biologique pathogène qui peut avoir des effets allergisants.
T	Agent biologique qui est susceptible de produire des toxines.
V	Un vaccin efficace est disponible.
spp	Cette mention (<i>species</i>) signifie qu'il est fait référence aux autres espèces qui sont connues pour être pathogènes chez l'homme.

B. - Lexique propre aux virus

(a)	Encéphalite à tiques.
(b)	La vaccination contre le virus de l'hépatite B protégera les travailleurs contre le virus de l'hépatite D (delta) dès lors qu'ils ne sont pas affectés par le virus de l'hépatite B.
(c)	Uniquement en ce qui concerne les types A et B.
(d)	Deux virus peuvent être identifiés sous cette rubrique, celui de la variole du buffle et une variante du virus de la vaccine.
(e)	Variante de la variole bovine.
(f)	Variante de la vaccine.
(g)	Il n'existe actuellement aucune preuve de maladie de l'homme par les rétrovirus d'origine simienne. Par mesure de précaution, un confinement de niveau 3 est recommandé pour les travaux exposant à ces derniers.
(h)	Bien qu'il n'y ait pas de preuve concernant l'existence chez l'homme d'infections dues aux agents responsables de l'encéphalite bovine spongiforme, le niveau de confinement 2 est recommandé comme mesure de protection pour les travaux en laboratoire.

Annexe 5 : Procédure d'envoi d'échantillons de primates potentiellement infectieux

(Disponible également à l'adresse Internet :

[http://www2.gsu.edu/~wwwvir/PDFs/Sample_Collection_\(BV-1\).pdf](http://www2.gsu.edu/~wwwvir/PDFs/Sample_Collection_(BV-1).pdf))

Viral Immunology Center
Georgia State University
50 Decatur Street
Atlanta, Georgia 30303

Department: Biology	Section: Nat'l. B Virus Resource Lab.
Laboratory Director: Julia K. Hilliard, Ph.D.	SOP Number: BV-1.
Protocol Title: Recommended Sample Collection	Effective Date: 04/99.
Issue Date: 04/01/99	Revision Number: 1.
Review Date(s): 06/04 .	

Recommended Sample Collection Procedures

PURPOSE

The purpose of this protocol is to describe the recommended types and procedures for collecting and transporting specimens to The National B Virus Resource Laboratory for B virus testing. These samples usually include serum, plasma, cerebral spinal fluid, whole blood, tissue, and/or virological swabs. These samples are obtained from human and non-human primate (NHP), as well as from fomite sources.

SCOPE

This protocol is written and intended for diagnostic and research laboratory personnel in The National B Virus Resource Laboratory, Department of Biology, Viral Immunology Center, Georgia State University, Atlanta, Georgia.

RESPONSIBILITIES

It is the responsibility of National B Virus Resource Laboratory personnel to advise clients who are collecting and shipping samples as to these recommended procedures. Any deviations from this protocol must be approved by the Laboratory Director prior to client advisement.

DEFINITIONS

A. Macaque: Old World monkeys of the *Macaca* genus, natural hosts to B virus. Members of this genus include, but are not limited to, *Macaca mulatta* (rhesus macaque), *Macaca fascicularis* (Cynomolgus monkey/Java macaque/Crab-eating macaque), *Macaca fuscata* (Japanese snow macaque), *Macaca silenus* (Lion-tailed macaque), *Macaca nemestrina* (Pig-tailed macaque), *Macaca nigra* (Celebes "ape"/Sulawesi-crested macaque/Sulawesi black "ape"), *Macaca sylvanus* (Barbary macaque or "ape"), *Macaca radiata* (Bonnet macaque), *Macaca arctoides* (Stump-tailed macaque/Red-faced macaque/Bear monkey), *Macaca thibetana* (Tibetan stump-tailed macaque), *Macaca maurus* (Moor macaque), *Macaca ochreata* (Sulawesi-booted macaque), *Macaca cyclopsis* (Taiwan macaque/Formosan rock macaque), *Macaca sinica* (Toque macaque) and *Macaca assamensis* (Assamese macaque).

B. *Cercopithecine herpesvirus 1*, Herpesvirus simiae, herpes B virus, B virus, BV: An alpha herpesvirus endemic to Old World non-human primates of the *Macaca* genus. If transmitted to a human host, this virus can be lethal if the host is not properly tested, the infection not identified, and proper medical treatment not begun immediately.

C. Herpes simplex virus type 1, HSV-1: An alpha herpesvirus endemic to humans. Due to its characteristics, antibody to HSV-1 is cross-reactive with B virus antigens when tested by current immunological assays. Because of this cross-reactivity, human serology samples may

be tested on competition ELISA to confirm western blot data and distinguish antibody reactions.

D. Herpes simplex virus type 2, HSV-2: An alpha herpesvirus endemic to humans. Due to its characteristics, antibody to HSV-2 is cross-reactive with B virus antigens when tested by current immunological assays. Because of this cross-reactivity, human serology samples may be tested on competition ELISA to confirm western blot data and distinguish antibody reactions.

E. Simian agent 8, SA8: An alpha herpesvirus endemic to some Old World monkey genus, other than macaques (i.e., African Green monkeys). Diagnostic testing for analysis of antibody to SA8 viral antigens may be preferred to B virus if an exposure/possible exposure occurs with one of these species. Although to date, there has been no confirmed case of transmission of SA8 infection to humans, the possibility of infection, and subsequent disease must be considered when such an exposure/possible exposure occurs.

F. Herpesvirus papio 2, HVP-2: An alpha herpesvirus endemic to some Old World monkey genus, other than macaques (i.e., baboons). Diagnostic testing for analysis of antibody to HVP-2 viral antigens may be preferred to B virus if an exposure/possible exposure occurs with one of these species. To date, there is one suggested case of HVP-2 being transmitted to a human host (see Palmer, 1987). The possibility of infection, and subsequent disease must be considered when such an exposure/possible exposure occurs.

G. Herpesvirus langur, HVL: An alpha herpesvirus endemic to some Old World monkey genus, other than macaques (i.e., langurs). Diagnostic testing for analysis of antibody to HVL viral antigens may be preferred to B virus if an exposure/possible exposure occurs with one of these species. Although to date, there has been no confirmed case of transmission of HVL infection to humans, the possibility of infection, and subsequent disease must be considered when such an exposure/possible exposure occurs.

H. Herpesvirus cerocebus, HVC: An alpha herpesvirus endemic to some Old World monkey genus, other than macaques (i.e., mangabeys). Diagnostic testing for analysis of antibody to HVC viral antigens may be preferred to B virus if an exposure/possible exposure occurs with one of these species. Although to date, there has been no confirmed case of transmission of HVC infection to humans, the possibility of infection, and subsequent disease must be considered when such an exposure/possible exposure occurs.

PRINCIPLE

The National B Virus Resource Laboratory receives samples from institutions worldwide for diagnostic testing to identify B virus and/or antibody to B virus (and sometimes other alpha herpesviruses). This protocol is utilized as a reference when advising clients in the proper procedures for the collection, storage and shipment of samples. Proper sample collection and sample handling until delivery to the laboratory is crucial to optimize test assay results and proper patient care. Recommendations for collecting, storing, and shipping serum samples are based upon data that serum antibody is stable at 2 – 6.0° C or if frozen at -15.0° C. Recommendations for collecting, storing and shipping virology samples are based upon data that alpha herpesviruses are stable at 2 - 6.0° C or if frozen at -60.0° C. These recommendations should provide optimum samples upon delivery for antibody detection and/or virus recovery.

POLICIES

A. All clients will be furnished with a written protocol for patient specimen collection, storage and shipping (*Instruction Sheet*) and test request forms (*Submission Form*).

B. Specimens that deviate from the written protocol and collection procedures may result in incomplete or sub-optimal results. Any and all deviations will be conveyed to the client in

writing on the *Case Evaluation* form.

C. Requests are received from health care institutions, research facilities, private industry, and individuals.

D. All requests must be in writing.

E. All records will be retained for a minimum of 7 years.

F. The client is responsible for all supplies and materials as well as shipping costs. The laboratory will recommend possible supply sources and catalog numbers.

G. The client is responsible for ensuring that samples are shipped in accordance to mandated shipping regulations for Dangerous Goods and dry ice (42 CFR 72: Interstate Shipment of Etiologic Agents).

H. Instructions, forms and possible supply sources will be provided on The National B Virus Resource Laboratory web page at <http://www.gsu.edu/bvirus>. It is the responsibility of the Laboratory Supervisor to ensure that the information provided on the web page is current.

Sample Collection: Supplies, Collection Procedures, Storage & Shipment

I. Serum Samples

A. Supplies

1. 5 to 7 ml red top or serum separator (SST) blood collection tubes.

2. Venipuncture supplies.

3. 2 ml non-glass serum storage tube.

B. Collection Procedures

1. Use of Universal Precautions is recommended when collecting any biological specimen.

2. Properly label a blood collection tube with patient or animal ID and collection date.

3. Using acceptable venipuncture technique, collect 5 to 7 ml whole blood.

4. Allow a minimum of 15 minutes to allow clot to form.

5. Centrifuge sample to separate serum from clot. This can also be accomplished by storing the whole blood sample, in an upright position, overnight in the refrigerator (2 – 6.0° C).

6. Properly label a 2 ml plastic storage tube with:

a) complete patient or animal ID;

b) serum collection date.

7. Transfer 1.0 – 2.0 ml of serum to the storage tube.

C. Storage before shipment

1. Serum samples can be stored in the refrigerator (2 – 6.0° C) for up to one week.

2. Serum samples can be stored frozen (-15.0 ° C) indefinitely.

D. Sample Packing and Shipment

1. Diagnostic samples are shipped as “Dangerous Goods”. They do not need to be shipped as “Infectious Agent”. Dangerous goods and dry ice shipping regulations must be followed for any diagnostic sample.

2. Refer to the following web pages for regulated shipping instructions:

a) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipregs.htm>

b) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipdir.htm>

c) <http://www.cdc.gov/od/ohs/pdffiles/who97.pdf>

3. Before packing, ensure that the Submission Form:

a) is filled out complete and legible;

b) has a name and phone number(s) of an individual to be contacted in emergencies;

c) has a purchase order number or other billing information;

d) is identical to the sample tubes.

4. Ship serum with a minimum of 5 pounds dry ice or with frozen cold packs.

5. Use extra dry ice or extra frozen cold packs for Friday, weekend or holiday shipments.

6. Pack carefully to avoid sample breakage and leaks.

7. Keep paperwork dry and separate from specimens.

8. Contact The National B Virus Resource Laboratory prior to shipping by:

a) telephone: 404-651-0808

b) fax: 404-651-0814

c) email: bvirus@gsu.edu

d) emergency pager: 1-888-500-3504

e) emergency phone: 404-358-8168

9. Ship samples ASAP (priority overnight delivery) via overnight courier to:

The National B Virus Resource Laboratory

Viral Immunology Center

Georgia State University

50 Decatur Street

Atlanta, Georgia 30303

10. Packages that are shipped on Friday must have both the package and the airbill annotated for "Saturday Delivery". Do not select the "Next Day Delivery" option. This is considered the next *business* day and the package will not be delivered on Saturday. Federal Express is the recommended courier for weekend delivery. Be sure to contact the B Virus Lab offices prior to shipping on Friday to provide the airbill number for tracking missing packages on the weekend.

E. Please do not:

1. ship serum in glass;
2. freeze or ship frozen whole blood samples for serum antibody testing;
3. ship samples with incomplete labeling;
4. label tubes with unnecessary (and confusing) information such as investigator's name, study numbers, cage numbers, etc;
5. allow samples to freeze-thaw before shipping.

II. Virology Swab Samples:

A. Supplies

1. Commercially prepared viral transport media (VTM) or laboratory prepared media.

Note: Recipes for proper laboratory prepared media are provided on the *Instruction Sheet* included in the "Client Packet" or available on the web page.

