

Mémoire de Maîtrise en médecine

# Rôle du Virus de l'Herpès Simplex humain (HSV) dans les affections des voies respiratoires basses

(Role of human Herpes Simplex Virus (HSV) in Lower  
Respiratory Tract Disease)

## **Etudiant**

Nicolas Perez

## **Tuteur**

Dr. Pascal Meylan, Pr. honoraire  
Institut de Microbiologie et Service des Maladies Infectieuses

## **Expert**

Dr. John-David Aubert, Pr. Associé  
Service de Pneumologie

Lausanne, 08.12.2018

<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Contexte.....</b>	<b>3</b>
<b>Objectifs.....</b>	<b>3</b>
<b>Méthodologie.....</b>	<b>3</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>3</b>
<b>Conclusions .....</b>	<b>3</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>4</b>
<b>Le Virus de l’Herpès Simplex humain (HSV).....</b>	<b>4</b>
<b>Virologie.....</b>	<b>4</b>
<b>Épidémiologie .....</b>	<b>4</b>
<b>Pathogenèse .....</b>	<b>4</b>
<b>Clinique, Diagnostic et Traitement .....</b>	<b>5</b>
<b>Les voies respiratoires basses : des études contradictoires.....</b>	<b>5</b>
<b>Notre étude : objectifs .....</b>	<b>6</b>
<b>Méthode .....</b>	<b>7</b>
<b>Préambule.....</b>	<b>7</b>
<b>Sélection .....</b>	<b>8</b>
<b>Récolte .....</b>	<b>9</b>
<b>Résultats et Analyse .....</b>	<b>10</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>10</b>
<b>Analyse.....</b>	<b>13</b>
Évolution de la charge virale en fonction du temps et des caractéristiques de l’hospitalisation	13
Relation entre la charge virale et les évènements « pro-inflammatoires ».....	16
Relation entre la charge virale et la mortalité .....	21
Relation entre la charge virale et co-morbidités.....	21
Relation entre la charge virale et pneumonie.....	21
Relation entre la charge virale et l’administration d’un traitement spécifique.....	22
<b>Discussion et Conclusion.....</b>	<b>23</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>27</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>28</b>

# **ABSTRACT**

## **Contexte**

Le Virus de l'Herpès Simplex humain (HSV) est un virus à ADN double brin de la famille des *Herpesviridae*. Il est associé à une maladie contagieuse caractérisée par des lésions vésiculaires de la peau et/ou des muqueuses douloureuses devenant rapidement croûteuses. Lors de la primo-infection, le virus pénètre l'épithélium. Cette phase est souvent asymptomatique et il n'est pas rare qu'elle passe inaperçue. Le virus établit une latence dans les ganglions nerveux, en remontant les tracts nerveux sensitifs, et le patient est à risque de faire une réactivation dès cette période. Bien que la plupart des lésions herpétiques se limitent lors de la réactivation à la zone labiale ou génitale, on peut observer des lésions dans d'autres organes. De fait, l'implication de HSV dans les infections des voies respiratoires basses est un sujet actuellement très controversé. En effet, bien qu'il soit parfois retrouvé dans des prélèvements des voies respiratoires basses, son rôle pathogène à ce niveau reste peu clair.

## **Objectifs**

Ce travail vise à étudier la clinique que présentent les patients infectés par HSV et pour lesquels un prélèvement des voies respiratoires basses s'est avéré positif pour ce virus. Nous voulons déterminer s'il existe une relation entre la charge virale et l'importance des signes et symptômes que les patients présentent.

## **Méthodologie**

Nous avons extrait les données démographiques et cliniques de patients dont des prélèvements respiratoires ont révélé la présence de HSV. Puis, nous avons étudié la relation entre la charge virale retrouvée et l'état clinique du patient. Nous nous sommes intéressés à la durée d'hospitalisation, du séjour en soins intensifs (SI) et d'intubation si présents, signes de morbidité importante chez ces patients. Nous nous sommes également intéressés à la description macroscopique des voies respiratoires lors de la bronchoscopie et à l'examen cytologique du liquide de lavage broncho-alvéolaire ou de l'aspiration bronchique, aux comorbidités, aux traitements administrés et à la survenue d'un décès durant l'hospitalisation.

## **Résultats**

La distribution des prélèvements en fonction de la charge semble dessiner une courbe bimodale. Il semble qu'une tendance non-significative à une corrélation entre une charge virale élevée et une durée d'hospitalisation, de séjour aux SI et d'intubation puisse être mise en évidence. Toutefois, les patients qui sont passés par les soins intensifs et qui ont été intubés présentent en moyenne de manière significative une charge virale plus élevée. Il faut noter également une relation entre charge élevée et status bronchoscopique inflammatoire, avec ou sans sécrétions purulentes. Les patients ayant reçu de l'acyclovir ont présenté des durées d'hospitalisation, de séjour aux SI et d'intubation globalement plus longues, bien que chez ceux ayant eu deux prélèvements, il semble que la charge virale ait diminué après la mise en place du traitement. Aucune relation avec la mortalité n'a pu être démontrée.

## **Conclusions**

Une relation entre une charge virale élevée, un status inflammatoire et une morbidité importante se dessine. Il se pourrait que les petites charges correspondent à une simple contamination, vraisemblablement par broncho-aspiration, et que les charges plus élevées soient liées à la clinique du patient. La question de la pathogénicité reste toutefois entière : HSV est-il l'agent étiologique responsable, ou un simple marqueur de sévérité chez des patients déjà en état critique ? L'inflammation précède-t-elle ou est-elle induite par la charge virale élevée ? Le traitement d'acyclovir semble ne pas avoir de bénéfice sur le devenir des patients, mais ceci nécessiterait une étude prospective randomisée, de type test thérapeutique, afin d'obtenir des conclusions plus fermes quant à l'intérêt d'un traitement, et par ce biais de confirmer ou non la pathogénicité de HSV.

**Mots-clés** : herpès simplex virus, voies respiratoires basses, charge virale, impact clinique.

# INTRODUCTION

## Le Virus de l'Herpès Simplex humain (HSV)

### Virologie

Le virus de l'Herpès Simplex humain (HSV) est un virus à ADN double brin appartenant à la (sous-) famille des *α-Herpesviridae*. Il comporte deux sous-types : HSV-1, classiquement associé aux atteintes oro-labiales, et HSV-2, associé aux affections génitales.

Ce virus est composé d'un génome empaqueté dans une coque protéique appelée capsid, et possède également une enveloppe externe supplémentaire autour de la capsid, constituée de lipides. Grâce à cette structure, il est capable de procéder à son adsorption dans la cellule-cible, impliquant des glycoprotéines de surface du côté viral, ainsi que des glycoaminoglycans, des récepteurs de la famille du récepteur au TNF et des nectines du côté cellulaire. Il s'attache dans un premier temps à la membrane cellulaire, avant de fusionner et de permettre ainsi à la capsid de pénétrer dans le cytoplasme. Cette dernière rejoindra ensuite le noyau de la cellule où l'ADN y perdra sa capsid pour y entrer. S'en suivra dès lors la réplication du génome dans le noyau puis la synthèse des protéines de structure dans le cytoplasme, qui permettront ainsi d'assembler de nouvelles capsides, puis de les envelopper dans un deuxième temps. La réplication virale ainsi effectuée est visible dans les noyaux des cellules atteintes sous forme d'inclusions.

Il est important de souligner que HSV est un virus capable d'établir une phase de latence dans des cellules neuronales. Ceci correspond à une transcription en quantité limitée d'ARN. Lorsque la réactivation a lieu, on observe une activation de l'ensemble du génome qui reproduit une expression et réplication complète avec libération du virus (1).

### Épidémiologie

L'infection à HSV est une affection très fréquente. Selon une étude suisse, 80% de la population helvétique âgée entre 35-64 ans serait atteinte de HSV-1. Concernant HSV-2, on s'oriente plutôt vers 19% du même bassin de population, mais avec des prévalences très variables selon le risque de maladie sexuellement transmissible (2).

### Pathogenèse

Lors de la primo-infection, le virus pénètre l'épithélium, via un site cutané ou muqueux abrasé. Cette phase est souvent asymptomatique et il n'est pas rare qu'elle passe inaperçue. Le virus commence ainsi à se répliquer dans les cellules de l'épiderme et du derme. Dans un deuxième temps, le virus infecte les cellules nerveuses et établit une latence dans les ganglions nerveux, en remontant les tractus nerveux sensitifs. Le patient est à risque de faire une réactivation dès cette période-là. Le mécanisme de réactivation reste obscur. Toutefois, on a pu observer certains facteurs déclenchant ces réactivations : fièvre, période de stress intense, influences hormonales (e.g. cycle menstruel), alcool, ultraviolet.

Il est à noter que si la primo-infection se produit principalement par contact direct avec le site cutané-muqueux, une atteinte par voie de dissémination systémique (hématogène) n'est pas exclue, notamment dans les formes rares atteignant les viscères. Il existe notamment deux voies d'infection dans le cas des atteintes du parenchyme pulmonaire, sujet du présent mémoire : une voie endo-luminale par aspiration bronchique, suivant le schéma d'infection décrit ci-dessus, et une seconde par dissémination, principalement chez l'hôte immuno-compromis.

D'un point de vue de l'expression clinique, des lésions vésiculaires, voire ulcérées de la peau et/ou des muqueuses à caractère prurigineuses devenant rapidement croûteuses réapparaissent après réactivation (1).

## **Clinique, Diagnostic et Traitement**

Concernant la clinique que présentent les patients, les primo-infections sont généralement plus sévères, avec la présence de symptômes systémiques (fièvre, asthénie, myalgie, inappétence, adénopathie), et durent plus longtemps. Pour ce qui est des réactivations, HSV-1 présente une prédisposition à en provoquer plutôt dans la région oro-labiale, alors que HSV-2 se manifeste préférentiellement dans la région génitale. A noter toutefois que les infections peuvent se présenter de manière complètement asymptomatique également.

En terme de fréquence, l'atteinte la plus commune correspond à la présentation oro-faciale. Lors de la primo-infection, il n'est pas rare de décrire des affections de type pharyngite et gingivostomatite. Les réactivations se manifestent plus fréquemment par une atteinte labiale localisée. Les lésions se présentent généralement par une séquence macule-papule-vésicule-ulcère-croûte, avant résolution.

Les infections génitales se révèlent aussi assez fréquentes, la primo-infection s'accompagnant souvent d'atteintes systémiques.

Le diagnostic définitif se pose dans ces deux cas sur un frottis des lésions et, historiquement, par culture. De nos jours, la PCR quantitative (de l'anglais Polymerase Chain Reaction) est principalement utilisée, étant la méthode la plus sensible, quel que soit le niveau d'atteinte.

Une autre atteinte également possible est celle du système nerveux central. L'encéphalite virale à HSV-1 est une entité bien étudiée, accompagnée de fièvre et de symptômes neurologiques focaux. Elle peut être difficile à distinguer d'une autre affection virale, raison pour laquelle la PCR réalisée dans le liquide céphalo-rachidien s'avère très utile.

Pour ces trois atteintes, les bénéfices d'un traitement antiviral à base d'acyclovir ont bien été démontrés. Il diminue la durée des lésions, ainsi que la mortalité dans le cadre de l'encéphalite (1).