2. Sterile dacron or cotton tipped swabs with wooden or plastic shafts.

B. Collection Procedures

1. Use of Universal Precautions is recommended when collecting any biological specimen.
2. Properly label the viral transport sample tubes with complete patient or primate identification, the collection date and the swab site.
3. Swab each collection site with a separate sterile swab.
4. Place each swab into separate sample tubes containing 1 – 3.0 ml of viral transport media. If the shaft is longer than the tube, break it off by bending it against the side of the tube. Shafts that are too long will break through the cap, causing leaks and possible exposure to B virus.

C. Storage before shipment

1. Swab samples can be stored in the refrigerator (2 – 6.0° C) for up to one week.
2. Swab samples can be stored frozen (-60.0 ° C) indefinitely.

D. Sample Packing and Shipment

1. Diagnostic samples are shipped as "Dangerous Goods". They do not need to be shipped as "Infectious Agent". Dangerous goods and dry ice shipping regulations must be followed for any diagnostic sample.

2. Refer to the following web pages for regulated shipping instructions:

a) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipregs.htm>

b) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipdir.htm>

c) <http://www.cdc.gov/od/ohs/pdffiles/who97.pdf>

3. Before packing, ensure that the Submission Form:

- a) is filled out complete and legible;
- b) has a name and phone number(s) of an individual to be contacted in emergencies;
- c) has a purchase order number or other billing information;
- d) is identical to the sample tubes.

4. Ship swab samples with a minimum of 5 pounds dry ice.

5. Use extra dry ice for Friday, weekend or holiday shipments.

6. Pack carefully to avoid sample breakage and leaks.

7. Keep paperwork dry and separate from specimens.

8. Contact the National B Virus Resource Laboratory prior to shipping by:

- a) telephone: 404-651-0808
 - b) fax: 404-651-0814
 - c) email: bvirus@gsu.edu
 - d) emergency pager: 1-888-500-3504
 - e) emergency phone: 404-358-8168
9. Ship samples ASAP (priority overnight delivery) via overnight courier to:
The National B Virus Resource Laboratory
Viral Immunology Center
Georgia State University
50 Decatur Street
Atlanta, Georgia 30303

10. Packages that are shipped on Friday must have both the package and the airbill annotated for "Saturday Delivery". Do not select the "Next Day Delivery" option. This is considered the next *business* day and the package will not be delivered on Saturday. Federal Express is the recommended courier for weekend delivery. Be sure to contact the B Virus Lab offices prior to shipping on Friday to provide the airbill number for tracking missing packages on the weekend.

E. Please do not:

- 1. ship glass sample tubes;
- 2. use bacterial or viral culturettes;
- 3. use the same swab for more than one site;
- 4. place more than one swab site in each tube;
- 5. use less than 1.0 or more than 3.0 ml viral transport media;
- 6. ship samples with incomplete labeling;
- 7. label tubes with unnecessary (and confusing) information such as investigator's name, study numbers, cage numbers, etc;
- 8. allow samples to freeze-thaw before shipping.

III. Biopsy and Necropsy Tissue:

A. Supplies

- 1. Commercially prepared viral transport media (VTM) or laboratory prepared media. Note: Recipes for proper laboratory prepared media are provided on the *Instruction Sheet* included in the "Client Packet" or available on the web page.
- 2. Sterile instruments for tissue collection.

B. Collection Procedures

- 1. Use of Universal Precautions is recommended when collecting any biological specimen.
- 2. Properly label the viral transport sample tubes with complete patient or primate identification, the collection date and the tissue source.
- 3. Collect a 3 x 5 mm (approximate) tissue sample.
- 4. Place each tissue site into separate sample tubes containing 1 – 3.0 ml of viral transport media.
- 5. Recommended nerve tissue to collect at necropsy is right and left trigeminal ganglia and sacral dorsal root ganglia.

C. Storage before shipment

- 1. Tissue samples can be stored in the refrigerator (2 – 6.0° C) for up to one week.
- 2. Tissue samples can be stored frozen (-60.0 ° C) indefinitely.

D. Sample Packing and Shipment

- 1. Diagnostic samples are shipped as "Dangerous Goods". They do not need to be shipped as "Infectious Agent". Dangerous goods and dry ice shipping regulations must be followed for any diagnostic sample.

2. Refer to the following web pages for regulated shipping instructions:

- a) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipregs.htm>
- b) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipdir.htm>
- c) <http://www.cdc.gov/od/ohs/pdffiles/who97.pdf>

3. Before packing, ensure that the Submission Form:

- a) is filled out complete and legible;
- b) has a name and phone number(s) of an individual to be contacted in emergencies;

- c) has a purchase order number or other billing information;
- d) is identical to the sample tubes.
- 4. Ship tissue samples with a minimum of 5 pounds dry ice.
- 5. Use extra dry ice for Friday, weekend or holiday shipments.
- 6. Pack carefully to avoid sample breakage and leaks.
- 7. Keep paperwork dry and separate from specimens.
- 8. Contact the National B Virus Resource Laboratory prior to shipping by:
 - a) telephone: 404-651-0808
 - b) fax: 404-651-0814
 - c) email: bvirus@gsu.edu
 - d) emergency pager: 1-888-500-3504
 - e) emergency phone: 404-358-8168
- 9. Ship samples ASAP (priority overnight delivery) via overnight courier to:

The National B Virus Resource Laboratory
 Viral Immunology Center
 Georgia State University
 50 Decatur Street
 Atlanta, Georgia 30303

10. Packages that are shipped on Friday must have both the package and the airbill annotated for “Saturday Delivery”. Do not select the “Next Day Delivery” option. This is considered the next *business* day and the package will not be delivered on Saturday. Federal Express is the recommended courier for weekend delivery. Be sure to contact the B Virus Lab offices prior to shipping on Friday to provide the airbill number for tracking missing packages on the weekend.

E. Please do not:

- 1. ship glass sample tubes;
- 2. place more than one tissue site in each tube;
- 3. ship tissues dry;
- 4. use less than 1.0 or more than 3.0 ml viral transport media;
- 5. ship samples with incomplete labeling;
- 6. label tubes with unnecessary (and confusing) information such as investigator’s name, study numbers, cage numbers, etc;
- 7. allow samples to freeze-thaw before shipping.

IV. Cerebral Spinal Fluid (CSF):

A. Supplies

- 1. A sterile CSF storage and transport tube.
- 2. Lumbar puncture supplies.

B. Collection Procedures

- 1. Use of Universal Precautions is recommended when collecting any biological specimen.
- 2. Properly label the CSF transport sample tube(s) with complete patient or primate identification and the collection date.
- 3. Using acceptable lumbar puncture techniques, collect a 3 – 4.0 ml CSF sample. The CSF sample must be clean. A bloody sample may compromise results. Safety precaution: CSF should never be centrifuged prior to shipping.
- 4. Transfer 3 – 4.0 ml of clean CSF to the storage tube.

C. Storage before shipment

- 1. CSF samples can be stored in the refrigerator (2 – 6.0° C) for up to one week.
- 2. CSF samples can be stored frozen (-60.0 ° C) indefinitely.

D. Sample Packing and Shipment

1. Diagnostic samples are shipped as “Dangerous Goods”. They do not need to be shipped as “Infectious Agent”. Dangerous goods and dry ice shipping regulations must be followed for any diagnostic sample.

2. Refer to the following web pages for regulated shipping instructions:

- a) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipregs.htm>
- b) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipdir.htm>
- c) <http://www.cdc.gov/od/ohs/pdffiles/who97.pdf>

3. Before packing, ensure that the Submission Form:
 - a) is filled out complete and legible;
 - b) has a name and phone number(s) of an individual to be contacted in emergencies;
 - c) has a purchase order number or other billing information;
 - d) is identical to the sample tubes.
 4. Ship CSF samples with a minimum of 5 pounds dry ice.
 5. Use extra dry ice for Friday, weekend or holiday shipments.
 6. Pack carefully to avoid sample breakage and leaks.
 7. Keep paperwork dry and separate from specimens.
 8. Contact the National B Virus Resource Laboratory prior to shipping by:
 - a) telephone: 404-651-0808
 - b) fax: 404-651-0814
 - c) email: bvirus@gsu.edu
 - d) emergency pager: 1-888-500-3504
 - e) emergency phone: 404-358-8168
 9. Ship samples ASAP (priority overnight delivery) via overnight courier to:

The National B Virus Resource Laboratory
 Viral Immunology Center
 Georgia State University
 50 Decatur Street
 Atlanta, Georgia 30303
 10. Packages that are shipped on Friday must have both the package and the airbill annotated for "Saturday Delivery". Do not select the "Next Day Delivery" option. This is considered the next *business* day and the package will not be delivered on Saturday. Federal Express is the recommended courier for weekend delivery. Be sure to contact the B Virus Lab offices prior to shipping on Friday to provide the airbill number for tracking missing packages on the weekend.
- E. Please do not:
1. ship glass sample tubes;
 2. ship samples with incomplete labeling;
 3. label tubes with unnecessary (and confusing) information such as investigator's name, study numbers, cage numbers, etc;
 4. allow samples to freeze-thaw before shipping.
- V. Whole Blood for PCR
- Note: The National B Virus Resource Laboratory does not recommend performing PCR analysis on whole blood samples. B virus is not known to be a blood borne pathogen, and therefore viral DNA is not expected to be found in such samples. One exception has been noted in the literature, from an animal that appeared very ill and viremic. Whole blood PCR analysis might be considered for animals that appear in such an unhealthy condition.
- A. Supplies
1. 5 to 7 ml EDTA or ACD blood collection tubes.
 2. Venipuncture supplies.
 3. 2 ml non-glass serum storage tube.
- B. Collection Procedures
1. Use of Universal Precautions is recommended when collecting any biological specimen.
 2. Properly label a blood collection tube with patient or animal ID and collection date.
 3. Using acceptable venipuncture technique, collect 5 to 7 ml whole blood.
 4. Properly label a 2 ml plastic storage tube with:
 - a) complete patient or animal ID;
 - b) whole blood collection date.
 5. Thoroughly mix whole blood sample and transfer 1.0 – 2.0 ml of whole blood to the storage tube.
- C. Storage before shipment
1. Whole blood samples can be stored in the refrigerator (2 - 6.0° C) for up to one week.
 2. Do not freeze or ship frozen.
- D. Sample Packing and Shipment

1. Diagnostic samples are shipped as “Dangerous Goods”. They do not need to be shipped as “Infectious Agent”. Dangerous goods and dry ice shipping regulations must be followed for any diagnostic sample.
2. Refer to the following web pages for regulated shipping instructions:
 - a) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipregs.htm>
 - b) <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/shipdir.htm>
 - c) <http://www.cdc.gov/od/ohs/pdffiles/who97.pdf>
3. Before packing, ensure that the Submission Form:
 - a) is filled out complete and legible;
 - b) has a name and phone number(s) of an individual to be contacted in emergencies;
 - c) has a purchase order number or other billing information;
 - d) is identical to the sample tubes.
4. Ship whole blood samples with ample cold packs to assure delivery in a cool condition.
5. Use extra cold packs for Friday, weekend or holiday shipments.
6. Pack carefully to avoid sample breakage and leaks.
7. Keep paperwork dry and separate from specimens.
8. Contact The National B Virus Resource Laboratory prior to shipping by:
 - a) telephone: 404-651-0808
 - b) fax: 404-651-0814
 - c) email: bvirus@gsu.edu
 - d) emergency pager: 1-888-500-3504
 - e) emergency phone: 404-358-8168
9. Ship samples ASAP (priority overnight delivery) via overnight courier to:

The National B Virus Resource Laboratory
 Viral Immunology Center
 Georgia State University
 50 Decatur Street
 Atlanta, Georgia 30303
10. Packages that are shipped on Friday must have both the package and the airbill annotated for “Saturday Delivery”. Do not select the “Next Day Delivery” option. This is considered the next *business* day and the package will not be delivered on Saturday. Federal Express is the recommended courier for weekend delivery. Be sure to contact the B Virus Lab offices prior to shipping on Friday to provide the airbill number for tracking missing packages on the weekend.

E. Please do not:

1. ship whole blood in glass;
2. freeze whole blood samples;
3. ship samples with incomplete labeling;
4. label tubes with unnecessary (and confusing) information such as investigator’s name, study numbers, cage numbers, etc.

VI. Tissue Samples for Virus Re-Activation

Virus re-activation from tissue sources requires special procedures not explained in this protocol. If a client inquires about such procedures, refer the client to Dr. Peter Krug, Marty Wildes, or Dr. Julia Hilliard. One of them will advise the client as to proper sample collection, storage and shipment.

FORMS

- A. *Instruction Sheet*, included in the “Client Packet” or available on the web page.
- B. *Mini-SOP*, included in the “Client Packet” or available on the web page.
- C. *Submission Form*, included in the “Client Packet” or available on the web page.
- D. *Case Evaluation*, printed on the back of the test result page.

REFERENCES

- A. HHS. 42 CFR Part 493. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988; Final Rule. Federal Register 57: 7137-7186, 1992. (493.1101-3, 1105)
- B. DHR. Chapter 290-5-29. Rules and Regulations for Licensure of Clinical Laboratories.

Official Code of Georgia Annotated 715-744.10, 1995.

C. Recommendations for Prevention of and Therapy for Exposure to B Virus (*Cercopithecine Herpesvirus 1*). *Clinical Infectious Diseases* 2002; 35. Julia K. Hilliard, Ph.D. Date Laboratory Director

Annexe 6 : Plaquette d'information du CNRS sur le CeHV-1

V

EN BREF

Cette maladie est une zoonose majeure ayant un mode de transmission direct (morsure, griffure, aérosols...).

Les contaminations à partir des primates sont

relativement rares mais lorsqu'elles se produisent les conséquences sont très graves (mortalité, paralysie). La transmission entre primates non humains est très fréquente le dépistage

obligatoire pendant la préquarantaine dans les pays exportateurs (Chine) ainsi que les contrôles réguliers en captivité devraient permettre de limiter le risque pour les utilisateurs.

AGENT

L'agent porte différents noms : *Herpesvirus simiae*, *Herpesvirus simiae*, *Herpesvirus B*, *Virus B*.

Il peut exister une immunité croisée avec l'*Herpesvirus hominis* (HSV).

L'agent est classé dans le groupe 3 par arrêté du 18 juillet 1994.

C'est un virus à ADN bicaténaire linéaire enveloppé. Le virion a une taille de 120 à 200 nm de diamètre, sa nucléocapside est icosaédrique.

Sensibilité

Inactivité par la chaleur (56°C pendant 30 mn) et par l'éther.

Importance

1932 : premier cas de myélite mortelle chez un jeune médecin mordu par un macaque rhésus apparemment normal. L'agent est décrit par Sabin et Wright qui le nomment virus B et qui prouvent que ce virus est distinct de l'herpesvirus humain (B étant l'initiale de la première victime humaine connue. Gay et Holden le nomme W virus (initiale du patient Dr WB).

1949 : un autre cas l'encéphalomyélite chez l'Homme est décrit. Le virus B peut exister à l'état latent chez les macaques.

1954 : on isole le virus dans le système nerveux central d'un singe rhésus (*Macaca mulatta*).

1958 : description des signes cliniques chez le singe rhésus.

Cette zoonose majeure est peu fréquente :

on compte, en 1997, 34 cas ou plus, dont 28 sont effectivement documentés. Sur ces 28 cas, 25 se sont traduits cliniquement par des signes d'encéphalomyélite (ou d'autres signes neurologiques) et 17 ont entraîné la mort. un certain nombre de personnes survivantes gardent des séquelles définitives à type de paralysie. Ces cas sont essentiellement survenus aux USA, et de manière plus anecdotique au Canada et au Royaume-Uni. Aucun cas n'a encore été signalé en Europe continentale à notre connaissance.

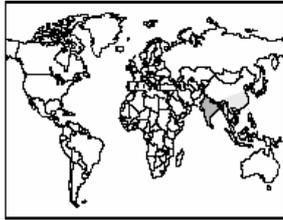
La contagiosité entre primates non humains est très élevée.

Herpès Virus B



macaques

ÉPIDÉMIOLOGIE



- Présente
- Très présente

➔ Répartition géographique

En Inde 73 % de la population posséderait des anticorps antiherpesvirus. D'après Wallack et Boever 25 % à 60 % des macaques sauvages adultes sont séropositifs.

En Asie du sud-est.

➔ Réservoir

Surtout macaques d'Asie du sud-est et de l'Inde : les espèces concernées sont principalement les macaques rhésus et les *cynomolgus*. On n'a pas constaté d'infection naturelle chez les singes du Nouveau monde.

➔ Espèces infectées

L'Homme

- L'infection touche le plus souvent des hommes jeunes manipulant depuis peu de temps des primates, ou des individus immunodéprimés.
- Les hommes vivants depuis longtemps au contact des primates non humains possèdent des sérologies positives.

- La fréquence des cas atténués ou asymptomatiques est inconnue. On peut estimer cependant qu'en raison de la rareté de la maladie et la fréquence de contact avec des primates non humains, ils doivent être nombreux et montrent que l'Homme n'est pas très sensible au virus.

Les primates non humain

- Une étude a montré l'évolution de la séropositivité selon l'âge
- Les animaux âgés de un an ont un pourcentage de séropositivité faible : 51,9 %.
- Les animaux âgés de deux ans ont un pourcentage de séropositivité de 65,4 %.
- Entre sept et quatorze ans, 100 % des animaux sont séropositifs.
- Les espèces sensibles citées dans la littérature sont : macaques (*Macaca mulatta* et *Macaca fascicularis* entre autres), cercopitèques (plus spécialement les vervets), patas, colobes, babouins, chimpanzés. Aucun cas n'a été rapporté chez les orangs-outans ni chez les gibbons.



MALADIE CHEZ L'ANIMAL

Le virus est le plus souvent à l'état latent dans l'organisme. Il y a réactivation et réexcrétion lors de stress (transport), surtout chez les animaux âgés ou chez les juvéniles ayant perdu l'immunité maternelle. Tout animal infecté doit être considéré comme potentiellement contagieux pendant toute sa vie.

Description de la maladie

Chez l'hôte naturel, l'infection est souvent inapparente. Parfois, après une courte période d'incubation qui dure de quelques jours à quelques semaines, on note des lésions herpétiques :

- la plus caractéristique des lésions est la présence de vésicules et d'ulcères sur la peau ou les muqueuses (lèvres, langue, cavité buccale où l'on note des gingivostomatites). Les ulcères de la peau peuvent se recouvrir de fibrine ou de croûtes brunâtres, les vésicules remplies d'un liquide transparent et limpide évoluent en pustules remplies d'un mucopus jaunâtre très virulent. Il y a éclatement et nécrose de ces pustules.

- les lésions de la peau et des muqueuses cicatrisent en 8 à 14 jours sans séquelle.

- dans de rares cas, on peut observer des symptômes nerveux qui suivent des signes généraux (anorexie, conjonctivite, sécrétions nasales mucopurulentes, nécrose cutanée). On a alors des symptômes d'encéphalites avec léthargie, convulsions, hémiplégie, difficultés respiratoires et paralysie ascendante puis coma et mort.

- il existe également des lésions génitales.

Chez les singes *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*), la maladie semble être plus grave que chez les singes rhésus.

Diagnostic

Sur l'animal vivant

- Examen clinique minutieux de la bouche, de la langue et du carrefour pharyngien.
- Isoler le virus : multiplication rapide sur cellule de singe, sur cellule de lapin (apparition au bout de 1 à 3 jours de l'herpesvirus B du type CPE) sur cellule embryonnaire de poulet.

Un lapin infecté présentera des lésions locales typiques.

Sérologie

- Interprétation délicate, test ELISA, complété par un western blot
- Réaction croisée avec *Herpes hominis* mais le titre est inférieur par rapport à une réaction homologue (50% des sérums sont négatifs face à l'antigène *Herpes hominis*).

Sur l'animal mort

Lésions

Histologie des lésions des muqueuses buccale, linguale et œsophagienne et parfois gastrique. On observe une acanthose et une dégénérescence bulleuse des cellules de Malpighi et des acanthocytes accompagnées de cellules géantes.

On observe des inclusions intranucléaires éosinophiles caractéristiques et parfois une nécrose du tube digestif supérieur (gastrite ulcéreuse).

D'autres lésions sont parfois visibles

- Une pneumonie intersticielle lobaire hémorragique lors d'atteinte respiratoire,
- Des foyers de gliose nodulaire lors d'encéphalite.

Traitement

On ne soigne pas l'animal s'il présente des lésions herpétiques. Les animaux malades doivent être euthanasiés.

TRANSMISSION

Sources

Animaux malades (salive, sécrétions génitales).
Animaux infectés latents doivent être considérés comme potentiellement infectieux toute leur vie.
Le virus résiste très peu de temps dans le milieu ambiant.

Modes de transmission

Chez l'animal

Transmission directe

- Transmission vénérienne (le mode le plus important), par morsure et griffure, par aérosol très rares), ne traverse pas la barrière placentaire. Les nouveau-nés sont donc indemnes.

V

Transmission indirecte

- Aliments souillés, matériel : très rare car le virus ne vit pas dans l'environnement.

Chez l'Homme

- L'Homme est un hôte accidentel et *Herpesvirus simiae* ne se transmet normalement pas d'homme à homme (un cas se serait produit).

- L'Homme s'infecte par : morsures, griffures d'un primate non humain, aérosols, verreries cassées, manipulations d'organes infectés ou salive du singe sur des lésions dermatologiques préexistantes.

- D'autres modes de transmission existente.

MALADIE CHEZ L'HOMME

Description de la maladie

L'incubation varie selon les auteurs, de 3 à 4 jours à 5 semaines.

La zone d'inoculation devient hyperhémique, douloureuse, prurigineuse et on observe la formation de vésicules autour de la plaie, associées à une lymphadénopathie régionale et à une légère fièvre.

Par la suite, on peut observer l'apparition d'un syndrome pseudo-grippal avec mal de gorge.

Le patient signale également des paresthésies, fourmillements à partir du site d'exposition avec progression proximale, ainsi qu'une faiblesse musculaire ou une paralysie de l'extrémité exposée. On peut également noter une conjonctivite.

Ensuite, se développe un syndrome méningo-encéphalitique, avec douleurs musculaires, céphalées raideur méningée, vomissements.

L'évolution se fait vers l'ataxie, la paralysie puis la mort par paralysie respiratoire.

L'évolution peut prendre 5 jours à 4 semaines depuis le début des troubles. On observe jusqu'à 80 % de mortalité et chez les survivants, il persiste des séquelles neurologiques graves et permanentes dans 60 % des cas.

Dans les cas de transmission par aérosol, on note, de la toux, un mal de gorge et des troubles respiratoires dominants.

Diagnostic

Isolement du virus

- Sur écouvillon de gorge chez l'Homme et chez l'animal, liquide céphalo-rachidien chez l'Homme.

- En cultures cellulaires (effet cytopathogène en 1 à 3 jours).

- Par inoculation, en SC ou en intra-cérébrale chez le lapin, avec développement de lésions orales, suivies d'une mortalité par méningo-encéphalite en 7 à 21 jours.

- Ou par inoculation à l'œuf embryonné.

Il est réservé aux laboratoires de confinement L3.

Sérologie

La mise en évidence des anticorps est actuellement possible, mais ce test n'est réalisable que dans 5 laboratoires au monde.

Il repose sur des méthodes sérologiques de type immunoenzymatique (ELISA, DIA, Western Blot).

Réaction croisée avec *Herpes hominis*, mais le titre est alors significativement plus faible que dans les anticorps neutralisants peuvent persister 6 mois.

Ce diagnostic sérologique permet de dépister les animaux infectés latents, ne présentant pas de lésions herpétiques.

Traitement :

Un traitement par acyclovir ou gancyclovir semble efficace, néanmoins, celui-ci n'est pas virucide et ne pourra donc pas être interrompu sous peine de reprise évolutive de la maladie. En effet les deux malades actuellement traités, survivants de l'épisode de 1987, présentent de brusques élévations de leurs taux d'anticorps à chaque tentative d'interruption du traitement.