Bien que ces trois affections soient les plus connues et étudiées, le virus de l'Herpès Simplex a été retrouvé dans pratiquement toutes les viscères, et d'autres sites d'infection sont possibles. On a ainsi retrouvé des atteintes de l'œsophage, des poumons ou du foie. Nous possédons quelques données concernant l'œsophagite, qui se développe par extension directe de l'atteinte oro-labiale et réactivation, et se présente par une odyndysphagie associée à une perte de poids, avec des lésions ulcérées ovales. Le diagnostic définitif se pose également par examen par PCR des sécrétions. L'acyclovir diminue la durée et la sévérité des symptômes et guérit les lésions. D'autres atteintes sont aussi possibles, mais encore plus rares (arthrite mono-articulaire, surrénale, reins). Ce genre d'infections disséminées est rarissime chez les patients immunocompétents (3).

## **Les voies respiratoires basses : des études contradictoires**

La pneumopathie à HSV est une pathologie rare et peu de données existent à son sujet. La présence d'HSV dans les voies respiratoires basses est toutefois de plus en plus rapportée. Ceci est dû à l'amélioration de la sensibilité de nos outils diagnostics. A l'origine, on observait à l'examen microscopique des prélèvements présentant des cellules géantes et des inclusions intranucléaires, caractéristiques. La sensibilité de cet examen reste cependant faible. De nos jours, la PCR de frottis des lésions rapporte une sensibilité nettement plus élevée. A noter, la sérologie ne trouve pas sa place parmi les outils diagnostics, en dehors de la documentation de l'infection primaire (production de virus chez un patient séronégatif).

Malgré cette mise en évidence plus fréquente de la présence d'HSV dans les voies respiratoires basses, à l'heure actuelle, peu d'études de grande ampleur ont été menées afin d'analyser d'une part la pathogenèse de cette affection, d'autre part son impact clinique (4–9). L'efficacité d'un traitement antiviral n'a pas fait l'objet d'investigation approfondie non plus.

C'est en 1949 que Morgan & Finland isolent pour la première fois en culture de cellules HSV-1 dans les voies respiratoires d'un patient atteint de pneumonie (10). Il s'agit uniquement d'un case report. S'en suivra une quarantaine d'autres, sans qu'une étude ne soit organisée (11).

La première étude prospective centrée sur cette problématique est publiée en 1982. Elle s'intéresse aux patients qui présentaient un syndrome de détresse respiratoire (ARDS), et mettra en relation la présence de HSV avec des durées d'hospitalisation et de ventilation plus longues, ainsi qu'une mortalité augmentée (12). D'autres études viennent corroborer ces constatations (13–17). Toutefois, d'autres études confirment la relation entre HSV et une hospitalisation et une ventilation prolongée, mais infirment un quelconque rapport avec la mortalité (18–22). En outre, quelques études infirment complètement tout impact clinique de HSV (23).

Ces études s'intéressaient principalement à des patients immunocompétents intubés, ce qui contraste avec la croyance originelle autour des pneumopathies à HSV selon laquelle cette affection était avant tout une atteinte du patient fortement immunosupprimé. Quelques études ont été menées sur ce type de patient pour lesquelles les conclusions rejoignent l'étude de 1982 (24,25). Cependant, le mécanisme d'infection pourrait différer : alors que dans le cadre des patients intubés on penche plus sur une réactivation oro-pharyngée avec ensuite infection contigüe, sans toutefois exclure la possibilité d'une infection hématogène dans un contexte de stress intense, les patients immunosupprimés sembleraient plutôt remplir les critères pour une infection hématogène. En effet, les atteintes pulmonaires sont plus diffuses, moins localisées. Un troisième mécanisme évoqué dans ces études est une réactivation au niveau du nerf vague, directement au niveau pulmonaire. L'ensemble de ces mécanismes reste des hypothèses à valider.

Pour en revenir au rôle de la présence de HSV sur la morbidité et la mortalité, il semble dès lors clair que ceci reste très débattu. Serait-il un réel pathogène responsable de la symptomatologie, un simple marqueur de sévérité chez un patient présentant une pathologie grave, ou encore un simple contaminant ?

D'autre part, l'efficacité du traitement antiviral à base d'acyclovir n'a fait l'objet que d'une étude prospective, qui n'a pas retrouvé de bénéfice (26). Une autre étude a confirmé ces résultats, mais le design de l'étude n'était pas adapté à établir des conclusions univoques à ce sujet. En effet, l'étude n'était pas randomisée, et l'objectif primaire n'était pas d'établir le bénéfice d'un traitement (19). Au contraire, une autre étude rétrospective a mis en évidence un bénéfice lié au traitement (27).

## **Notre étude : objectifs**

Dans le cadre de ce travail, nous reprendrons les objectifs généraux des études évoquées ci-dessus. Nous étudierons ainsi la clinique que présentent les patients infectés par le virus de l'Herpès Simplex humain et pour lesquels un prélèvement des voies respiratoires basses s'est avéré positif pour ce virus. Ensuite, tirant parti de la disponibilité de résultats quantitatifs de PCR en temps réel, nous déterminerons la relation entre la charge virale et l'importance des signes et symptômes que les patients présentent, pour tester l'hypothèse que les charges élevées sont associées avec une expression clinique, tandis que les quantités faibles correspondraient à une broncho-aspiration de contenu oral contenant du virus, et ainsi évaluer le potentiel pathogène du virus. En outre, nous nous intéresserons aux hypothèses de pathogenèse de celui-ci, à savoir si un mécanisme contigüe ou hématogène d'infection semble plus probable. Cette étude rétrospective viendra compléter les connaissances actuelles dans le domaine qui restent très limitées.

# MÉTHODE

## Préambule

Dans un premier temps, nous avons réalisé une revue de la littérature dans ce domaine, afin de s'informer de l'état actuel des connaissances concernant notre sujet d'étude.

Ensuite, nous avons déposé une demande auprès de la commission d'éthique, afin de demander l'autorisation d'accéder aux dossiers cliniques des patients concernés.

## Méthode d'analyse des échantillons

Comme évoqué précédemment, nous avons récupéré les résultats d'analyses effectuées sur des échantillons de lavages broncho-alvéolaires et d'aspirations bronchiques sur lesquels la présence d'HSV avait été recherchée. Pour rappel, il était possible historiquement de mettre en évidence HSV via des cultures ou des sérologies (28). De nos jours, la PCR est largement prédominante en tant que méthode d'analyse de ces types d'échantillons. Dans le cadre de notre étude, ces échantillons prélevés en clinique ont été analysés au laboratoire de diagnostic moléculaire de l'Institut de microbiologie du CHUV.

La PCR comprend 3 étapes principales: la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

La dénaturation correspond à l'étape où l'on sépare le double brin d'ADN pour obtenir deux simple brins sur lesquels les amorces vont se fixer. Il est nécessaire qu'il s'agisse d'ADN, ainsi, si l'on travaillait avec un virus à ARN, une étape préalable de transformation de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) par une enzyme transcriptase inverse serait nécessaire. Dans le cas de HSV qui est un virus à ADN double brin, cette étape n'est pas nécessaire. La dénaturation se produit à haute température (95°C).

Ensuite, l'hybridation consiste en un appariement entre les brins d'ADN maintenant dénaturés et des petites séquences d'acides nucléiques que l'on appelle des amorces ( ou « primers » en anglais). Cette étape se produit à une température de 60°C. Il est donc nécessaire après la dénaturation de diminuer la température du milieu de réaction.

L'analyse se termine par l'élongation. Pour cette étape, il faut remonter légèrement la température. C'est durant cette phase qu'une enzyme, l'ADN polymérase se lie aux primers hybridés aux brins d'ADN pour allonger la séquence. Durant cette élongation, la séquence va cliver des sondes qui s'étaient également appariées sur les brins d'ADN. Ces sondes Taqman® (Applied Biosystems) disposent à une extrémité d'une molécule fluorescente, inhibée à l'origine par une autre structure appelée « quencher » qui absorbe cette fluorescence ; la fluorescence n'est détectée qu'après le clivage des sondes qui libère ainsi les molécules fluorescente de la proximité des « quenchers ». C'est grâce à cette réaction que l'on est en mesure de quantifier l'ADN viral d'un échantillon, c'est ce que l'on appelle la PCR en temps réel.

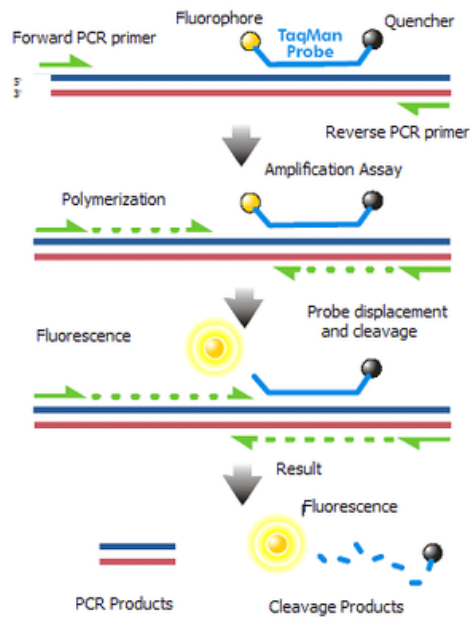


Figure 1 - Mécanisme chimique d'une sonde TaqMan (29)

Ces trois étapes correspondent à un cycle d'amplification, on procède à plusieurs cycles et à chacun d'entre eux une détection est réalisée. On se base ensuite sur des échantillons-étalons, des plasmides synthétiques contenant une séquence similaire à celle que l'on souhaite détecter, où le nombre de copies de virus est déjà connu, pour pouvoir mesurer à combien de cycles correspond une certaine concentration et extrapoler ces valeurs à nos échantillons (30).

Dans le laboratoire de diagnostic moléculaire de l'Institut de microbiologie du CHUV, l'ensemble du processus d'analyse est désormais standardisé et automatisé, dans le but de diminuer le risque de contamination et d'accélérer et simplifier les examens. Ainsi, après réception des échantillons, ceux-ci sont extraits à l'aide d'appareils (MagNA pure 96® (Roche)). Des fractions de ces extraits sont mélangées à un mix d'amplification comportant les sondes Taqman® (Applied Biosystems) et les primers spécifiques de la séquence à amplifier, ainsi que l'ADN polymérase thermostable et les nucléotides nécessaires à la synthèse d'ADN (31). Ce mélange a lieu sur des microplaques à 384 puits à l'aide d'un robot pipetteur (Microlab STAR® (Hamilton)). Après cette phase, les préparations sont prêtes à être amplifiées par PCR (QuantStudio® (Applied Biosystems)). Il est possible de disposer différents échantillons avec différentes recherches de germes sur une même plaque et sur une même analyse. En effet, toutes les PCRs proposées et réalisées dans ce laboratoire présentent les mêmes paramètres de cycle thermique ce qui permet de procéder à des analyses distinctes simultanément (32).

## Sélection

Nous avons défini les critères suivants d'inclusion et d'exclusion des échantillons. Ainsi, les patients chez qui une recherche d'Herpès Simplex Virus dans les voies respiratoires basses a été effectuée et dont le prélèvement s'est avéré positif ont été retenus. Il s'agissait de prélèvement de type lavage broncho-alvéolaire ou aspiration bronchique. A noter que l'inclusion d'échantillons négatifs pour HSV aurait conduit à un nombre beaucoup plus grand, impossible à gérer dans le cadre d'un travail de master. Tout document attestant un refus de participation à une quelconque étude constitue un critère formel d'exclusion. Nous avons exclu tout prélèvement négatif ou ininterprétable ainsi que les échantillons positifs mais ne comportant pas de quantification du nombre de copies/mL par PCR.