PRÉVENTION CHEZ L'ANIMAL

Chez l'animal

- Les macaques étant pratiquement les seules espèces à l'origine des cas d'herpès B, il convient de surveiller régulièrement leur statut infectieux.

Si cette espèce s'avère indispensable, achat d'animaux garantis séronégatifs issus de préférence d'élevages en colonies closes, dont tous les géniteurs sont garantis séronégatifs.

Les animaux devront ensuite être conservés dans des conditions propres à éviter toute contamination par l'herpès virus B.

- Le dépistage des animaux infectés est obligatoire en période de quarantaine sur toutes les espèces de l'ancien monde, par un examen minutieux et systématique des lèvres, de la bouche, et de la langue, complété par une recherche histologique, sérologique et virologique.

- La quarantaine doit être de huit semaines pour les espèces originaires d'Asie ou d'Afrique qui seront gardées en cage individuelle. Par contre lorsqu'un stress va être imposé à l'animal ou lorsqu'un traitement immunosuppresseur débute, il est vivement recommandé de s'assurer du statut sérologique.

- Tout animal reconnu infecté, porteur sain ou malade doit être sacrifié.

- Tout animal reconnu infecté,

porteur sain ou malade doit être sacrifié.

- Tout animal n'ayant pas été reconnu séronégatif pour l'herpès virus B, doit être considéré comme infecté et manipulé avec précaution.

- On recommande de ne pas mélanger les espèces africaines et asiatiques.

- On peut tenter d'établir des colonies exemptes d'herpès virus B. Il s'agit d'un élevage fondé sur des accouplements intermittents, les géniteurs étant maintenus en cages individuelles. On réduit le ratio nombre de femelles/nombre de mâles pour limiter le risque de contagion. On doit également mener un contrôle strict des géniteurs avant les accouplements (recherche de lésions génitales herpétiformes).

On devra également effectuer un sevrage relativement précoce pour éviter d'éventuelles contaminations mère-enfant après la naissance. On pratiquera des contrôles sérologiques réguliers de l'ensemble de la colonie.

- Les animaux non garantis négatifs pour l'herpès virus B doivent être conservés dans des cages ne présentant pas d'aspérités pouvant blesser le personnel.

- Le personnel travaillant avec les macaques **doit être informé du risque**. Les premiers symptômes de l'infection doivent leur être connus et le personnel doit

connaître la conduite à tenir.

- La mise en place d'une sérothèque est également recommandée.

De même le CDC a édicté des recommandations s'appliquant à l'utilisation de cultures primaires de cellules de reins de singe rhésus.

- Toutes les cellules de ce type doivent être manipulées avec un niveau de sécurité microbiologique de 2 au minimum.

- Toute culture, qui avant une inoculation intentionnelle, présente des lésions cellulaires pouvant être apparentées à un effet cytopathogène, doit être considérée comme contaminée par l'herpès virus B.

- Après manipulation les cellules doivent être autoclavées. S'il existe une raison valable (santé publique) pour laquelle l'agent contaminant doit être isolé, il importe de les manipuler avec un niveau de sécurité microbiologique de type 4 (la législation française impose un niveau de type 3).

- Tout accident de contamination humaine à partir de ces cellules (inoculation, projection muqueuse ou contact avec une plaie cutanée non saine) nécessite une prise en charge identique à celle résultant d'une morsure de primates non humains.

Prévention chez l'homme :
voir au dos de la fiche.

PRÉVENTION CHEZ L'HOMME

Prévention individuelle

- La manipulation des animaux devra se faire de façon à éviter les morsures et les griffures. Elles devront être conduites soit après tranquillisation des sujets (kétamine), soit à l'aide de dispositifs prévenant les contacts directs : fonds de cage mobiles, cages de transfert, système dit P.P.R. (autorisant une manipulation des primates à distance).

- Port de gants anti-morsure (Kevlar) et d'un masque adéquat, de même que de vêtements de travail régulièrement changés et stérilisés. Les avant-bras devront être spécialement protégés.

- Les mesures d'hygiène classiques devront être strictement appliquées : douche après le travail, interdiction de manger, fumer, boire dans les animaleries.

- Stériliser avant destruction tout matériel souillé perforant.

- Lors du nettoyage des cages, on évitera la formation d'aérosols (appareils à haute pression).

- Lors des autopsies, il faut commencer par inspecter la cavité buccale.

Prévention médicale

- Toute morsure de singe devra être traitée avec prudence. Un médecin référent devra être recherché dans la région de chaque laboratoire. Il s'agit d'une personne connaissant bien la maladie et susceptible d'apporter une aide au médecin du travail dans la conduite à tenir.

Le protocole de prévention de l'infection humaine à herpès virus B proposé par le Dr Heid recommande pour les premiers soins sur les lieux de l'accident :

- un lavage immédiat du site d'inoculation à grande eau (robinet, douche) et au savon de Marseille pendant 3 à 5 minutes ; pour les plaies profondes, faire saigner sous le robinet.

- Désinfection par trempage (ou à défaut rinçage) de la plaie pendant une dizaine de minutes avec de l'eau de Javel diluée au 1/10^{ème}.

- En cas de blessures par projection oculaire, remplacer ces soins par un rinçage à l'eau courante pendant 10 à 15 minutes.

- En cas de section distale de

membre, traiter la plaie selon le protocole ci-dessus et appliquer un pansement compressif en cas d'hémorragie. Par ailleurs, recueillir le segment amputé, le rincer à l'eau de Javel diluée au 1/10^{ème}, puis le conserver sur une compresse sèche placée dans un sac plastique lui-même mis dans un 2^{ème} sac contenant de la glace.

- Pour être efficaces, ces procédures doivent être impérativement réalisées dans les 2 à 3 premières minutes suivant l'accident.

- Par la suite, le médecin du travail sera alerté et une consultation sera faite par des médecins référents.

Principales références

- ACHA P.N. et SZYFRES B. : Zoonoses et maladies communes à l'homme et à l'animal - 13^{ème} édition 2001.

- BENET JJ : WWW.vet-alfort.fr - Cours des maladies contagieuses.

- E. PILLY : Maladies infectieuses et tropicales - 19^{ème} édition 2004.



macaques

Annexe 7 : CAT en cas d'accident d'exposition à un macaque

Elaborée en partenariat avec le Pr. Bruno MARCHOU, Professeur d'Université, praticien hospitalier, Service des Maladies infectieuses, CHU. Purpan

En cas de morsure, griffure, projection de fluides biologiques (urine, salive) ou de fèces sur les muqueuses ou une plaie cutanée même superficielle

Le contexte

- Le virus responsable de l'herpès virose B (*Cercopithecine herpesvirus 1*) est un virus inféodé aux macaques asiatiques, très proche du virus *Herpes simplex* humain (mais antigéniquement différent : les anticorps humains anti-herpes simplex ne neutralisent pas le virus simien)
- Toutes les espèces de macaques d'origine asiatique (*Macaca mulatta* = macaque rhésus, *M. fascicularis* = macaque crabier, *M. radiata* = macaque bonnet chinois, *M. fuscata* = macaque japonais, *M. cyclopis* = macaque de Formose, et probablement toutes les espèces de macaque asiatique...) sont susceptibles d'être porteur sain de du CeHV-1. Les seules populations sauvages naturellement indemnes se résument au *Macaca sylvanus* (seul macaque africain que l'on trouve aussi sur le rocher de Gibraltar) et aux macaques crabiers de l'île Maurice. Cependant, les *Macaca sylvanus* et les macaques crabiers de l'île Maurice sont réceptifs au virus B qu'ils peuvent contracter en captivité au contact d'animaux porteurs
- L'homme peut accidentellement se contaminer au contact des macaques porteurs du virus et développer une méningo-encéphalite mortelle.
- Modes de contamination humaine : principalement par griffure ou morsure, même superficielle en raison du tropisme du virus pour les cellules épithéliales de l'épiderme et des muqueuses. Egalement décrits des cas de contamination par voie muqueuse, oculaire (conjonctive) ou cutanée (plaies même superficielles) par des projections de fluides sécrétés (urine, salive, larmes, menstrues...) ou de fèces.
- Etant donné la grande fréquence des macaques porteurs sains du virus et la difficulté d'affirmer par des tests biologiques qu'un animal n'est pas porteur du virus B, on considérera que **tout macaque est potentiellement porteur de l'herpès virus B.**

La maladie humaine :

Comme les herpès simplex humains, le virus présente un tropisme électif pour les cellules épithéliales des muqueuses et de la peau ce qui va se traduire par une maladie locale évoluant vers des vésicules infectieuses pour l'homme. Il faut **éviter que la personne présentant des vésicules ne diffuse le virus à son entourage**. La dangerosité du virus repose sur son tropisme pour le tissu nerveux. Par transport axonal rétrograde au niveau des voies sensitives, le virus gagne le système nerveux central où il induit une méningo-encéphalite spontanément mortelle chez l'homme

Incubation : 2 jours à 5 semaines

Apparition des **premiers signes cliniques** au niveau du site d'inoculation :

congestion, douleur, prurit et développement de **lésions vésiculeuses**.

Développement de la maladie neurologique :

- accompagnée d'un syndrome pseudo-grippal
- débute par des paresthésies et fourmillements locaux parfois associés à une faiblesse musculaire localisée au membre atteint,
- apparition d'un syndrome méningo-encéphalitique d'évolution rapide, qui débute entre trois jours et trois semaines après les premiers signes cliniques, et évolue vers le décès du patient (jusqu'à présent 30 cas mortels rapportés).

Accident d'exposition à un macaque :

morsure, griffure, projection de fluides biologiques (urine, salive) ou de fèces sur les muqueuses ou la conjonctive oculaire ou une plaie cutanée même superficielle



Premiers soins immédiats, dans les premières minutes :

En cas de contamination par voie cutanée : laver au savon puis rincer à l'eau courante, désinfecter la peau à l'eau de Javel diluée au 1/10^{ème} pendant 15 minutes (à défaut désinfecter la peau à la Bétadine, ou au Dakin, ou à la Chlorhexidine) En cas de projection sur les muqueuses ou la conjonctive oculaire, rincer abondamment à l'eau courante, ou mieux si possible sérum physiologique, pendant 15 minutes.

En cas de section distale d'un membre, traiter la plaie et appliquer un pansement compressif. Recueillir le segment amputé, le rincer à l'eau de Javel diluée au 1/10, puis le conserver dans un sac plastique lui-même placé dans la glace



Prévenir immédiatement le

Service des Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Toulouse :
Tél. : 05 61 77 23 17 (soins intensifs)



Toujours déclarer l'accident du travail dans les 48 heures



Un suivi médical sera instauré pour prévenir la transmission de l'herpès virose B et des autres agents infectieux que le macaque peut transmettre à l'homme.

Conduite à tenir chez le macaque agresseur

Immédiatement

- a. Prévenir le vétérinaire sanitaire en charge de l'animal et la DSV du département.
- b. Prélèvement sanguin sur tube sec pour sérologie : effectuer les tests sérologiques (Herpès virose B mais aussi SIV, ...)
- c. Prélèvements pour culture ou PCR au niveau de la bouche, des yeux et de l'appareil génital du singe impliqué
- d. En cas d'euthanasie de l'animal veiller à inspecter minutieusement les territoires cutanés et muqueux oraux, génito-anal ainsi que la conjonctive oculaire. Si ces territoires sont suspects de lésions dues à l'herpès virose B, faire des biopsies et les congeler à -80°C dans le but d'extraire ultérieurement l'ADN afin de mettre en évidence le génome viral par PCR. Prélever également le ganglion du nerf trijumeau ainsi que les ganglions des racines postérieures sacrées. Conserver ces échantillons de tissus nerveux à -80°C pour recherche par PCR du génome viral.

14 – 21 jours post-exposition, si l'animal n'a pas été euthanasié

Prélèvement sanguin sur tube sec pour un nouveau contrôle sérologique.