Dès lors, les échantillons sélectionnés proviennent de prélèvements effectués chez 39 patients, entre octobre 2005 et février 2017.

## Récolte

Après avoir filtré l'ensemble des prélèvements des voies respiratoires basses qui ont été réalisés au CHUV à la recherche de la présence de HSV, nous avons retenu 44 échantillons remplissant entièrement les critères cités précédemment.

Nous avons ensuite récupéré dans les dossiers archivés des patients via les plateformes SOARIAN et Archimède les données d'intérêt pour cette étude. Afin de nous aider lors de la récolte, nous avons préparé préalablement une liste des variables d'intérêt à récupérer dans les dossiers. A ce titre, il va de soi que la liste n'était pas définitive, et qu'elle a été adaptée durant l'étude en fonction des informations disponibles dans les archives et en fonction de nouveaux éléments qui étaient susceptibles de représenter un quelconque intérêt pour l'étude, et auxquels nous n'avons pas pensé en première intention.

Nous avons ainsi récupéré des données démographiques (âge et sexe), le motif d'hospitalisation au sens large (problématique pulmonaire /cardiaque /oncologique /autre) ainsi que sa durée. Nous avons aussi relevé si le patient avait effectué un passage aux soins intensifs (SI) avec ou sans ventilation invasive et, le cas échéant, quelle en avait été la durée. Ces données seront utilisées pour évaluer la sévérité de l'atteinte que présentait le patient. En effet un score tel que APACHE ou FINE (PSI) ne pouvait pas être calculé à partir des données du dossier pour l'ensemble de nos patients. Nous évaluerons dès lors la gravité en fonction du passage ou non en SI, de l'intubation ou non du patient, et de la durée de celle-ci. En outre, nous avons relevé le délai entre l'intubation et le prélèvement, afin d'analyser par la suite la charge virale en fonction de ce délai. Pour l'analyse nous avons retenu un cut-off de 5 jours, car au-delà de celui-ci, les patients présentaient un délai nettement supérieur (plus de 10 jours). Nous nous sommes également intéressés à la présence ou non d'une pneumonie objectivée conjointement à la découverte d'HSV. Nous retenons comme pneumonie objectivée toute pneumonie remplissant les critères établis par l'European Respiratory Society (cf. Tableau 1 ci-dessous (33)). La présence ou non d'une co-infection bactérienne objectivée (i.e. documentation dans le même prélèvement d'un pathogène respiratoire bactérien) a été relevée. En outre, des comorbidités concomitantes (dysfonction immunitaire, état inflammatoire, BPCO, greffe, néoplasie active) ont été étudiées. Nous nous sommes également intéressés aux habitudes toxiques des patients, plus particulièrement au tabac (est considéré comme tabagique tout patient à plus de 10 UPA), et aux traitements actuels (radio/chimiothérapie, stéroïdes, immunosuppresseurs et leur dosage). En outre, nous avons relevé si le patient était décédé durant l'hospitalisation. Nous avons également noté si le patient avait bénéficié d'un traitement à l'acyclovir. Chaque échantillon étant normalement lié à un rapport bronchoscopique, nous nous sommes intéressés à celui-ci afin de noter l'état inflammatoire macroscopique des bronches. Dans certains cas, des rapports d'examen cytologiques étaient disponibles et leurs conclusions ont été notées (norme de concentration cellulaire / ml = 150 à 200'000 cell./ml ; norme de répartition cellulaire : macrophages = >85%, neutrophiles = <3%, lymphocytes = <12%, cellules bronchiques = <10%).

Tableau 1 - Critères Pneumonie d'Acquisition Communautaire selon l'European Respiratory Society (ERS) (33)

<b>Définition d'une pneumonie suspectée</b>	Maladie aigüe avec toux + au moins un autre symptôme :
	-EF >4j -Dyspnée/Tachypnée (FR>20) -Nouveaux signes focaux à l'auscultation
<b>Définition d'une pneumonie objectivée</b>	Pas d'autre cause évidente
	Critères ci-dessus + nouvel infiltrat à la radiologie

Les données ainsi obtenues, nous avons analysé leur relation avec la charge virale mesurée dans les échantillons, afin d'établir s'il existe une relation entre la concentration de virus dans les voies respiratoires basses et les caractéristiques cliniques des patients. La charge virale a été transformée à l'échelle logarithmique avant analyse afin de simplifier celle-ci. Les graphiques et les statistiques utiles à ce travail ont été réalisés à l'aide du logiciel Graphpad Prism ® (34). Grâce à ce logiciel, nous avons pu réaliser les tests statistiques d'intérêt afin d'analyser si une corrélation significative pouvait être dégagée sur la base de nos données. Les types de tests appliqués comportent les tests de régression linéaire (nous permettant d'obtenir les  $R^2$  et p), de chi carré pour comparaison de proportions en cas de données qualitatives, ainsi que le test comparatif de Mann-Whitney, un test non-paramétrique permettant de comparer entre des groupes la distribution de variables sans requérir de distribution normale .

## RÉSULTATS ET ANALYSE

### Résultats

39 patients, dont 18 hommes et 21 femmes (46%/54%), ont fourni des prélèvements qui ont rempli les critères de l'étude et ont été recrutés. La médiane d'âge se situait à 62 ans (de 30 à 85 ans). Ces patients ont fourni 44 échantillons dont 24 lavages broncho-alvéolaires et 20 aspirations bronchiques (55%/45%). Une comparaison de la charge virale entre ces deux types de prélèvements a été effectuée, objectivant de manière significative une charge plus élevée dans les aspirations bronchiques comparées aux lavages broncho-alvéolaires (médiane : 5.3 vs 3.3 ;  $p=0.03$ ). Cette différence est compatible avec la dilution des sécrétions respiratoires durant le processus de lavage. La médiane des concentrations en HSV de l'ensemble de ces échantillons s'élevait à  $46'150$  copies/mL (entre  $9$  et  $7 \times 10^9$  copies/mL). Concernant la distribution des prélèvements en fonction de la charge, celle-ci prend un aspect possiblement bimodal, avec un seuil aux alentours du 3<sup>ème</sup> percentile de l'échelle logarithmique de 10 (cf. Figure 3). Seul HSV-1 a été trouvé dans ces échantillons, reflétant la large prédominance de ce type dans la sphère ORL.

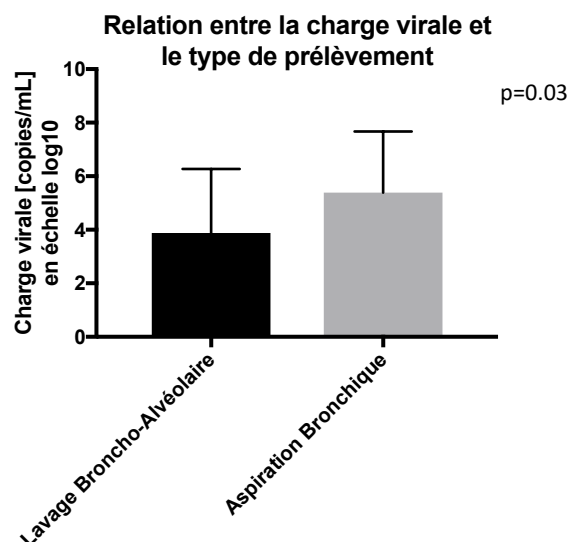


Figure 2 – Relation entre charge virale et type de prélèvement (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique))

### Répartition des prélèvements en fonction de leur charge virale

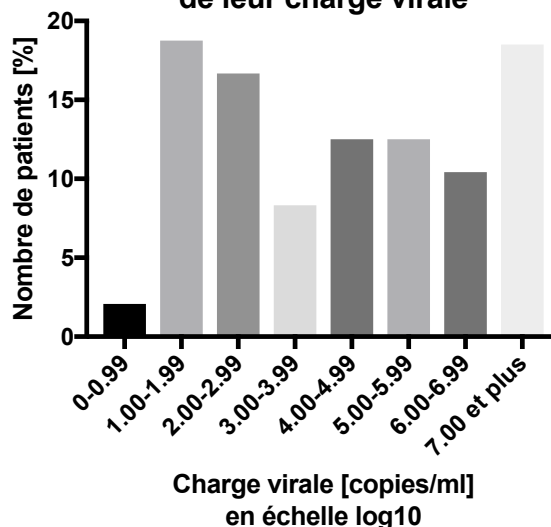


Figure 3 – Répartition des patients en fonction de la charge virale

La principale cause d'hospitalisation identifiée dans ce collectif correspondait à une problématique pulmonaire chez 26 des patients (67%), cardiaque chez 4 (10%) et néoplasique chez 4 également (10%).

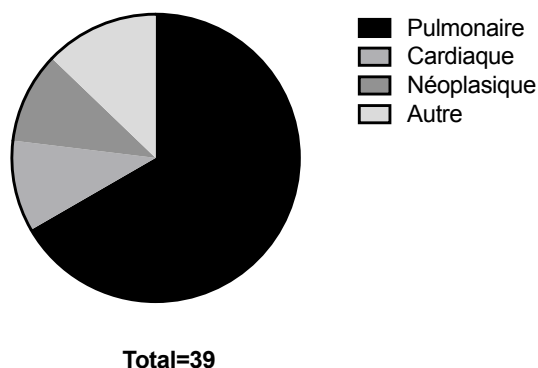


Figure 4 – Répartition selon le motif d'hospitalisation

La médiane de la durée d'hospitalisation s'élevait à 34 jours (allant de 0 (patients ambulatoires) à 225 jours). En outre, 30/39 patients (77%) ont effectué un séjour aux soins intensifs durant leur hospitalisation, avec une durée médiane de 26 jours (de 3 à 100 jours). Une intubation s'est révélée nécessaire chez 26/39 patients (67%), avec une durée médiane de 10.5 jours (de 4 à 32 jours).

Une pneumonie a été objectivée chez 29 patients (74%). Nous retenons comme objectivée une pneumonie remplissant les critères décrits précédemment dans les méthodes (cf. Tableau 1 – symptômes + nouvel infiltrat radiologique) (33). En outre, 17 présentaient une co-infection bactérienne pulmonaire mise en évidence à la microbiologie (44%). Ces co-infections semblent être d'origine nosocomiale, des germes opportunistes ayant été retrouvés (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ainsi que quelques cas à coagulase-négative, diverses entérobactéries dont *Escherichia Coli* ou encore *Providencia stuartii*, ainsi que quelques bactéries moins fréquentes de la famille des *Achromobacter* ou des mycobactéries). La CRP a également été relevée, avec une valeur médiane à 106.5 mg/L (de 2 à 369 mg/L), et pour laquelle un histogramme sur le même principe que pour la répartition des prélèvements a été réalisé, sans qu'il ne soit possible d'en dégager une distribution

particulière (voir annexe, figure A). Dans un souci de lisibilité du travail, les graphiques sans résultat informatif sont à retrouver dans l'annexe à ce travail.

D'un point de vue immunitaire, 24 patients étaient immunosupprimés (61%), que ce soit dans le contexte de la maladie actuelle (N=3), à cause d'une maladie immunodéficiente sous-jacente (HIV) (N=3), ou dans le cadre d'un traitement (Radio-chimiothérapie, Corticothérapie, Immunosuppresseurs) (N=21, recouvre certaines catégories susmentionnées).