Conduite à tenir chez les individus exposés au risque :

DANS L'IMMEDIAT

- **Parage de la plaie**, éventuellement exploration chirurgicale
 - Prévention des risques infectieux : voir Fiche « Morsures animales »
 - **Comme toujours** : Rage , Tétanos et Pasteurelles (*P. multocida*, *P. haemolyticae*) mais aussi streptocoques, staphylocoques, *Nesseria*, corynébactéries, entérocoques, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*,...
- **Herpes B : Traitement prophylactique : 100% d'efficacité si <72h Zélitrex®
500 : 1g (=2 cp) x 3 /jour, 14 jours**
- Prélèvement sanguin sur tube sec pour sérologies HSV et Herpès virose B. il existe une forte réaction croisée entre la sérologie herpès virose B et HSV. Il conviendra donc d'effectuer une comparaison entre les résultats obtenus pour le sérum à J0 et J14 afin de chercher une séroconversion herpès virose B.
 - Prélèvement au site d'inoculation après désinfection pour analyse bactériologique + viro.

14 – 21 JOURS POST-EXPOSITION : Prélèvement sang sur tube sec pour sérologies HSV et Herpès virose B

TRAITEMENT CURATIF (dès les premiers signes cliniques au niveau du site d'inoculation avant l'apparition des signes neurologiques) :

- **Ganciclovir 5mg/kg IV 2X/j pendant 14-21j** : le virus de l'herpès virose B est plus sensible au Ganciclovir qu'à l'acyclovir ou
- Acyclovir : 12-15mg/kg IV 3X/j pendant 14-21j, puis
- **Valaciclovir PO à vie**

Documentation:

<http://www.gsu.edu/bvirus>

<http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds81f.html>

[Cohen JI, Davenport DS, Stewart JA, Deitchman S, Hilliard JK, Chapman LE; B Virus Working Group.](#) Recommendations for prevention of and therapy for exposure to B virus (cercopithecine herpesvirus 1).

Clin Infect Dis. 2002 Nov 15;35(10):1191-203. Epub 2002 Oct 17.



HÔPITAL PURPAN
Place du Docteur-Baylac
TSA 40031
31059 Toulouse Cedex 9

Toulouse le 18 août 2005

**SERVICE DES MALADIES INFECTIEUSES
ET TROPICALES**

Pathologie Infectieuse – Pathologie Tropicale

Chef de Service
Professeur B. MARCHOU
Coordonnateur Médical du Pôle
Professeur P. MASSIP

Praticiens hospitaliers
Docteur M. ALVAREZ
Docteur E. BONNET
Docteur L. CUZIN
Docteur S. KHATIBI
Docteur M. OBADIA

Chefs de clinique
Docteur F. BUSATO
Docteur L. PORTE

Médecins attachés
Docteur J. BERNARD
Docteur A. BERRY
Docteur A. BICART-SEE
Docteur N. BOURDONCLE
Docteur J.-P. BRACKMAN
Docteur D. GARIPUY
Docteur E. LABAU
Docteur A. MONTALÈGRE
Docteur J. PECENY
Docteur L. TEMPLIER

**Vaccinations internationales
Conseils aux voyageurs
Centre anti-rabique**

Médecins attachés
Docteur S. DE SAINTIGNON
Docteur S. KHATIBI
Docteur I. MASSIP
Docteur E. PILLET

HÔPITAL DE JOUR
Téléphone : 05 61 77 20 92
Télécopie : 05 61 77 90 10

**HOSPITALISATION
Secrétariat**
Téléphone : 05 61 77 94 82
05 61 77 75 08
05 61 77 91 17
Télécopie : 05 61 77 21 38
UF1 – Téléphone : 05 61 77 23 53
UF2 – Téléphone : 05 61 77 23 16
UF3 – S.I. – Tél. : 05 61 77 23 17

**CONSULTATIONS
Secrétariat**
Téléphone : 05 61 77 95 28
Rendez-Vous : 05 61 77 20 79

VACCINATIONS – CONSEILS
Téléphone : 05 61 77 21 62
05 61 77 24 09
Télécopie : 05 61 77 93 06

C.I.S.I.H.
Praticien hospitalier
Docteur L. CUZIN
Téléphone : 05 61 77 21 50

<http://www.chu-toulouse.fr>

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

Madame, Mademoiselle, Monsieur,
Chers collègues,

Nous souhaitons que la fiche jointe à cette lettre vous aidera à mettre en place, en coordination avec la médecine du travail et toutes les autorités compétentes, les mesures préventives requises par le risque de contamination par le virus Herpès B des macaques.

Nous avons rédigé cette fiche afin de mettre à votre disposition et à celle de l'ensemble de vos collaborateurs tous les renseignements utiles pour la bonne gestion de ce risque.

Nous sommes à votre écoute pour améliorer cette fiche et toutes les mesures qui y sont décrites.

Bien cordialement,

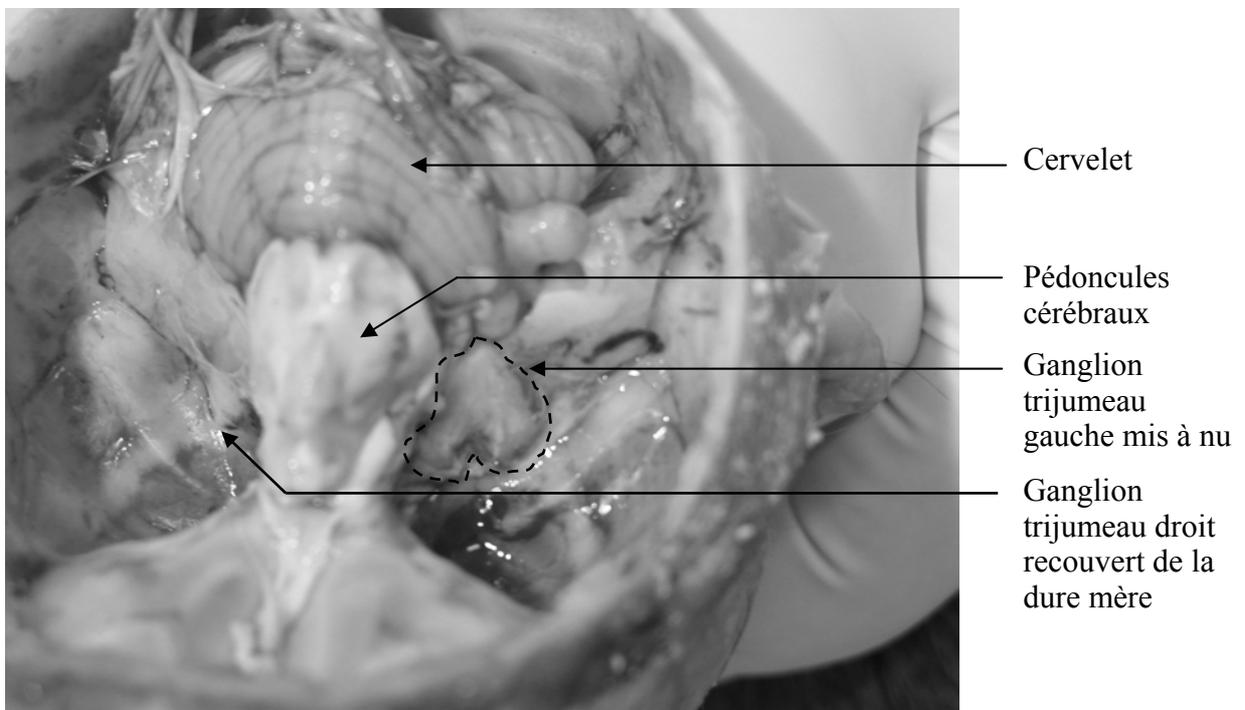
Docteur Bruno Marchou
Professeur de Maladies Infectieuses
Chef de Service des Maladies infectieuses

Docteur Antoine Blancher
Professeur d'immunologie

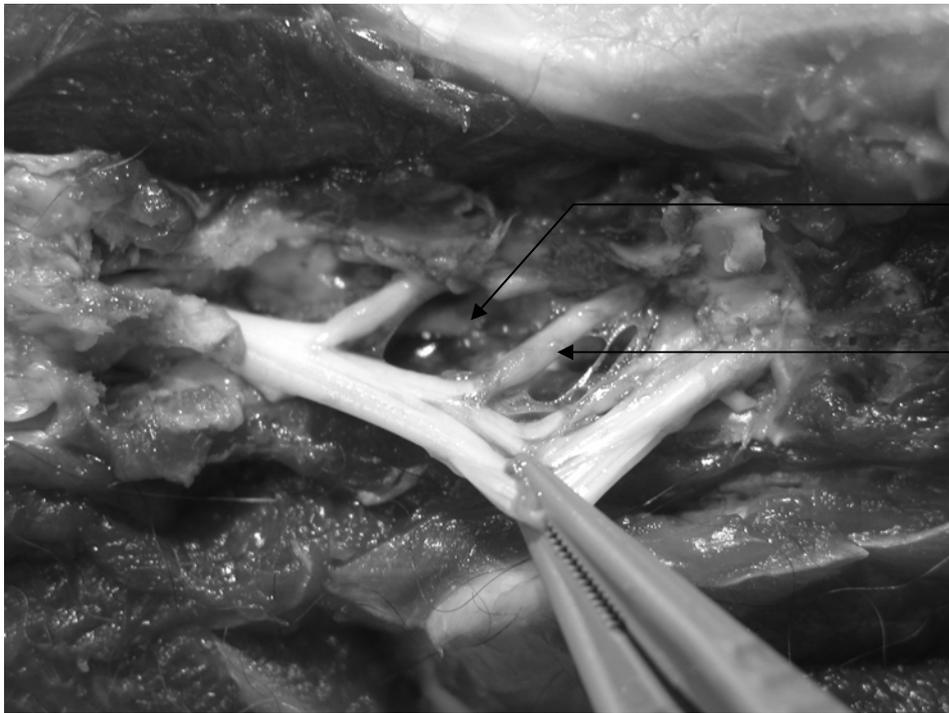
Annexe 8 : Photographies d'autopsie de macaques séropositifs



Photographie de la bouche d'un macaque séropositif autopsié. On peut noter l'absence de lésion macroscopique typique de l'infection par le CeHV-1 (ulcères, vésicules...)



Photographie vue du dessus du crâne d'un macaque séropositif autopsié après craniotomie basse et exérèse de l'encéphale. Suite à cette exérèse, le cervelet devient visible. Les ganglions trijumeaux sont également visibles à travers la dure mère.



Canal
rachidien

Ganglion de
racine
postérieur

Photographie du canal rachidien lombosacré d'un macaque séropositif autopsié. Les lames postérieures des vertèbres lombosacrées ont été enlevées, laissant ainsi apparaître la moelle spinale. On observe, sortant de la moelle spinale, les racines postérieures des nerfs lombosacrés. Immédiatement à la sortie de la moelle spinale, on trouve un renflement de couleur légèrement grisée correspondant aux ganglions des racines postérieures.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSEN, E.

B virus--the risks in monkey business.
Aaohn J, 2005, **53**, 9, 385-7.

ANDERSON, D. C., R. B. SWENSON, J. L. ORKIN, *et al.*

Primary Herpesvirus simiae (B-virus) infection in infant macaques.
Lab Anim Sci, 1994, **44**, 5, 526-30.

ANDRADE, M. R., J. YEE, P. BARRY, *et al.*

Prevalence of antibodies to selected viruses in a long-term closed breeding colony of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in Brazil.
Am J Primatol, 2003, **59**, 3, 123-8.

ARRIBAS, J. R., G. A. STORCH, D. B. CLIFFORD, *et al.*

Cytomegalovirus encephalitis.
Ann Intern Med, 1996, **125**, 7, 577-87.

ARTENSTEIN, A. W., C. B. HICKS, B. S. GOODWIN, JR., *et al.*

Human infection with B virus following a needlestick injury.
Rev Infect Dis, 1991, **13**, 2, 288-91.