Concernant les autres comorbidités étudiées, 5 patients souffraient de BPCO (13%), 7 patients étaient greffés (18%), 16 présentaient une néoplasie concomitante (41%), et 21 étaient tabagiques (54%).

Chaque échantillon était accompagné d'un rapport de bronchoscopie (à l'exception d'un prélèvement). Parmi eux, 9 décrivent un status bronchique sans particularité (21%) contre 34 avec un status inflammatoire (79%). De plus, des sécrétions mucoïdes ont été mentionnées pour 8 bronchoscopies (19%) et des sécrétions purulentes pour 14 examens (33%). Finalement, une bronchoscopie identifiait des vésicules (2%) et trois des ulcères ou des érosions (7%).

Des rapports de cytologie concernant 32 échantillons ont été étudiés. Dix-sept d'entre eux rapportaient une prédominance de neutrophiles sur l'échantillon (53%), 5 une prédominance lymphocytaire (16%), tandis que la présence d'inclusions était notée dans 8 cas (25%). A noter que ces 8 cas avec inclusions présentaient également une prédominance de neutrophiles.

Seize patients ont bénéficié d'acyclovir durant leur séjour (41%).

Parmi l'ensemble du collectif, 14 malades sont décédés durant l'hospitalisation (36%).

L'ensemble des résultats obtenus après la récolte de données se trouvent dans les tableaux ci-joints.

Tableau 2 – Données cliniques récoltées

<b>Sexe</b>	Homme	18 (46%)
	Femme	21 (54%)
<b>Age</b>	Moyenne (SD)	60.9 (14.0)
	Médiane	62 (30-85)
<b>Prélèvement</b>	44	
<b>-Concentration [copies/mL]</b>	Moyenne (SD)	209472954 (1064301832)
	Médiane	46150 (9-7x10 <sup>9</sup> )
<b>-Type</b>	Lavage broncho-alvéolaire	24 (55%)
	Aspiration bronchique	20 (45%)
<b>Motif d'hospitalisation</b>	Pulmonaire	26 (67%)
	Cardiaque	4 (10%)
	Néoplasique	4 (10%)
	Autre	5 (13%)
<b>Durée d'hospitalisation [jours]</b>	Moyenne (SD)	48.9 (51.6)
	Médiane	34 (0-225)
<b>Soins intensifs</b>	30 (77%)	
	<b>-Durée [jours]</b>	
	Moyenne (SD)	31.9 (24.2)
	Médiane	26 (3-100)

<b>Intubation</b> -Durée totale [jours]	26 (67%)	
	Moyenne (SD)	10.25 (9.0)
	Médiane	10.5 (4-32)
<b>Pneumonie objectivée</b>	29 (74%)	
<b>BPCO</b>	5 (13%)	
<b>Grefe</b>	7 (18%)	
<b>Néoplasie</b>	16 (41%)	
<b>Co-infection bactérienne</b>	17 (44%)	
<b>Tabac</b>	21 (54%)	
<b>Décès</b>	14 (36%)	
<b>Acyclovir</b>	16 (41%)	
<b>Immunosuppression</b>	24 (61%)	
<b>Facteur inflammatoire (CRP) [mg/l]</b>	Moyenne (SD)	124.0 (90.2)
	Médiane	106.5 (2-369)

Tableau 3- Données bronchoscopiques et cyzologiques

<b>Cytologie</b>	32
Prédominance Neutrophiles	17 (53%)
Prédominance Lymphocytes	5 (16%)
Inclusions (+neutro)	8 (25%)
<b>Bronchoscopie</b>	43
Sp	9 (21%)
Inflammatoire	34 (79%)
Sécrétions mucoïdes	8 (19%)
Sécrétions purulentes	14 (33%)
Vésicules	1 (2%)
Ulcères/érosions	3 (7%)

Tableau 4 - Traitements en cours lors des prélèvements

<b>Radio-chimiothérapie</b>	8 (20%)	
<b>Corticostéroïdes</b> Dose [mg/j] selon étalon Prednisone	15 (38%)	
	Moyenne (SD)	89.1 (149.3)
	Médiane	40 (7.5-625)
<b>Immunosuppresseurs</b>	9 (23%)	

## Analyse

### Évolution de la charge virale en fonction du temps et des caractéristiques de l'hospitalisation

Afin de tester l'hypothèse que les événements relatifs à l'hospitalisation sont à l'origine de l'infection ou de la réactivation de HSV-1, et afin d'évaluer le degré de sévérité de l'atteinte en fonction de la charge virale, la relation de celle-ci en fonction de la durée d'hospitalisation a

été étudiée. A noter que la charge virale est exprimée en échelle logarithmique décimale, pour une meilleure lisibilité. En cas de double prélèvement (39 patients pour 44 prélèvements), seule la valeur la plus élevée de charge virale pour chaque patient a été incluse dans cette analyse.

### Charge virale en fonction de la durée d'hospitalisation

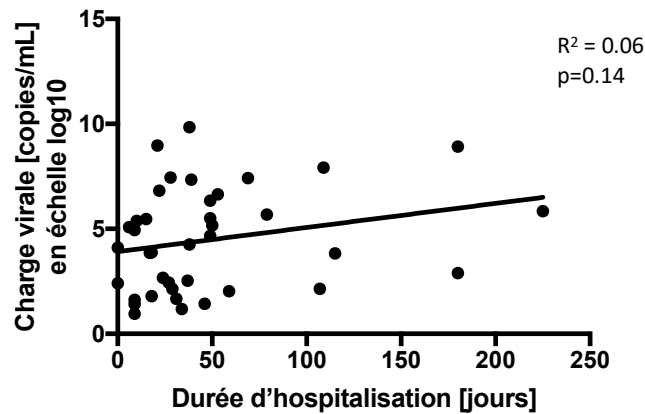


Figure 5 - Charge virale en fonction de la durée d'hospitalisation (Corrélation par régression linéaire)

Sur la base du graphique ainsi obtenu, une tendance à une corrélation, quoique n'atteignant pas un niveau significatif entre la charge virale élevée et une durée prolongée d'hospitalisation peut être observée ( $p=0.14$ ).

Une admission en soins intensifs et une intubation représentant un facteur de stress et d'irritation locale pouvant causer une réactivation de HSV, nous avons examiné si ces événements étaient liés à une charge virale plus importante.

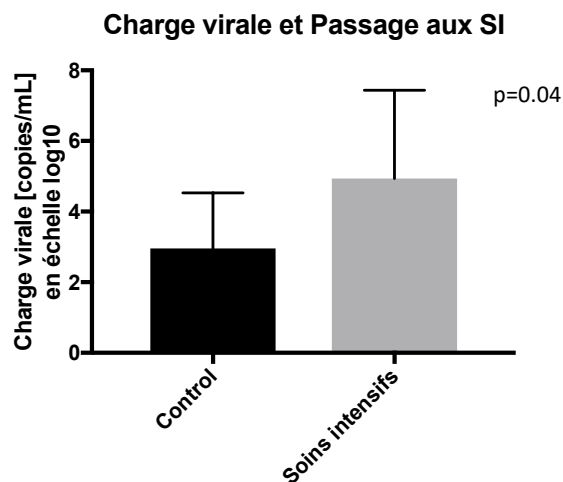


Figure 6 - Charge virale en fonction de la survenue d'un passage aux soins intensifs (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique))

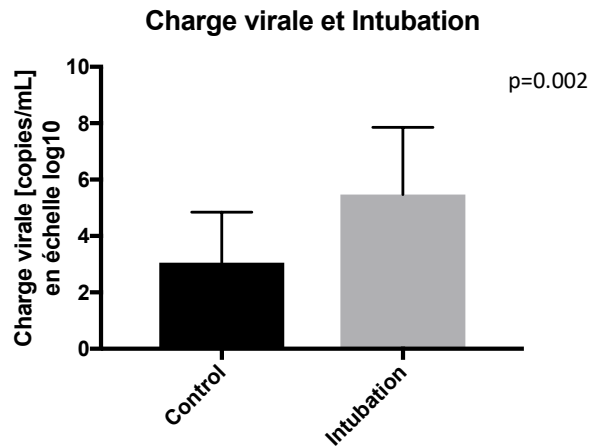


Figure 7 - Charge virale en fonction de la survenue d'une intubation durant le séjour (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique))

Une charge significativement plus élevée a été observée chez les patients ayant été admis en soins intensifs (médiane : 2.44 vs 5.06 ; p=0.04) ou ayant subi une intubation (médiane : 2.4 vs 5.5 ; p=0.002).

En outre, au sujet de la relation entre la charge virale et l'intubation, l'intervalle de temps entre l'intubation et le prélèvement a été examiné, dans l'optique d'étudier si la pathogenèse de l'atteinte est liée à une infection contigüe, auquel cas la charge se révélerait particulièrement élevée lors d'un prélèvement proche du jour d'intubation, cette dernière favorisant non seulement l'aspiration de salive infectée, mais encore une réplication au niveau des voies respiratoires basses. Ainsi, 4 patients (15%) ont bénéficié du prélèvement dans les 5 jours qui ont suivi l'intubation. Les 22 restants (85%) ont été intubés dans un intervalle de temps de plus de 10 jours.

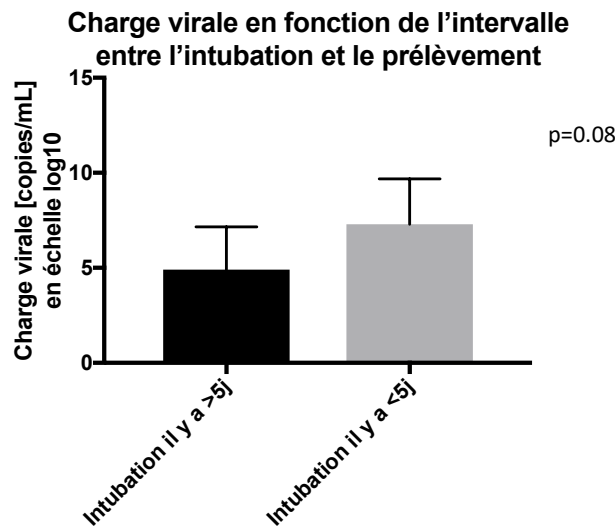


Figure 8 - Charge virale en fonction de l'intervalle de temps entre l'intubation et le prélèvement (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique))

Une corrélation, toutefois non-significative, entre une charge élevée et un prélèvement proche de la date d'intubation (médiane : 4.9 vs 8.2 ; p=0.08) se dessine. Ces données sont compatibles avec l'hypothèse que dans les jours suivant l'intubation, l'irritation locale induit

une réplication virale dans les voies respiratoires, qui par la suite est dans une certaine mesure contrôlée par les réponses immunes.

Afin de mieux analyser la relation temporelle entre charge virale et séjour aux SI et intubation, la charge virale en fonction de la durée de séjour en soins intensifs et de la durée totale d'intubation a été analysée de la même manière qu'avec la durée d'hospitalisation.

Charge virale en fonction de la durée de séjour en SI

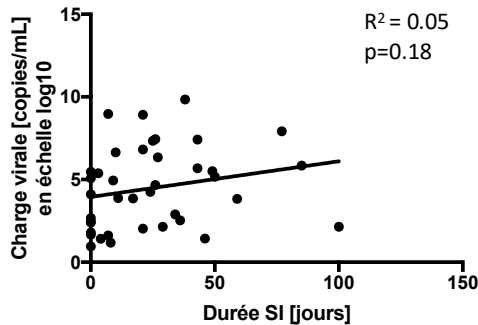


Figure 9 - Charge virale en fonction de la durée de séjour aux soins intensifs (Corrélation par régression linéaire)

Charge virale en fonction de la durée d'intubation

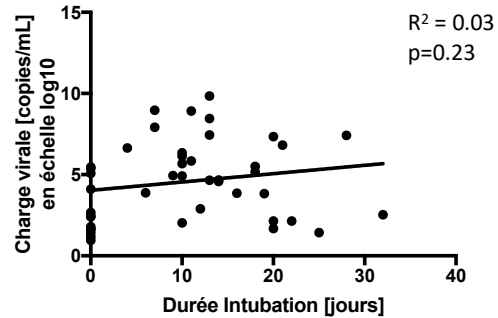


Figure 10 - Charge virale en fonction de la durée d'intubation (Corrélation par régression linéaire)

Les résultats rejoignent ceux obtenus pour la durée d'hospitalisation, avec une tendance à une corrélation linéaire directe entre la charge virale et la durée de séjour aux SI et la durée d'intubation, sans cependant atteindre un niveau significatif d'un point de vue statistique ( $p=0.18$  et  $0.23$  respectivement).

Ces résultats ne permettent cependant pas de distinguer si les charges virales détectées reflètent une réplication locale induite par des facteurs déclenchants irritatifs ou par un effet favorisant la broncho-aspiration. Ils permettent encore moins de distinguer si HSV joue un rôle pathogène au niveau des voies respiratoires ou s'il n'est qu'un marqueur de la sévérité de la condition des patients.

### Relation entre la charge virale et les événements « pro-inflammatoires »

Par la suite, la relation de la charge virale en fonction des observations réalisées à la bronchoscopie concomitante au prélèvement a été examinée. L'ensemble des prélèvements a été accompagné d'une bronchoscopie, à l'exception d'un échantillon. Ces bronchoscopies ont mis en évidence soit d'une part un status sans particularité, soit d'autre part un status inflammatoire, avec rougeur et œdème des bronches. La bronchoscopie inflammatoire pouvait également s'accompagner de sécrétions mucoïdes ou purulentes, ainsi que de lésions vésiculaires, ulcérées ou érosives dans quelques cas. Ces dernières données n'ont cependant pas été étudiées d'un point de vue statistique et nous nous sommes restreints à une analyse descriptive de ces sous-groupes, ceci dû au nombre réduit de bronchoscopies remplissant ces conditions, laissant peu de chance d'observer des résultats significatifs.



### Charge virale et Status bronchoscopique

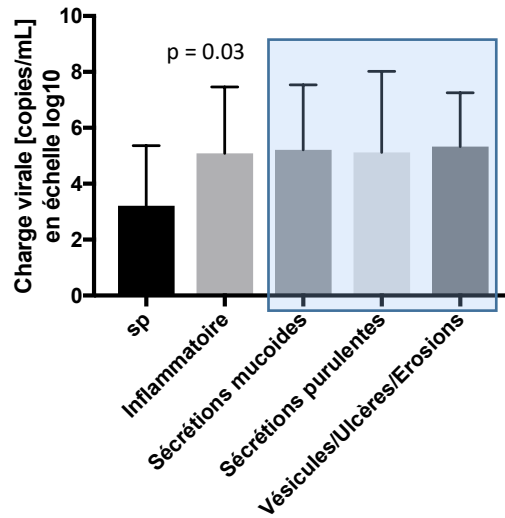


Figure 11 - Charge virale en fonction du résultat de l'examen bronchoscopique (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique) entre le status sans particularité vs inflammatoire)

Une différence significative de charge virale a été observée lorsque le status endoscopique rapportait une inflammation par rapport aux bronchoscopies sans particularité (médiane : 2.41 vs 5.06 ;  $p=0.03$ ). Il semble toutefois que le type d'inflammation ou de lésions retrouvées n'influence pas la charge, au vu de l'absence de variation notable entre les différents sous-groupes. A noter, même en présence de lésions suggestives d'herpès, on ne trouve pas de charge virale nettement supérieure par rapport aux autres status inflammatoires.

La durée d'hospitalisation, de séjour aux SI et d'intubation ont été évaluées en fonction de ces mêmes paramètres.

### Durée d'hospitalisation et Status bronchoscopique

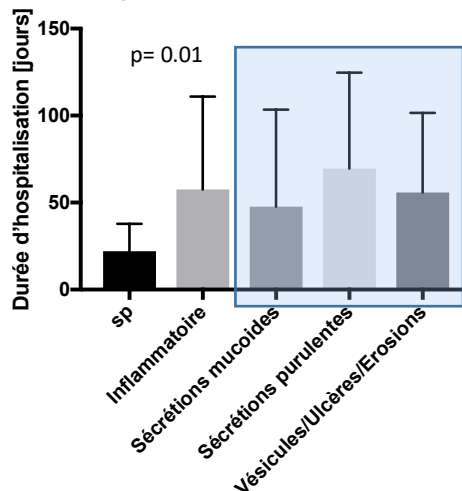


Figure 12 - Durée d'hospitalisation en fonction du résultat de l'examen bronchoscopique (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique) entre le status sans particularité vs inflammatoire)

### Durée de séjour aux SI et Status bronchoscopique

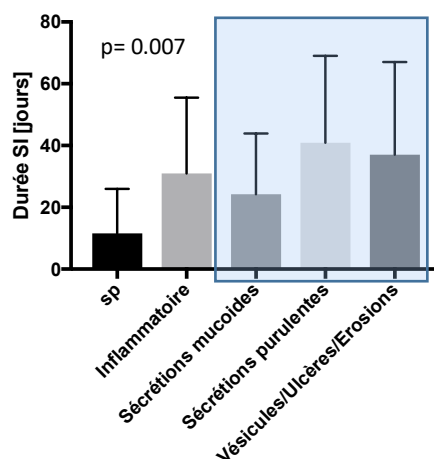


Figure 13 - Durée de séjour aux soins intensifs en fonction du résultat de l'examen bronchoscopique (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique) entre le status sans particularité vs inflammatoire)

### Durée d'Intubation et Status bronchoscopique

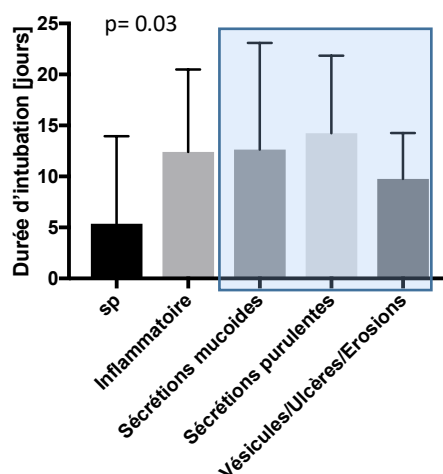


Figure 14 - Durée d'intubation en fonction du résultat de l'examen bronchoscopique (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique) entre le status sans particularité vs inflammatoire)

Pour les patients avec une bronchoscopie révélant un status inflammatoire, la durée d'hospitalisation semblait plus longue que pour ceux avec des examens sans particularité (médiane : 22 vs 42 jours ;  $p=0.01$ ). A nouveau, il ne semble pas qu'il y ait de variation entre les différents sous-groupes.

Ces résultats sont superposables à l'analyse des durées de séjour aux soins intensifs, à savoir une durée prolongée dans les cas d'examens inflammatoires (médiane : 6 vs 26 jours ;  $p=0.007$ ) et sans variation selon le type d'inflammation ou de lésions retrouvées.

A nouveau, les examens bronchoscopiques inflammatoires présentent une corrélation avec une durée d'intubation plus longue par rapport aux examens normaux (médiane : 0 vs 11.5 jours ;  $p=0.03$ ), et les sous-groupes ne se distinguent pas.

Dans ce contexte, nous pouvons relever le fait qu'il semble exister une relation entre la charge virale et le status inflammatoire que présente les patients, et que ces deux caractéristiques sont également corrélées à la présentation clinique et la morbidité exprimées par ceux-ci.

L'observation endoscopique du status inflammatoire est une description macroscopique de l'état des voies respiratoires. Dans 32 bronchoscopies (74%), nous disposons d'une caractérisation cytologique permettant une analyse de la relation entre inflammation microscopique et réplication virale.

Différents groupes en fonction des observations de la cytologie ont été formés : sans particularité (c'est-à-dire sans augmentation de la cellularité), ou avec augmentation de la cellularité, avec prédominance de polynucléaires, avec prédominance lymphocytaire, et avec présence d'inclusions (celles-ci présentaient systématiquement une prédominance de polynucléaires associées). A chaque fois le groupe défini avec une manifestation inflammatoire cytologique a été comparé avec le groupe ayant une cytologie sans particularité. Il est important de souligner que par la présence de trois comparaisons pour une même analyse, le seuil de significativité est réduit à  $p=0.017$  selon la correction de Bonferroni.

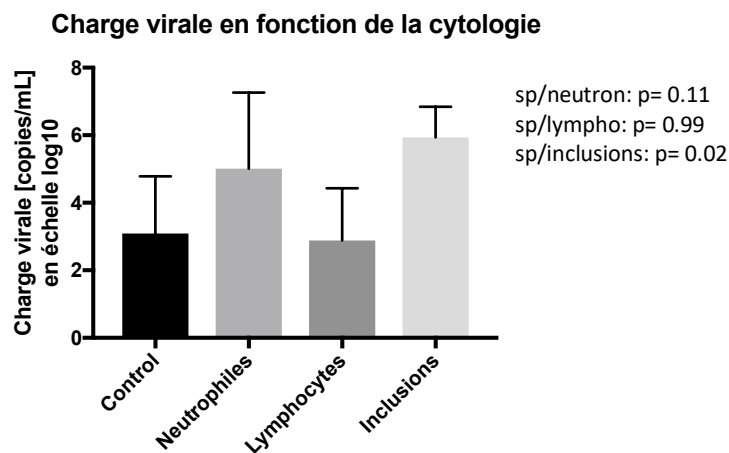


Figure 15 - Charge virale en fonction du résultat de l'examen cytologique (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique) entre le status sans particularité et chaque condition étudiée) A noter la présence de 3 comparaisons et d'un seuil de significativité à 0.017 selon la correction de Bonferroni

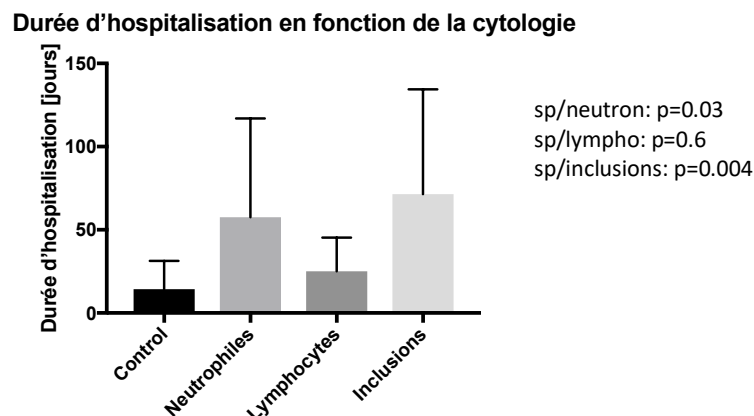


Figure 16 - Durée d'hospitalisation en fonction de l'examen cytologique (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique) entre le status sans particularité et chaque condition étudiée) A noter la présence de 3 comparaisons et d'un seuil de significativité à 0.017 selon la correction de Bonferroni