BAKER, C. C., H. P. LAMBERT and M. H. WANSBROUGH-JONES

Postexposure immunoprophylaxis against B virus infection.
Br Med J (Clin Res Ed), 1982, **285**, 6351, 1350-1.

BENNETT, A. M., M. J. SLOMKA, D. W. BROWN, *et al.*

Protection against herpes B virus infection in rabbits with a recombinant vaccinia virus expressing glycoprotein D.
J Med Virol, 1999, **57**, 1, 47-56.

BENSON, P. M., S. L. MALANE, R. BANKS, *et al.*

B virus (*Herpesvirus simiae*) and human infection.
Arch Dermatol, 1989, **125**, 9, 1247-8.

BOULTER, E. A., B. THORNTON, D. J. BAUER, *et al.*

Successful treatment of experimental B virus (*Herpesvirus simiae*) infection with acyclovir.
Br Med J, 1980, **280**, 6215, 681-3.

BREEN, G. E., LAMB, S. G.

Monkey bite encephalomyelitis: report of a case with recovery.
Br Med J, 1958, **2**, 22-23.

BRYAN, B. L., C. D. ESPANA, R. W. EMMONS, *et al.*

Recovery from encephalomyelitis caused by *Herpesvirus simiae*. Report of a case.
Arch Intern Med, 1975, **135**, 6, 868-70.

CALVAS, P., P. APOIL, F. FORTENFANT, *et al.*

Characterization of the three immunoglobulin G subclasses of macaques.
Scand J Immunol, 1999, **49**, 6, 595-610.

CARLSON, C. S., M. G. O'SULLIVAN, M. J. JAYO, *et al.*

Fatal disseminated cercopithecine herpesvirus 1 (herpes B infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)).

Vet Pathol, 1997, **34**, 5, 405-14.

CARTIER, A., T. KOMAI and M. G. MASUCCI

The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad.

Exp Cell Res, 2003, **291**, 1, 242-50.

CHANG, Y. E., L. MENOTTI, F. FILATOV, *et al.*

UL27.5 is a novel gamma2 gene antisense to the herpes simplex virus 1 gene encoding glycoprotein B.

J Virol, 1998, **72**, 7, 6056-64.

CHAPPELL, W. S.

Animal infectivity of aerosols of monkey B virus.

Ann NY Acad Sci, 1960, **85**, 931-934.

CHELLMAN, G. J., V. S. LUKAS, E. M. EUGUI, *et al.*

Activation of B virus (*Herpesvirus simiae*) in chronically immunosuppressed cynomolgus monkeys.

Lab Anim Sci, 1992, **42**, 2, 146-51.

CHOU, J., J. J. CHEN, M. GROSS, *et al.*

Association of a M(r) 90,000 phosphoprotein with protein kinase PKR in cells exhibiting enhanced phosphorylation of translation initiation factor eIF-2 alpha and premature shutoff of protein synthesis after infection with gamma 134.5- mutants of herpes simplex virus 1.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, **92**, 23, 10516-20.

CHOU, J., E. R. KERN, R. J. WHITLEY, *et al.*

Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture.

Science, 1990, **250**, 4985, 1262-6.

CHOU, J. and B. ROIZMAN

The herpes simplex virus 1 gene for ICP34.5, which maps in inverted repeats, is conserved in several limited-passage isolates but not in strain 17syn+.

J Virol, 1990, **64**, 3, 1014-20.

CHOU, J. and B. ROIZMAN

The gamma 1(34.5) gene of herpes simplex virus 1 precludes neuroblastoma cells from triggering total shutoff of protein synthesis characteristic of programmed cell death in neuronal cells.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, **89**, 8, 3266-70.

CHOU, J. and B. ROIZMAN

Herpes simplex virus 1 gamma(1)34.5 gene function, which blocks the host response to infection, maps in the homologous domain of the genes expressed during growth arrest and DNA damage.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, **91**, 12, 5247-51.

COHEN, J. I., D. S. DAVENPORT, J. A. STEWART, *et al.*

Recommendations for prevention of and therapy for exposure to B virus (cercopithecine herpesvirus 1).

Clin Infect Dis, 2002, **35**, 10, 1191-203.

COLE, A. M., T. HONG, L. M. BOO, T. NGUYEN, C. ZHAO, G. BRISTOL, J. A. ZACK, A.

- J. WARING, O. O. YANG, AND R. I. LEHRER
Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, **99**, 1813.
- COLE, A. M., T. HONG, L. M. BOO, *et al.*
Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, **99**, 4, 1813-8.
- COULIBALY, C., R. HACK, J. SEIDL, *et al.*
A natural asymptomatic herpes B virus infection in a colony of laboratory brown capuchin monkeys (*Cebus apella*).
Lab Anim, 2004, **38**, 4, 432-8.
- DANIEL, M. D., F. G. GARCIA, L. V. MELENDEZ, *et al.*
Multiple Herpesvirus simiae isolation from a rhesus monkey which died of cerebral infarction.
Lab Anim Sci, 1975, **25**, 3, 303-8.
- DAVENPORT, D. S., D. R. JOHNSON, G. P. HOLMES, *et al.*
Diagnosis and management of human B virus (*Herpesvirus simiae*) infections in Michigan.
Clin Infect Dis, 1994, **19**, 1, 33-41.
- DAVIDSON, W. L. A. K. H.
B virus infection in man.
Ann NY Acad Sci, 1960, **85**, 970-979.
- DENES, E. and S. RANGER-ROGEZ
Main adult herpes virus infections of the CNS.
Expert Rev Anti Infect Ther, 2005, **3**, 4, 663-78.
- DOXIADIS, G. G., N. OTTING, N. G. DE GROOT, *et al.*
Evolutionary stability of MHC class II haplotypes in diverse rhesus macaque populations.
Immunogenetics, 2003, **55**, 8, 540-51.
- EBERLE, R.
Evidence for an alpha-herpesvirus indigenous to mountain gorillas.
J Med Primatol., 1992, **21**, 5, 246-51.
- EBERLE, R., D. H. BLACK, S. LIPPER, ET AL.
Herpesvirus papio 2, an SA8-like alpha-herpesvirus of baboons.
Arch Virol, 1995, **140**, 3, 529-45.
- EBERLE, R. and J. K. HILLIARD
Serological evidence for variation in the incidence of herpesvirus infections in different species of apes.
J Clin Microbiol, 1989, **27**, 6, 1357-66.
- EICHBERG, J. W., R. L. HEBERLING, J. E. GUAJARDO, *et al.*
Detection of primate herpesvirus antibodies including *Herpesvirus simiae* by enzyme immunoassay.
Dev Biol Stand, 1980, **45**, 61-6.
- EMMONS, R. W. and E. H. LENNETTE
Natural herpesvirus hominis infection of a gibbon (*Hylobates lar*).

Arch Gesamte Virusforsch, 1970, **31**, 3, 215-8.

ENDO, M., KAMIMURA, T.

Etude du virus B au Japon. Le premier isolement du virus B au Japon.

Jpn J Exp Med, 1959, **30**, 385-392.

ENGEL, G. A., L. JONES-ENGEL, M. A. SCHILLACI, *et al.*

Human exposure to herpesvirus B-seropositive macaques, Bali, Indonesia.

Emerg Infect Dis, 2002, **8**, 8, 789-95.

ERLICH, K. S., J. MILLS, P. CHATIS, *et al.*

Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome.

N Engl J Med, 1989, **320**, 5, 293-6.

FIERER, J., P. BAZELY and A. I. BRAUDE

Herpes B virus encephalomyelitis presenting as ophthalmic zoster. A possible latent infection reactivated.

Ann Intern Med, 1973, **79**, 2, 225-8.

FREIFELD, A. G., J. HILLIARD, J. SOUTHERS, *et al.*

A controlled seroprevalence survey of primate handlers for evidence of asymptomatic herpes B virus infection.

J Infect Dis, 1995, **171**, 4, 1031-4.

GANZ, T.

Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity.

Nat Rev Immunol, 2003, **3**, 9, 710-20.

GARNER, J. A.

Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells.

Adv Drug Deliv Rev, 2003, **55**, 11, 1497-513.

GARY, G. W., JR. and E. L. PALMER

Comparative complement fixation and serum neutralization antibody titers to herpes simplex virus type 1 and Herpesvirus simiae in *Macaca mulatta* and humans.

J Clin Microbiol, 1977, **5**, 4, 465-70.

GASKELL, R. M. and R. C. POVEY

Transmission of feline viral rhinotracheitis.

Vet Rec, 1982, **111**, 16, 359-62.

GOSZTONYI, G., D. FALKE and H. LUDWIG

Axonal and transsynaptic (transneuronal) spread of Herpesvirus simiae (B virus) in experimentally infected mice.

Histol Histopathol, 1992, **7**, 1, 63-74.

GOSZTONYI, G., D. FALKE and H. LUDWIG

Axonal-transsynaptic spread as the basic pathogenetic mechanism in B virus infection of the nervous system.

J Med Primatol, 1992, **21**, 1, 42-3.

HE, B., M. GROSS and B. ROIZMAN

The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and

preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, **94**, 3, 843-8.

HELDSTAB, A., D. RUEDI, W. SONNABEND, *et al.*
Spontaneous generalized Herpesvirus hominis infection of a lowland gorilla (Gorilla gorilla gorilla).
J Med Primatol, 1981, **10**, 2-3, 129-35.

HILLIARD, J. K., D. BLACK and R. EBERLE
Simian alphaherpesviruses and their relation to the human herpes simplex viruses.
Arch Virol, 1989, **109**, 1-2, 83-102.

HILLIARD, J. K., D. BLACK and R. EBERLE
Simian alphaherpesviruses and their relation to the human herpes simplex viruses.
Arch Virol, 1989, **109**, 1-2, 83-102.

HILLIARD, J. K. and J. A. WARD
B-virus specific-pathogen-free breeding colonies of macaques (*Macaca mulatta*): retrospective study of seven years of testing.
Lab Anim Sci, 1999, **49**, 2, 144-8.

HILLIARD, J. K. and B. J. WEIGLER
The existence of differing monkey B virus genotypes with possible implications for degree of virulence in humans.
Lab Anim Sci, 1999, **49**, 1, 10-1.

HIRANO, M., S. NAKAMURA, F. MITSUNAGA, *et al.*
Efficacy of a B virus gD DNA vaccine for induction of humoral and cellular immune responses in Japanese macaques.
Vaccine, 2002, **20**, 19-20, 2523-32.

HIRANO, M., S. NAKAMURA, F. MITSUNAGA, *et al.*
One-step PCR to distinguish B virus from related primate alphaherpesviruses.
Clin Diagn Lab Immunol, 2002, **9**, 3, 716-9.

HIRANO, M., S. NAKAMURA, M. OKADA, *et al.*
Rapid discrimination of monkey B virus from human herpes simplex viruses by PCR in the presence of betaine.
J Clin Microbiol, 2000, **38**, 3, 1255-7.

HOCHREIN, H., B. SCHLATTER, M. O'KEEFFE, *et al.*
Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, **101**, 31, 11416-21.

HOLMES, G. P., L. E. CHAPMAN, J. A. STEWART, *et al.*
Guidelines for the prevention and treatment of B-virus infections in exposed persons. The B virus Working Group.
Clin Infect Dis, 1995, **20**, 2, 421-39.

HOLMES, G. P., J. K. HILLIARD, K. C. KLONTZ, *et al.*
B virus (*Herpesvirus simiae*) infection in humans: epidemiologic investigation of a cluster.
Ann Intern Med, 1990, **112**, 11, 833-9.

HUFF, J. L., R. EBERLE, J. CAPITANIO, *et al.*

Differential detection of B virus and rhesus cytomegalovirus in rhesus macaques.
J Gen Virol, 2003, **84**, Pt 1, 83-92.

HUMMELER, K., W. L. DAVIDSON, W. HENLE, *et al.*
Encephalomyelitis due to infection with Herpesvirus simiae (herpes B virus); a report of two fatal, laboratory-acquired cases.
N Engl J Med, 1959, **261**, 2, 64-8.