### Durée de séjour aux SI en fonction de la cytologie

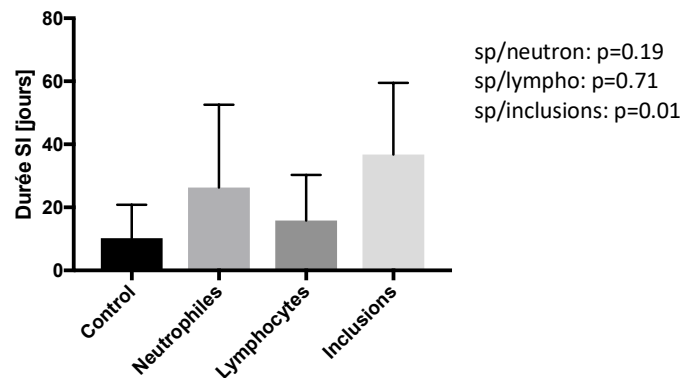


Figure 17 - Durée de séjour aux soins intensifs en fonction du résultat de l'examen cytologique (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique) entre le status sans particularité et chaque condition étudiée) A noter la présence de 3 comparaisons et d'un seuil de significativité à 0.017 selon la correction de Bonferroni

### Durée d'intubation en fonction de la cytologie

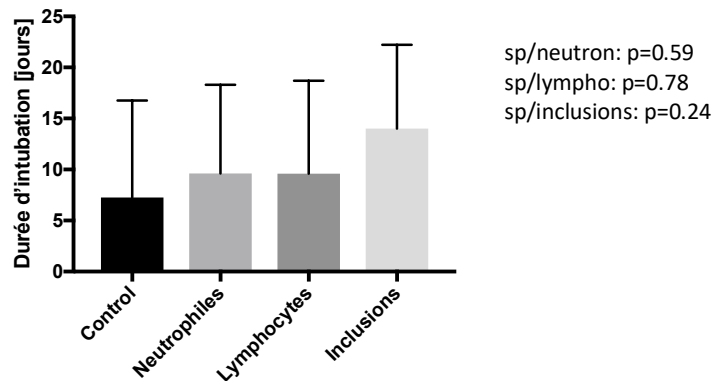


Figure 18 - Durée d'intubation en fonction de l'examen cytologique (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique) entre le status sans particularité et chaque condition étudiée) A noter la présence de 3 comparaisons et d'un seuil de significativité à 0.017 selon la correction de Bonferroni

Concernant la charge virale en fonction du résultat obtenu à la cytologie, une tendance à une charge plus élevée dans les cas présentant une prédominance de polynucléaires a pu être relevée, sans que cela ne soit significatif (médiane : 5.2 vs 2.9;  $p=0.11$ ). Une association entre charge virale élevée et présence d'inclusions se présente plus nettement (médiane : 2.9 vs 6.0 ;  $p=0.02$ ). Aucune association avec une prédominance lymphocytaire n'a été relevée.

Une durée d'hospitalisation plus longue est observée chez les patients avec une prédominance de neutrophiles (médiane : 9 vs 39 jours ;  $p=0.03$ ), ainsi qu'avec la présence d'inclusions, significativement cette fois (médiane : 9 vs 49 jours ;  $p=0.004$ ), tandis qu'une telle différence n'est pas observée chez les patients avec prédominance lymphocytaire.

La durée de séjour en soins intensifs semble plus élevée chez les patients ayant présenté des inclusions (médiane : 27 vs 8 jours ;  $p=0.01$ ). C'est une tendance que l'on retrouve chez les patients avec une prédominance de polynucléaires, sans valeur significative (médiane : 8 vs 25 jours ;  $p=0.19$ ), mais non chez les patients avec prédominances lymphocytaire. Quant à la durée d'intubation, aucune différence n'est observée.

Dès lors, ces observations rejoignent la conclusion présentée précédemment, à savoir qu'il semble exister une relation entre charge virale, inflammation et morbidité.

La consommation de tabac a également été étudiée dans le cadre des événements pro-inflammatoires. Est considéré comme fumeur dans cette étude tout patient à plus de 10 UPA.

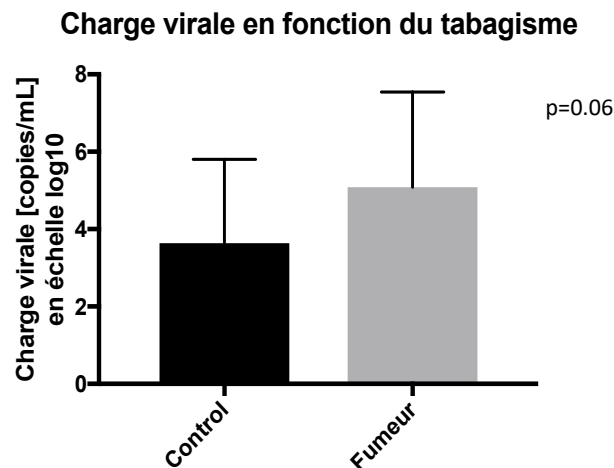


Figure 19 - Charge virale en fonction du tabagisme (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique))

A propos des patients tabagiques, une tendance quasiment significative à une charge virale plus élevée se retrouve chez les fumeurs (médiane : 5.43 vs 2.79 ; p=0.06). Par contre, l'ensemble des autres paramètres, que ce soit la durée d'hospitalisation, de séjour aux SI, d'intubation ou la mortalité, ne semble pas influencés par le tabagisme.

La CRP le jour du prélèvement a été mesurée, afin de compléter l'évaluation du status inflammatoire local par une donnée systémique. Aucune corrélation entre la charge virale et la CRP n'a pu être dégagée. A nouveau, l'ensemble des graphiques associés à ces résultats sont disponibles dans l'annexe de ce travail.

### **Relation entre la charge virale et la mortalité**

La relation entre la charge virale et le taux de décès chez ces patients a été considérée. Aucune corrélation n'a pu être établie, ni même une tendance.

En outre, aucun lien entre mortalité et pneumonie ou présence d'une co-infection bactérienne n'a pu être mis en évidence, de même concernant les co-morbidités étudiées.

Finalement, aucune corrélation entre la mortalité et les observations bronchoscopiques ou cytologiques n'a pu être démontrée.

### **Relation entre la charge virale et co-morbidités**

Un certain nombre de co-morbidités ont été analysées. Ainsi, les patients présentant une immunosuppression, une néoplasie, une BPCO ou ayant été greffé au niveau pulmonaire n'ont pas présenté de relation entre ces conditions et la charge virale.

### **Relation entre la charge virale et pneumonie**

Dans ce collectif, une majorité a développé une pneumonie. Toutefois, les données recueillies ne permettent pas de démontrer une charge virale plus élevée chez les patients présentant cette atteinte. Pour approfondir l'analyse, les patients atteints de pneumonie et chez qui aucune co-infection bactérienne n'a été retrouvée à la microbiologie ont été examinés et ne présentaient également pas non plus une charge plus élevée. A contrario, la présence d'une co-infection pulmonaire bactérienne, mise en évidence à la microbiologie, n'a pas montré de relation avec la charge virale que présentait les patients.

## Relation entre la charge virale et l'administration d'un traitement spécifique

La présence d'un traitement immunosuppresseur ne s'accompagne pas d'une charge virale plus élevée chez les patients qui en ont reçu. Il en va de même pour les radio-chimiothérapies et les traitements de corticostéroïdes, où l'on retrouve même une tendance à une charge plus faible chez les patients traités ( $p=0.07$ ). La charge virale en fonction de la dose de corticostéroïdes reçues a été investiguée. La dose a été standardisée en mg/j, avec comme étalon la prednisone. A nouveau, il semble qu'il n'y ait aucun lien entre une charge élevée et la dose de corticostéroïdes.

Seize patients ont bénéficié d'un traitement à l'acyclovir durant leur hospitalisation (37%). Une durée d'hospitalisation (médiane: 23 vs 49 jours ;  $p= <0.0001$ ), de séjour aux SI (médiane: 8.5 vs 32.5 jours ;  $p= <0.0001$ ) et d'intubation (médiane: 3 vs 12 jours ;  $p=0.03$ ) plus longue ont été observées chez les patients ayant reçu un traitement à l'acyclovir. Seule la mortalité ne semble pas différer entre les patients traités ou non.

### Durée Hospitalisation en fonction d'un traitement à l'Acyclovir

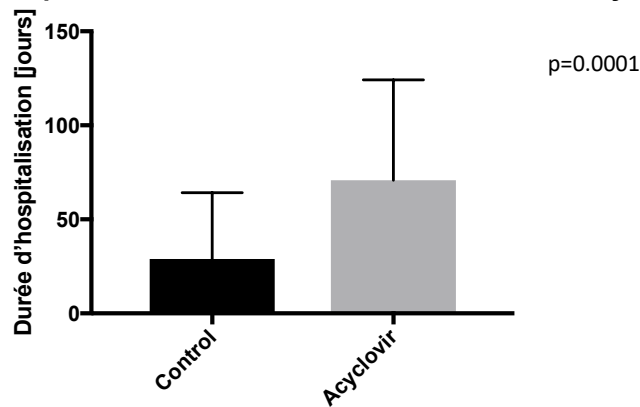


Figure 20 - Durée d'hospitalisation en fonction de l'octroi d'un traitement d'acyclovir (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique))

### Durée de séjour aux SI en fonction d'un traitement à l'Acyclovir

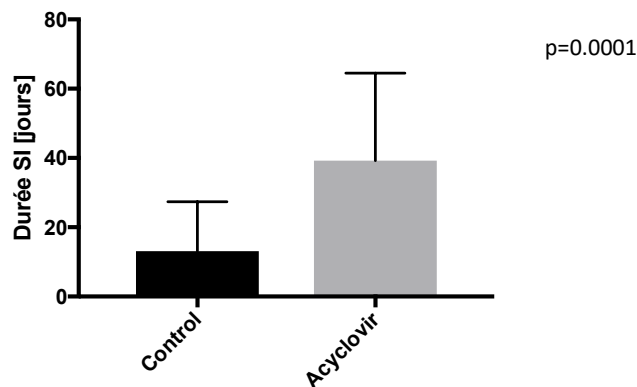


Figure 21 - Durée de séjour aux soins intensifs en fonction de l'octroi d'un traitement à l'acyclovir (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique))

### Durée d'intubation en fonction d'un traitement à l'Acyclovir

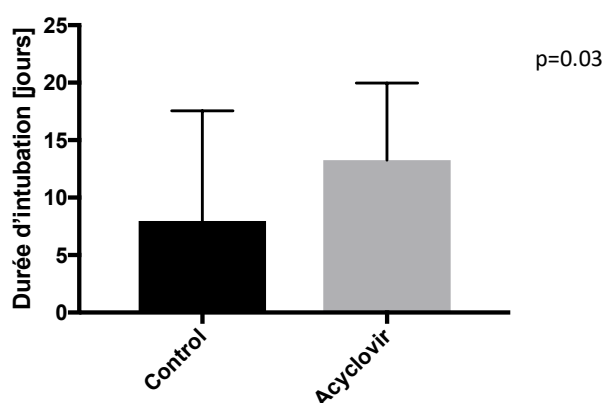


Figure 22 -Durée d'intubation en fonction de l'octroi d'un traitement à l'acyclovir (Comparaison par le test de Mann-Whitney (test non-paramétrique))

Les 4 patients de notre collectif ayant bénéficié de deux prélèvements (10%) permettant un suivi longitudinal de la charge virale ont été examinés. Ainsi, 3 d'entre eux ont reçu de l'acyclovir après réception des résultats de la PCR pour HSV (75%). Le deuxième prélèvement a permis de mettre en évidence une diminution de la charge virale dans les 3 cas (charge virale en échelle logarithmique décimale : 9.85 vs 8.45, après 2 jours de traitement ; 6.35 vs 6.14, après 3 jours de traitement ; 7.34 vs 1.68, après 8 jours de traitement), mais avec un status bronchoscopique inflammatoire inchangé. A noter que dans le cas du seul patient non traité, la charge virale a drastiquement augmenté (4.66 vs 7.45, après 4 jours).