HURST, E. W.
Studies in pseudorabies (infection bulbar paralysis, mad itch).
J Exp Med, 1936, **63**, 449 - 463.

JENSEN, K., F. ALVARADO-RAMY, J. GONZALEZ-MARTINEZ, *et al.*
B-virus and free-ranging macaques, Puerto Rico.
Emerg Infect Dis, 2004, **10**, 3, 494-6.

JONES, C.
Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency.
Clin Microbiol Rev, 2003, **16**, 1, 79-95.

KALTER, S. S., R. HUTT, J. E. GUAJARDO, *et al.*
Serodiagnosis of herpesvirus infection in primates.
Dev Biol Stand, 1978, **41**, 235-40.

KATZ, D., J. K. HILLIARD, R. EBERLE, *et al.*
ELISA for detection of group-common and virus-specific antibodies in human and simian sera induced by herpes simplex and related simian viruses.
J Virol Methods, 1986, **14**, 2, 99-109.

KATZ, D., W. SHI, P. W. KRUG, *et al.*
Antibody cross-reactivity of alphaherpesviruses as mirrored in naturally infected primates.
Arch Virol, 2002, **147**, 5, 929-41.

KATZ, D., W. SHI, P. W. KRUG, *et al.*
Alphaherpesvirus antigen quantitation to optimize the diagnosis of herpes B virus infection.
J Virol Methods, 2002, **103**, 1, 15-25.

KEEBLE, S. A.
B virus infection in monkeys.
Ann N Y Acad Sci, 1960, **85**, 960-9.

KEEBLE, S. A., G. J. CHRISTOFINIS and W. WOOD
Natural virus-B infection in rhesus monkeys.
J Pathol Bacteriol, 1958, **76**, 1, 189-99.

KEMP, G. E., G. L. LOSOS, O. R. CAUSEY, *et al.*
Isolation of Herpesvirus hominis from Lemurs: a naturally occurring epizootic at a zoological garden in Nigeria.
Afr J Med Sci, 1972, **3**, 3, 177-85.

KESSLER, M. J. and J. K. HILLIARD
Seroprevalence of B virus (Herpesvirus simiae) antibodies in a naturally formed group of rhesus macaques.
J Med Primatol, 1990, **19**, 2, 155-60.

- KHANNA, K. M., A. J. LEPISTO, V. DECMAN, *et al.*
Immune control of herpes simplex virus during latency.
Curr Opin Immunol, 2004, **16**, 4, 463-9.
- KOELLE, D. M., Z. LIU, C. L. MCCLURKAN, *et al.*
Immunodominance among herpes simplex virus-specific CD8 T cells expressing a tissue-specific homing receptor.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, **100**, 22, 12899-904.
- KONDO, R., S. HORAI, Y. SATTA, *et al.*
Evolution of hominoid mitochondrial DNA with special reference to the silent substitution rate over the genome.
J Mol Evol, 1993, **36**, 6, 517-31.
- KRECH, U. and L. LEWIS
Propagation of B-virus in tissue cultures.
Proc Soc Exp Biol Med., 1954, **87**, 1, 174-8.
- KURT-JONES, E. A., M. CHAN, S. ZHOU, *et al.*
Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, **101**, 5, 1315-20.
- LANDOLFI, J. A., J. E. WELLEHAN, A. J. JOHNSON, *et al.*
Fatal human herpesvirus type 1 infection in a white-handed gibbon (*Hylobates lar*).
J Vet Diagn Invest, 2005, **17**, 4, 369-71.
- LAURENT, R.
Herpès.
EMC-Médecine 2005, **2**, 265-275.
- LAWLER, S. H., R. W. SUSSMAN and L. L. TAYLOR
Mitochondrial DNA of the Mauritian macaques (*Macaca fascicularis*): an example of the founder effect.
Am J Phys Anthropol, 1995, **96**, 2, 133-41.
- LEES, D. N., A. BASKERVILLE, L. M. CROPPER, *et al.*
Herpesvirus simiae (B virus) antibody response and virus shedding in experimental primary infection of cynomolgus monkeys.
Lab Anim Sci, 1991, **41**, 4, 360-4.
- LEIB, D. A., M. A. MACHALEK, B. R. WILLIAMS, *et al.*
Specific phenotypic restoration of an attenuated virus by knockout of a host resistance gene.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, **97**, 11, 6097-101.
- LEONOVA, L., V. N. KOKRYAKOV, G. ALESHINA, T. HONG, T. NGUYEN, C. ZHAO, A. J. WARING, AND R. I. LEHRER
Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity.
J. Leukocyte Biol. , 2001, **70**, 461.
- LEONOVA, L., V. N. KOKRYAKOV, G. ALESHINA, *et al.*
Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity.
J Leukoc Biol, 2001, **70**, 3, 461-4.
- LOIACONO, C. M., N. S. TAUS and W. J. MITCHELL
The herpes simplex virus type 1 ICP0 promoter is activated by viral reactivation stimuli in

- trigeminal ganglia neurons of transgenic mice.
J Neurovirol, 2003, **9**, 3, 336-45.
- LOOMIS, M. R., T. O'NEILL, M. BUSH, *et al.*
Fatal herpesvirus infection in patas monkeys and a black and white colobus monkey.
J Am Vet Med Assoc, 1981, **179**, 11, 1236-9.
- LOOMIS-HUFF, J. E., R. EBERLE, K. M. LOCKRIDGE, *et al.*
Immunogenicity of a DNA vaccine against herpes B virus in mice and rhesus macaques.
Vaccine, 2001, **19**, 32, 4865-73.
- LOVE, F. M. and E. JUNGHERR
Occupational infection with viurs B of monkeys.
J A M A, 1962, **179**, 10, 160-162.
- LUBINSKI, J. M., M. JIANG, L. HOOK, *et al.*
Herpes simplex virus type 1 evades the effects of antibody and complement in vivo.
J Virol, 2002, **76**, 18, 9232-41.
- LUEBCKE, E., E. DUBOVI, D. BLACK, *et al.*
Isolation and characterization of a chimpanzee alphaherpesvirus.
J Gen Virol, 2006, **87**, Pt 1, 11-9.
- LUND, J., A. SATO, S. AKIRA, *et al.*
Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells.
J Exp Med, 2003, **198**, 3, 513-20.
- MCCLURE, H. M., M. E. KEELING, B. OLBERDING, *et al.*
Natural Herpesvirus hominis infection of tree shrews (*Tupaia glis*).
Lab Anim Sci, 1972, **22**, 4, 517-21.
- MCCLURE, H. M., B. OLBERDING and L. M. STROZIER
Disseminated herpesvirus infection in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*).
J Med Primatol, 1973, **2**, 3, 190-4.
- MCCLURE, H. M., R. B. SWENSON, S. S. KALTER, *et al.*
Natural genital herpesvirus hominis infection in chimpanzees (*Pan troglodytes* and *Pan paniscus*).
Lab Anim Sci, 1980, **30**, 5, 895-901.
- MCGEOCH, D. J.
The genomes of the human herpesviruses: contents, relationships, and evolution.
Annu Rev Microbiol, 1989, **43**, 235-65.
- MCGEOCH, D. J., R. E. RANDALL and R. M. ELLIOTT
Some highlights of virus research in 1991.
J Gen Virol, 1992, **73** (Pt 10), 2487-501.
- MELNICK, J. L. A. B., D. D.
Isolation of B virus (herpes group) from the central nervous system of a rhesus monkey.
J Exp Med, 1954, **100**, 181-194.
- MIRANDA, M. B., M. HANDERMANN and G. DARAI
DNA polymerase gene locus of Cercopithecine herpesvirus 1 is a suitable target for specific

and rapid identification of viral infection by PCR technology
Virus Genes, 200, **530**, 3, 307–322,

MMWR

Guidelines for prevention of Herpesvirus simiae (B virus) infection in monkey handlers.
MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1987, **36**, 41, 680-2, 687-9.

MMWR

Fatal Cercopithecine herpesvirus 1 (B virus) infection following a mucocutaneous exposure and interim recommendations for worker protection.
MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1998, **47**, 49, 1073-6, 1083.

MORRISON, L. A.

The Toll of herpes simplex virus infection.
Trends Microbiol, 2004, **12**, 8, 353-6.

MUNK, C., G. WEI, O. O. YANG, *et al.*

The theta-defensin, retrocyclin, inhibits HIV-1 entry.
AIDS Res Hum Retroviruses, 2003, **19**, 10, 875-81.

NGUYEN, C. and R. G. LALONDE

Risk of occupational exposure to Herpesvirus simiae (B virus) in Quebec.
Cmaj, 1990, **143**, 11, 1203-6.

NGUYEN, T. X., A. M. COLE, AND R. I. LEHRER

Evolution of primate t-defensins: a serpentine path to a sweet tooth.
Peptides, 2003, **24**, 1647.

NORCOTT, J. P. and D. W. BROWN

Competitive radioimmunoassay to detect antibodies to herpes B virus and SA8 virus.
J Clin Microbiol, 1993, **31**, 4, 931-5.

OHSAWA, K., T. W. LEHENBAUER and R. EBERLE

Herpesvirus papio 2: alternative antigen for use in monkey B virus diagnostic assays.
Lab Anim Sci, 1999, **49**, 6, 605-16.

OLSON, L. C., W. H. PRYOR, JR. and J. M. THOMAS

Persistent reduction of B virus (Herpesvirus simiae) seropositivity in rhesus macaques acquired for a study of renal allograft tolerance.
Lab Anim Sci, 1991, **41**, 6, 540-4.

PALMER, A. E.

B virus, Herpesvirus simiae: historical perspective.
J Med Primatol, 1987, **16**, 2, 99-130.

PERELYGINA, L., I. PATRUSHEVA, S. HOMBALIAH, *et al.*

Production of herpes B virus recombinant glycoproteins and evaluation of their diagnostic potential.
J Clin Microbiol, 2005, **43**, 2, 620-8.

PERELYGINA, L., I. PATRUSHEVA, N. MANES, *et al.*

Quantitative real-time PCR for detection of monkey B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) in clinical samples.
J Virol Methods, 2003, **109**, 2, 245-51.

- PERELYGINA, L., L. ZHU, H. ZURKUHLLEN, *et al.*
Complete sequence and comparative analysis of the genome of herpes B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) from a rhesus monkey.
J Virol, 2003, **77**, 11, 6167-77.
- RAMSAY, E., E. L. STAIR, A. E. CASTRO, *et al.*
Fatal Herpesvirus hominis encephalitis in a white-handed gibbon.
J Am Vet Med Assoc, 1982, **181**, 11, 1429-30.
- RANDALL, G. and B. ROIZMAN
Transcription of the derepressed open reading frame P of herpes simplex virus 1 precludes the expression of the antisense gamma(1)34.5 gene and may account for the attenuation of the mutant virus.
J Virol, 1997, **71**, 10, 7750-7.
- RESSIG, M. A. M., J. L.
The cellular changes produced in tissue culture by herpes B virus correlated with concurrent multiplication of the virus.
J Exp Med, 1955, **101**, 341-351.
- ROIZMAN, B. AND P. E. PELLET
The Family *Herpesviridae*: A Brief Introduction.
In: KNIPE, D.M., and HOWLEY, P.M. *Fields Virology*, 4th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams et Wilkins, 2001. 2381-2398.
- ROZENBERG, F.
[Herpes simplex virus infection: host-virus interaction].
Pathol Biol (Paris), 2002, **50**, 7, 414-8.
- SABIN, A. B.
Fatal B virus encephalomyelitis in a physician working with monkeys.
J Clin Invest, 1949, **28**, 808.
- SABIN, A. B. A. W., W. M.
Acute ascending myelitis following a monkey bite, with isolation of a virus capable of reproducing the disease.
J Exp Med, 1934, **59**, 115-136.
- SAKULWIRA, K., A. THEAMBOONLERS, P. CHAROONRUT, *et al.*
Serological evidence of herpesvirus infection in gibbons.
BMC Microbiol, 2002, **2**, 11.
- SATO, H., J. ARIKAWA, M. FURUYA, *et al.*
Prevalence of herpes B virus antibody in nonhuman primates reared at the National University of Japan.
Exp Anim, 1998, **47**, 3, 199-202.
- SCHRENZEL, M. D., K. G. OSBORN, A. SHIMA, *et al.*
Naturally occurring fatal herpes simplex virus 1 infection in a family of white-faced saki monkeys (*Pithecia pithecia pithecia*).
J Med Primatol, 2003, **32**, 1, 7-14.
- SCINICARIELLO, F., R. EBERLE and J. K. HILLIARD
Rapid detection of B virus (herpesvirus simiae) DNA by polymerase chain reaction.
J Infect Dis, 1993, **168**, 3, 747-50.