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Tout d'abord, il convient de s'attarder un instant sur les caractéristiques du collectif qui remplissait les critères pour rejoindre cette étude. En effet, comme nous avons pu le constater dans le relevé de nos résultats, la proportion de patients ayant bénéficié d'un passage par les soins intensifs (77%) et/ou d'une procédure d'intubation (67%) représente une part conséquente de ceux-ci. Bien qu'il n'ait pas été possible d'intégrer un score dans cette étude afin de mesurer la gravité des affections des patients, ces marqueurs indirects soulignent le degré de sévérité que présente ceux-ci. La mortalité élevée durant l'hospitalisation (36%) et la durée moyenne d'hospitalisation d'ailleurs confirment la condition précaire des patients de ce collectif. L'ensemble de ces caractéristiques démontre une morbidité ainsi qu'une mortalité importantes chez ces patients, présentant en fait des pathologies graves dans la plupart des cas. Ces constats présentent toutefois un biais. De par l'absence de patients avec résultats négatifs pour HSV dans le design de l'étude, il n'est pas possible de comparer la sévérité de l'état de nos patient avec HSV détecté dans les voies respiratoires basses, par rapport à des patients n'ayant pas de HSV dans ce type de prélèvements.

Le deuxième constat pouvant être avancé est l'apparente relation temporelle entre les concentrations virales retrouvées et les différentes caractéristiques de l'hospitalisation. En effet, il semble qu'une charge élevée soit corrélée avec une durée d'hospitalisation, de séjour aux SI et d'intubation prolongée. Toutefois, ce sont des résultats à prendre avec prudence, ces corrélations n'atteignant pas un niveau statistiquement significatif. Cette observation pourrait signifier que l'infection ou la réactivation est croissante avec le temps, tout du moins en l'absence de traitement adéquat. Cependant, la probabilité qu'une bronchoscopie soit effectuée augmente avec la durée d'hospitalisation et la sévérité de l'état du patient, pouvant ainsi introduire un biais. Il se pourrait aussi que la charge virale croissante avec le temps reflète l'aggravation de l'état général, voire (voir plus loin) de l'état inflammatoire du patient.

La variable de l'intubation introduit une nouvelle complexité : cette procédure augmente le risque de lésions endotrachéales et est très irritative (35), ce qui pourrait favoriser la survenue d'infection ou de réactivation du virus. Certains patients ont bénéficié du prélèvement peu de temps après l'intubation (moins de 5 jours), et dans ces cas précis, nous avons retrouvé une tendance à une charge plus élevée chez les patients avec un intervalle court entre l'intubation et le prélèvement. Ceci est compatible avec l'hypothèse selon laquelle une infection contigüe liée au geste survient, et que l'irritation locale induit la réplication virale dans les voies respiratoires, qui par la suite diminue. Des charges élevées ont toutefois également été retrouvées chez des patients qui avaient été intubés depuis une longue période. La question de la pathogenèse reste dès lors ouverte. La théorie de la réactivation oro-pharyngée avec aspiration et infection contigüe dans le cas des patients intubés demeure la plus plausible, mais au vu de la présence d'ADN viral sur une longue période après l'intubation, ou de sa présence sans geste invasif également, l'hypothèse de l'infection hématogène ne peut être exclue. De même, une réactivation au niveau pulmonaire par le nerf vague est toujours envisageable.

Aucune des observations ci-dessus ne permet cependant de statuer sur un potentiel rôle pathogène du virus. En effet, celui-ci pourrait tout aussi bien s'avérer être un marqueur de sévérité de la maladie sous-jacente, tout comme l'un des responsables de l'état clinique du patient.

Concernant la relation entre la charge virale et les facteurs de morbidité étudiés, nous avons pu montrer de manière significative qu'une charge élevée était associée à un plus haut risque de passage aux soins intensifs et/ou à une intubation durant l'hospitalisation. Ces observations concordent avec les caractéristiques relevées chez les patients ayant rempli les critères de cette étude et évoquées en début de discussion, c'est-à-dire à une morbidité importante chez les patients avec HSV détectable dans les voies respiratoires basses. De plus, l'analyse des rapports bronchoscopiques en fonction de la charge démontre une tendance à une charge plus élevée chez les patients avec un status bronchoscopique pathologique, avec également une morbidité augmentée chez ceux présentant une inflammation. La même tendance non-significative est obtenue dans une moindre mesure avec l'évaluation microscopique des échantillons. On retrouve là encore une charge virale et une morbidité importante chez les patients avec des prélèvements présentant des neutrophiles, tendance encore plus marquée lorsque l'on retrouve des inclusions virales. Il semble ainsi qu'une relation puisse être établie entre la charge virale, le status inflammatoire et les marqueurs de morbidité. A noter cependant que nous n'avons pas été en mesure de retrouver une relation entre la mortalité et ces mêmes facteurs.

Ceci soulève la question de la nature du lien entre ces trois caractéristiques. En effet, bien qu'une corrélation ait pu être démontrée, le lien causal entre ces facteurs reste indéterminé. Ainsi, est-ce la charge virale élevée qui est responsable de la morbidité de ces patients, ou l'inflammation ? De même, l'inflammation est-elle induite par la charge virale ou est-elle un facteur favorisant la prolifération du virus ? Est-ce bien charge virale et inflammation qui sont responsables de la morbidité, ou ne constituent-ils que des marqueurs de sévérité chez des patients présentant déjà une pathologie grave, véritable moteur de l'inflammation et de la réplication virale ?





Figure 23 - Relation entre charge virale, inflammation et morbidité?

Quelques observations découlant de cette étude permettent d'avancer des hypothèses. Tout d'abord, nous n'avons pas détecté de relation probante entre la présence d'une pneumonie objectivée et une charge élevée. Ceci soutient plutôt la thèse du marqueur de sévérité par rapport à celui du rôle pathogène. En effet, on se serait attendu à des charges plus conséquentes chez les patients présentant une pneumonie si HSV y jouait un rôle contributif, surtout chez ceux pour qui un agent bactérien n'a pas pu être mis en évidence.

Concernant le tabagisme, un autre facteur de risque pro-inflammatoire étudié, il semble que la charge soit plus élevée chez les fumeurs. Les patients tabagiques entretenant une inflammation chronique au niveau de leurs bronches, ces observations nous confortent dans l'hypothèse que la charge élevée soit liée à un terrain inflammatoire favorable à la prolifération de HSV, plutôt qu'à une inflammation induite par la réplication de HSV.

Au sujet du status inflammatoire systémique, étudié à travers la CRP, l'absence de corrélation avec la charge virale oriente vers une absence de rôle favorisant la réplication. Toutefois, la CRP étant influencée par un grand nombre de facteurs, il est ambitieux d'en tirer des conclusions définitives.

Il est de ce fait difficile de statuer sur le rôle pathogène de HSV dans les voies respiratoires basses. D'une part, nos observations pourraient signifier que les charges faibles ne représentent qu'une contamination par broncho-aspiration de contenu orale, au vu de la morbidité moindre, et que de ce fait les charges élevées ont un rôle étiologique à l'état clinique du patient. D'autre part, une charge élevée pourrait simplement correspondre à un marqueur de sévérité, l'état clinique du patient étant diminué, le terrain est favorable à une prolifération du virus. Il est ainsi difficile de s'avancer : la présence de HSV est-elle la cause, ou une conséquence de l'état clinique ?

L'absence de relation avec des traitements immunosuppresseurs suggère que l'état immunologique du patient n'influence la charge virale que dans une moindre mesure. Ceci est une observation intéressante dans la mesure où elle pourrait représenter un argument en faveur de l'abstention de la réalisation d'examen virologiques avant l'introduction d'un traitement immunosuppresseur, notamment d'une corticothérapie.

Finalement, concernant les patients ayant reçu un traitement à l'acyclovir, une morbidité plus élevée a étonnamment été retrouvée chez ceux-ci. La raison d'une pareille observation est sans doute que les patients chez qui l'on envisage ce type de traitement sont ceux présentant les pathologies les plus graves, et que l'acyclovir a sans doute été administré trop tardivement. En effet, dans la littérature, on propose un traitement dans les lésions oro-génitales uniquement les deux premiers jours de symptomatologie, avec au mieux une diminution de la durée de ceux-ci d'un jour comme résultat. Ces patients ont reçu sans doute ce traitement à un stade avancé de leur maladie, et, en l'absence d'études randomisées dans ce type de situation, on peut raisonnablement penser que les bénéfices sont minimes quant à la morbidité. Toutefois, 3 des 4 patients ayant eu deux prélèvements ont reçu ce traitement, et une diminution variable de la charge virale après le début du traitement a pu être objectivée chez l'ensemble de ceux-ci, sans toutefois de changement apparent à la bronchoscopie

associée. Cette observation est compatible avec l'hypothèse que HSV n'a pas de rôle pathogène, tout du moins dans ces cas particuliers.

En conclusion, il semble qu'une corrélation existe entre la charge virale d'HSV dans les voies respiratoires basses, le status inflammatoire locale et la morbidité. Ceci est compatible avec l'hypothèse que les petites charges sont liées à une contamination, vraisemblablement par broncho-aspiration, alors que les grandes ont un lien avec la clinique présentée. Le lien causal reste toutefois incertain. Certains éléments de notre étude, tels que l'absence de charge plus élevée chez les patients avec une pneumonie objectivée, la corrélation entre tabagisme et charge élevée, sans augmentation de la morbidité chez ces patients, ou l'absence de corrélation avec la CRP, suggère que la présence de HSV soit plutôt un marqueur de sévérité de la maladie qu'un agent étiologique. Concernant la pathogenèse de l'affection, l'infection contigüe semble demeurer l'hypothèse principale, sans pour autant nier la possibilité d'une infection hématogène ou d'une réactivation par le nerf vague. Finalement, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer un quelconque bénéfice de l'administration d'acyclovir chez ces patients en terme de devenir clinique, alors qu'il semble que celui-ci diminue tout de même la charge virale.

Ce travail comporte de nombreuses limites. Tout d'abord, comme déjà évoqué précédemment, il existe un biais de sélection dans la mesure où cette étude ne comporte pas de contrôles négatifs, ce qui empêche toute comparaison avec un collectif sans HSV détectable dans les voies respiratoires basses. En outre, concernant l'échantillon examiné, il y a un biais d'attrition : certains patients remplissant les critères d'inclusion à l'étude avaient signé un refus de participation à toute étude (N=4). Ceci peut nuire aux résultats de l'étude, qui voudrait intégrer l'ensemble des patients, surtout dans un contexte où le collectif reste restreint (N=39), afin de permettre d'extrapoler au mieux nos résultats et de généraliser ceux-ci. En plus du nombre limité de patients, le design même de ce travail, une étude rétrospective, constitue un biais d'information dans la mesure où celle-ci est limitée par les dossiers médicaux disponibles, et tributaire des données recueillies par les professionnels ayant pris en charge les patients. Comme décrit plus haut, il y a aussi un biais d'observation de certaines données, à savoir celles liées à la temporalité, où à l'introduction d'acyclovir. Ensuite, les patients que nous avons étudiés avaient pour la plupart de nombreuses co-morbidités, et présentaient un état clinique fortement diminué. Dans de telles conditions, il peut s'avérer difficile de savoir ce qui est responsable de la symptomatologie. Ceci nous amène à aborder le principal biais inhérent aux études, le biais de confusion : nous ne mesurons que des corrélations, il n'est pas toujours simple d'en dégager des causes ou des conséquences. Dans le cadre de ce travail, ceci se présente typiquement dans le cas de la relation mise en évidence entre charge virale, inflammation et morbidité, où il nous est toutefois difficile d'en dégager un lien de causalité.

En ce qui concerne les perspectives de recherches pour l'avenir, il serait intéressant de réaliser des études cas-contrôle à plus grande échelle, de préférence prospectives afin de récupérer les données d'intérêt de manière plus standardisée. Ce design permettrait de comparer les patients présentant un prélèvement positif pour HSV versus négatif, et d'ainsi pallier dans une certaine mesure au biais de confusion évoqué précédemment. Ces études sont en effet encore rares, et elles permettraient de mieux interpréter les résultats de recherche de virus HSV dans les prélèvements respiratoires, voire à préciser leur rôle pathogène. De plus, des études expérimentales de type test thérapeutique interventionnel afin d'étudier le potentiel curatif de l'acyclovir seraient profitables. Sous la forme d'essais randomisés contrôlés, elles pourraient permettre in fine de présenter des guidelines de prise en charge plus précises, par exemple une proposition de traitement par antiviraux pour les charges virales supérieures à une valeur seuil à déterminer. En outre, la démonstration d'une efficacité sur l'issue d'un traitement par acyclovir confirmerait la part pathogène de HSV dans la maladie du patient.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à remercier les patients sans qui l'étude n'aurait tout simplement pas pu être réalisée. Ces remerciements vont également aux cliniciens ayant récolté les données cliniques sur ces patients, ainsi que les prélèvements, et qui nous ont permis d'effectuer ces analyses.

Je remercie aussi le Dr. Onya Opota, du laboratoire de diagnostic moléculaire de l'Institut de microbiologie du CHUV, pour son soutien durant ce travail au niveau des méthodes d'analyses de laboratoire, ainsi qu'à l'équipe du laboratoire, qui récupère l'ensemble des données des patients et assure leur conservation.

Je tiens à remercier mon tuteur, le Prof. Pascal Meylan, qui m'a suivi tout au long de ce projet et m'a prodigué de précieux conseils afin de réaliser ce premier travail de recherche. Je remercie aussi mon expert, le Prof. John-David Aubert, pour avoir accepté de donner de son temps pour ce travail. Mes remerciements vont également à ma famille pour leur soutien quotidien durant toute la durée de mes études.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Zuckerman AJ, éditeur. Principles and practice of clinical virology. 5th ed. Chichester: Wiley; 2004. 976 p.
2. Bünzli D, Wietlisbach V, Barazzoni F, Sahli R, Meylan PRA. Seroepidemiology of Herpes Simplex virus type 1 and 2 in Western and Southern Switzerland in adults aged 25-74 in 1992-93: a population-based study. *BMC Infect Dis.* 17 mars 2004;4:10.
3. Corey L. Infections dues au virus herpès simplex. In: Harrison - Principes de Médecine Interne. 18<sup>e</sup> éd. Médecine Sciences Publications; 2013. (Traités).
4. Simoons-Smit AM, Kraan EM, Beishuizen A, van Schijndel RJS, Vandenbroucke-Grauls CM. Herpes simplex virus type 1 and respiratory disease in critically-ill patients: real pathogen or innocent bystander? *Clin Microbiol Infect.* nov 2006;12(11):1050-9.
5. Luyt C-E, Combes A, Nieszkowska A, Trouillet J-L, Chastre J. Viral infections in the ICU: *Curr Opin Crit Care.* oct 2008;14(5):605-8.
6. López-Giraldo A, Sialer S, Esperatti M, Torres A. Viral-Reactivated Pneumonia during Mechanical Ventilation: Is There Need for Antiviral Treatment? *Front Pharmacol* [Internet]. 8 nov 2011 [cité 23 févr 2017];2. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3210442/>
7. Chiche L, Forel J-M, Papazian L. The role of viruses in nosocomial pneumonia: *Curr Opin Infect Dis.* avr 2011;24(2):152-6.
8. Luyt C-É, Combes A, Trouillet J-L, Nieszkowska A, Chastre J. Virus-induced acute respiratory distress syndrome: Epidemiology, management and outcome. *Presse Médicale.* déc 2011;40(12):e561-8.
9. Luyt C-E, Bréchet N, Chastre J. What role do viruses play in nosocomial pneumonia?: *Curr Opin Infect Dis.* avr 2014;27(2):194-9.
10. Morgan HR, Finland M. Isolation of herpes virus from a case of atypical pneumonia and erythema multiforme exudativum with studies of four additional cases. *Am J Med Sci.* janv 1949;217(1):92-5.
11. Graham BS, Snell JD. Herpes simplex virus infection of the adult lower respiratory tract. *Medicine (Baltimore).* nov 1983;62(6):384-93.
12. Tuxen DV, Cade JF, McDonald MI, Buchanan MR, Clark RJ, Pain MC. Herpes simplex virus from the lower respiratory tract in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* sept 1982;126(3):416-9.
13. Engelmann I, Gottlieb J, Meier A, Sohr D, Ruhparwar A, Henke-Gendo C, et al. Clinical relevance of and risk factors for HSV-related tracheobronchitis or pneumonia: results of an outbreak investigation. *Crit Care.* 2007;11(6):R119.
14. Linszen CFM, Jacobs JA, Stelma FF, van Mook WNKA, Terporten P, Vink C, et al. Herpes simplex virus load in bronchoalveolar lavage fluid is related to poor outcome in critically ill patients. *Intensive Care Med.* déc 2008;34(12):2202-9.
15. Costa C, Sidoti F, Saldan A, Sinesi F, Balloco C, Simeone S, et al. Clinical impact of HSV-1 detection in the lower respiratory tract from hospitalized adult patients. *Clin Microbiol Infect.* août 2012;18(8):E305-7.
16. Bonizzoli M, Arvia R, di Valvasone S, Liotta F, Zakrzewska K, Azzi A, et al. Human herpesviruses respiratory infections in patients with acute respiratory distress (ARDS). *Med Microbiol Immunol (Berl).* août 2016;205(4):371-9.
17. Pica F, Ciotti M, Maurici M, Buè C, Nardi P, Lucà G, et al. Clinical features and outcome of hospitalized patients with HSV-1 DNA in the lower respiratory tract. *New Microbiol.* avr 2017;40(2):107-12.
18. Bruynseels P, Jorens PG, Demey HE, Goossens H, Pattyn SR, Elseviers MM, et al. Herpes simplex virus in the respiratory tract of critical care patients: a prospective study. *The*

Lancet. nov 2003;362(9395):1536-41.

19. Luyt C-E, Combes A, Deback C, Aubriot-Lorton M-H, Nieszkowska A, Trouillet J-L, et al. Herpes Simplex Virus Lung Infection in Patients Undergoing Prolonged Mechanical Ventilation. *Am J Respir Crit Care Med.* mai 2007;175(9):935-42.
20. De Vos N, Van Hoovels L, Vankeerberghen A, Van Vaerenbergh K, Boel A, Demeyer I, et al. Monitoring of herpes simplex virus in the lower respiratory tract of critically ill patients using real-time PCR: a prospective study. *Clin Microbiol Infect.* avr 2009;15(4):358-63.
21. Scheithauer S, Manemann AK, Krüger S, Häusler M, Krüttgen A, Lemmen SW, et al. Impact of herpes simplex virus detection in respiratory specimens of patients with suspected viral pneumonia. *Infection.* oct 2010;38(5):401-5.
22. Saugel B, Jakobus J, Huber W, Hoffmann D, Holzappel K, Protzer U, et al. Herpes simplex virus in bronchoalveolar lavage fluid of medical intensive care unit patients: Association with lung injury and outcome. *J Crit Care.* avr 2016;32:138-44.
23. van den Brink J-W, Simoons-Smit AM, Beishuizen A, Girbes ARJ, Strack van Schijndel RJM, Groeneveld ABJ. Respiratory herpes simplex virus type 1 infection/colonisation in the critically ill: marker or mediator? *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* mai 2004;30(1):68-72.
24. Ramsey PG. Herpes Simplex Virus Pneumonia: Clinical, Virologic, and Pathologic Features in 20 Patients. *Ann Intern Med.* 1 déc 1982;97(6):813.
25. Aisenberg G, Torres H, Tarrand J, Safdar A, Bodey G, Chemaly RF. Herpes simplex virus lower respiratory tract infection in patients with solid tumors: HSV Pneumonia With Solid Tumors. *Cancer.* 1 janv 2009;115(1):199-206.
26. Tuxen DV. Prevention of lower respiratory herpes simplex virus infection with acyclovir in patients with adult respiratory distress syndrome. *Chest.* juill 1994;106(1 Suppl):28S-33S.
27. Traen S, Bochanen N, Ieven M, Schepens T, Bruynseels P, Verbrugge W, et al. Is acyclovir effective among critically ill patients with herpes simplex in the respiratory tract? *J Clin Virol.* juill 2014;60(3):215-21.
28. Rémic S française de microbiologie S de M clinique G. Rémic: référentiel en microbiologie médicale. Société Française de Microbiologie - SFM; 2015. 854 p.
29. TaqMan. In: Wikipédia [Internet]. 2017 [cité 26 nov 2018]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=TaqMan&oldid=142084304>
30. Jatou Katia Dr, Greub Gilbert Dr. PCR en microbiologie : de l'amplification de l'ADN à l'interprétation du résultat [Internet]. *Revue Médicale Suisse.* [cité 5 nov 2018]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2007/RMS-106/32181>
31. Meylan S, Robert D, Estrade C, Grimbuehler V, Péter O, Meylan PR, et al. Real-time PCR for type-specific identification of herpes simplex in clinical samples: Evaluation of type-specific results in the context of CNS diseases. *J Clin Virol.* 1 févr 2008;41(2):87-91.
32. Greub G, Sahli R, Brouillet R, Jatou K. Ten years of R&D and full automation in molecular diagnosis. *Future Microbiol.* mars 2016;11(3):403-25.
33. Levy ML, Jeune IL, Woodhead MA, Macfarlane JT, Lim WS. Primary care summary of the British Thoracic Society Guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: 2009 update Endorsed by the Royal College of General Practitioners and the Primary Care Respiratory Society UK. *Prim Care Respir J.* 15 févr 2010;19(1):21-7.
34. Graphpad Prism. Graphpad Software, Inc;
35. Netgen. Influence de la ventilation mécanique sur la capacité du poumon à se défendre contre les infections [Internet]. *Revue Médicale Suisse.* [cité 22 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2004/RMS-2499/24117>