- SCINICARIELLO, F., C. N. ENGLEMAN, L. JAYASHANKAR, *et al.*
Rhesus macaque antibody molecules: sequences and heterogeneity of alpha and gamma constant regions.
Immunology, 2004, **111**, 1, 66-74.
- SCINICARIELLO, F., W. J. ENGLISH and J. HILLIARD
Identification by PCR of meningitis caused by herpes B virus.
Lancet, 1993, **341**, 8861, 1660-1.
- SIMON, M. A., M. D. DANIEL, D. LEE-PARRITZ, *et al.*
Disseminated B virus infection in a cynomolgus monkey.
Lab Anim Sci, 1993, **43**, 6, 545-50.
- SKINNER, G. R., A. BUCHAN, D. WILLIAMS, *et al.*
Immunogenicity and protective efficacy in a rhesus monkey model of vaccine Ac NFUi(S-) MRC against primary type 2 herpes simplex virus infection.
Br J Exp Pathol, 1982, **63**, 4, 378-87.
- SMITH, A. L., D. H. BLACK and R. EBERLE
Molecular evidence for distinct genotypes of monkey B virus (herpesvirus simiae) which are related to the macaque host species.
J Virol, 1998, **72**, 11, 9224-32.
- SODORA, D. L., G. H. COHEN and R. J. EISENBERG
Influence of asparagine-linked oligosaccharides on antigenicity, processing, and cell surface expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D.
J Virol, 1989, **63**, 12, 5184-93.
- SPEAR, P. G. and R. LONGNECKER
Herpesvirus entry: an update.
J Virol, 2003, **77**, 19, 10179-85.
- TAHA, M. Y., G. B. CLEMENTS and S. M. BROWN
A variant of herpes simplex virus type 2 strain HG52 with a 1.5 kb deletion in RL between 0 to 0.02 and 0.81 to 0.83 map units is non-neurovirulent for mice.
J Gen Virol, 1989, **70** (Pt 3), 705-16.
- TAKANO, J., T. NARITA, K. FUJIMOTO, *et al.*
Detection of B virus infection in cynomolgus monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen.
Exp Anim, 2001, **50**, 4, 345-7.
- TANG, Y. Q., J. YUAN, G. OSAPAY, K. OSAPAY, D. TRAN, C. J. MILLER, A. J. OUELLETTE, AND M. E. SELSTED
A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins.
Science, 1999, **286**, 498.
- TANG, Y. Q., J. YUAN, G. OSAPAY, *et al.*
A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins.
Science, 1999, **286**, 5439, 498-502.
- THOMPSON, R. L., S. K. ROGERS and M. A. ZERHUSEN
Herpes simplex virus neurovirulence and productive infection of neural cells is associated with

a function which maps between 0.82 and 0.832 map units on the HSV genome.
Virology, 1989, **172**, 2, 435-50.

THOMPSON, S. A., J. K. HILLIARD, D. KITTEL, *et al.*
Retrospective analysis of an outbreak of B virus infection in a colony of DeBrazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*).
Comp Med, 2000, **50**, 6, 649-57.

TIWARI, V., C. D. O'DONNELL, M. J. OH, *et al.*
A role for 3-O-sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread.
Biochem Biophys Res Commun, 2005, **338**, 2, 930-7.

TYLER, S. D., G. A. PETERS and A. SEVERINI
Complete genome sequence of cercopithecine herpesvirus 2 (SA8) and comparison with other simplexviruses.
Virology, 2005, **331**, 2, 429-40.

TYLER, S. D. and A. SEVERINI
The complete genome sequence of herpesvirus papio 2 (Cercopithecine herpesvirus 16) shows evidence of recombination events among various progenitor herpesviruses.
J Virol, 2006, **80**, 3, 1214-21.

VAN HOOSIER, G. L., JR. and J. L. MELNICK
Neutralizing antibodies in human sera to Herpesvirus simiae (B virus).
Tex Rep Biol Med, 1961, **19**, 376-80.

VEIT, M., E. PONIMASKIN, S. BAIBORODIN, *et al.*
Intracellular compartmentalization of the glycoprotein B of herpesvirus Simian agent 8 expressed with a baculovirus vector in insect cells.
Arch Virol, 1996, **141**, 10, 2009-17.

VEIT, M., C. SOTT, K. BORCHERS, *et al.*
Structure, function, and intracellular localization of glycoprotein B of herpesvirus simian agent 8 expressed in insect and mammalian cells.
Arch Virol, 1993, **133**, 3-4, 335-47.

VIZOSO, A. D.
Latency of Herpes Simiae (B virus) in rabbits.
Br J Exp Pathol, 1975, **56**, 6, 489-94.

VIZOSO, A. D.
Recovery of herpes simiae (B virus) from both primary and latent infections in rhesus monkeys.
Br J Exp Pathol, 1975, **56**, 6, 485-8.

WAKIMOTO, H., P. R. JOHNSON, D. M. KNIPE, *et al.*
Effects of innate immunity on herpes simplex virus and its ability to kill tumor cells.
Gene Ther, 2003, **10**, 11, 983-90.

WALL, L. V., H. T. ZWARTOUW and D. C. KELLY
Discrimination between twenty isolates of herpesvirus simiae (B virus) by restriction enzyme analysis of the viral genome.
Virus Res, 1989, **12**, 3, 283-96.

WARD, P. L., D. E. BARKER and B. ROIZMAN

A novel herpes simplex virus 1 gene, UL43.5, maps antisense to the UL43 gene and encodes a protein which colocalizes in nuclear structures with capsid proteins.

J Virol, 1996, **70**, 5, 2684-90.

WARD, P. L., B. TADDEO, N. S. MARKOVITZ, *et al.*

Identification of a novel expressed open reading frame situated between genes U(L)20 and U(L)21 of the herpes simplex virus 1 genome.

Virology, 2000, **266**, 2, 275-85.

WEIGLER, B. J.

Biology of B virus in macaque and human hosts: a review.

Clin Infect Dis, 1992, **14**, 2, 555-67.

WEIGLER, B. J., J. A. ROBERTS, D. W. HIRD, *et al.*

A cross sectional survey for B virus antibody in a colony of group housed rhesus macaques.

Lab Anim Sci, 1990, **40**, 3, 257-61.

WEIGLER, B. J., F. SCINICARIELLO and J. K. HILLIARD

Risk of venereal B virus (cercopithecine herpesvirus 1) transmission in rhesus monkeys using molecular epidemiology.

J Infect Dis, 1995, **171**, 5, 1139-43.

WEIR, E. C., P. N. BHATT, R. O. JACOBY, *et al.*

Infrequent shedding and transmission of herpesvirus simiae from seropositive macaques.

Lab Anim Sci, 1993, **43**, 6, 541-4.

WHITLEY, R. J. AND J. K. HILLIARD

Cercopithecine Herpesvirus (B Virus).

In: KNIPE, D.M., and HOWLEY, P.M. *Fields Virology*, 4th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams et Wilkins, 2001. 2835-2848.

WILCOX, W. C., D. LONG, D. L. SODORA, *et al.*

The contribution of cysteine residues to antigenicity and extent of processing of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D.

J Virol, 1988, **62**, 6, 1941-7.

WOLFENSOHN, S. E. and R. GOPAL

Interpretation of serological test results for simian herpes B virus.

Lab Anim, 2001, **35**, 4, 315-20.

XU, D., V. TIWARI, G. XIA, *et al.*

Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1.

Biochem J, 2005, **385**, Pt 2, 451-9.

YAMADA, M.

Replication of herpes simplex virus in two cell systems derived from rhesus monkeys.

Biken J, 1983, **26**, 1, 35-47.

YASIN, B., W. WANG, M. PANG, *et al.*

Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry.

J Virol, 2004, **78**, 10, 5147-56.

YASIN, B., W. WANG, M. PANG, *et al.*

t-Defensins Protect Cells from Infection by Herpes Simplex Virus by Inhibiting Viral Adhesion and Entry.

J. Virol., 2004, 5147-5156.

YE, G. J., K. T. VAUGHAN, R. B. VALLEE, *et al.*

The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane.

J Virol, 2000, **74**, 3, 1355-63.

ZWARTOUW, H. T. and E. A. BOULTER

Excretion of B virus in monkeys and evidence of genital infection.

Lab Anim, 1984, **18**, 1, 65-70.

ZWARTOUW, H. T., C. R. HUMPHREYS and P. COLLINS

Oral chemotherapy of fatal B virus (herpesvirus simiae) infection.

Antiviral Res, 1989, **11**, 5-6, 275-83.

ZWARTOUW, H. T., J. A. MACARTHUR, E. A. BOULTER, *et al.*

Transmission of B virus infection between monkeys especially in relation to breeding colonies.

Lab Anim, 1984, **18**, 2, 125-30.

Toulouse, 2006

NOM : COUTROT

Prénom : EDWIN

TITRE : HERPES VIROSE B : GESTION DU RISQUE INFECTIEUX CHEZ LE MACAQUE ET L'HOMME

RESUME : Le *Cercopithecine Herpes Virus 1* (CeHV-1) est endémique chez les macaques d'origine asiatique à l'état sauvage et peut être responsable d'une zoonose grave caractérisée par l'apparition d'une encéphalomyélite fréquemment mortelle pour l'homme en l'absence de traitement. La maladie animale, bien que bénigne chez le macaque, nécessite une gestion particulière en raison du risque encouru par les personnes en contact des macaques. Il n'existe actuellement aucun vaccin animal ou humain. Des mesures préventives spécifiques permettent de limiter les risques liés à cette zoonose. En cas de contamination humaine, un traitement antiviral précoce et adapté augmente les chances de guérison des patients. L'auteur présente ses travaux sur l'étude de l'emploi d'un test sérologique ELISA utilisant des antigènes viraux issus des HSV humains pour le dépistage de l'infection simienne par le CeHV-1 et sur l'analyse par PCR de divers échantillons d'ADN d'origine simienne à la recherche du CeHV-1.

MOTS-CLES : PRIMATE / MACAQUE / MALADIE VIRALE / HERPESVIRUS / HERPES VIROSE B / ZOOSE / RISQUE INFECTIEUX / CERCOPITHECINE HERPESVIRUS 1 / ANTROPOZOOSE

ENGLISH TITLE : B VIRUS : INFECTIOUS RISK MANAGEMENT IN MACAQUE AND HUMAN

ABSTRACT : The B virus or *Cercopithecine Herpes Virus 1* (CeHV-1) is endemic in wild Asian macaques. This virus can be responsible for a serious zoonose characterized by the appearance of an encephalomyelitis most frequently fatal for the man in the absence of treatment. The animal disease although benign in the natural host, the macaque, requires a particular management because of the risk incurred by the people in contact with macaques. Moreover, there is currently any animal or human vaccine. Specific preventive measures can strongly limit the risks related to this zoonose. In the event of human contamination by this virus, the installation of an early and adapted antiviral treatment increases the infected patient's chances of cure. The author presents his work on using a herpes simplex virus antigen ELISA serologic test for the CeHV-1 serology in the serums of macaque. It was also studied the detection of CeHV-1 in various DNA samples of simian origin by polymerase chain reaction (PCR).

KEYWORDS : PRIMATE / MACAQUE / VIRAL DISEASE / HERPESVIRUS / B VIRUS / ZOOSE / INFECTIOUS RISK / CERCOPITHECINE HERPESVIRUS 1 // ANTROPOZOOSE