

LE DOSSIER

Ceil et herpès

Diagnostic virologique des uvéites liées aux “Herpes Viridæ”

RÉSUMÉ : Le diagnostic des infections par les virus *Herpes* responsables d'uvéites aiguës ou chroniques repose sur des techniques directes de détection des acides nucléiques viraux et des techniques indirectes sérologiques, pratiquées sur des échantillons d'humeur aqueuse. Ces techniques ont une bonne sensibilité, limitée essentiellement par les faibles volumes de liquide oculaire disponibles et une excellente spécificité. Les techniques de PCR sont utiles au diagnostic aux phases aiguës des uvéites antérieures et des rétinites, et la quantification de la charge virale présente un intérêt dans le suivi thérapeutique. Le dosage des IgG spécifiques dans le sérum et l'humeur aqueuse permet de mettre en évidence l'existence d'une synthèse intraoculaire spécifique du virus causal aux phases tardives de l'infection.

→ F. ROZENBERG

Pôle Biologie-Pathologie-Pharmacie,
Service de Virologie,
Hôpital Cochin,
PARIS.

Quatre virus de la famille des *Herpes Viridæ* sont les principales causes des uvéites et rétinites virales dans les pays industrialisés : les virus *Herpes Simplex* type 1 (HSV-1) et type 2 (HSV-2), le virus de la varicelle et du zona (VZV) et le cytomégalovirus (CMV). Le diagnostic des infections liées à ces virus est bien établi, mais son application aux fluides oculaires, difficilement automatisable, relève encore de laboratoires spécialisés. Ce diagnostic repose sur la détection des acides nucléiques viraux et/ou des IgG spécifiques dans l'humeur aqueuse. On privilégie les techniques directes dérivées de la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR aux stades précoces ou aigus de l'infection, et les techniques indirectes sérologiques aux phases tardives ou chroniques.

Intérêt et limites du diagnostic direct

1. Principes généraux de la PCR

Les techniques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permettent de

décélérer les génomes viraux présents en faible quantité dans un échantillon biologique. La PCR est une réaction enzymatique in vitro qui consiste en l'amplification exponentielle d'une courte séquence du génome viral, à l'aide de deux courts oligonucléotides de synthèse bordant de part et d'autre cette séquence, et d'une enzyme, une polymérase thermorésistante. La PCR pratiquée sur des extraits d'humeur vitrée ou aqueuse est très sensible dans le diagnostic des rétinites et nécroses rétinienne, mais aussi des uvéites antérieures aiguës et chroniques au cours des poussées.

2. Interprétation

Les *Herpes Virus* ont une particularité biologique, ils persistent à l'état latent dans l'organisme après la primo-infection. Cependant, les *Herpes Virus* neurotropes HSV-1, HSV-2 et VZV établissent leur latence dans les neurones ganglionnaires, et le CMV dans certaines cellules sanguines et épithéliales glandulaires. L'humeur aqueuse et le vitré n'hébergent aucun des *Herpes Virus* sous leur forme latente. La présence du génome viral de l'un de ces virus dans l'humeur

LE DOSSIER

Œil et herpès

aqueuse ou le vitré est donc toujours secondaire à une réplication virale, témoignant d'une infection active productive survenue de façon récente. La spécificité des tests est donc excellente. La simple présence d'ADN des *Herpes Virus* ne donne cependant aucune indication sur le pouvoir infectieux du virus : c'est une notion à prendre en compte au cours du suivi évolutif des patients sous traitement.

3. Méthodes, sensibilité

Les méthodes d'extraction des acides nucléiques à partir des échantillons biologiques sont actuellement excellentes. La sensibilité de la PCR dépend essentiellement du volume de liquide biologique effectivement analysé. Les volumes d'humeur aqueuse disponibles sont faibles (souvent $\leq 50 \mu\text{L}$), et l'on doit réaliser plusieurs réactions de PCR à partir du prélèvement initial : on recherche donc la présence de génome viral dans l'équivalent de 10-20 μL de liquide intraoculaire. Dans ce cas, même si la sensibilité extrême de la PCR permet de déceler dans le meilleur des cas 5 à 10 copies de génome viral dans un échantillon biologique, on calculera facilement que la charge virale initiale dans l'échantillon doit être au moins supérieure à 250-1 000 copies/mL pour être décelée. Or nous ne savons pas quelle quantité minimale de chacun des *Herpes Virus* est capable de déclencher une poussée inflammatoire. Cette limite de sensibilité est probablement liée à un certain nombre de résultats négatifs dans des contextes cliniques très évocateurs d'uvéïte herpétique.

4. PCR en temps réel et quantification

La quantification du nombre de copies du génome viral est réalisée le plus souvent par des techniques de PCR en temps réel, selon les technologies de type TaqMan ou de transfert d'énergie de fluorescence (FRET). Une gamme de calibration réalisée à partir de dilutions

croissantes d'une quantité connue de copies de génomes viraux permet d'établir avec précision le nombre de copies présentes dans un échantillon analysé. En raison des faibles volumes de prélèvement disponibles, la sensibilité maximale ne peut souvent pas être abaissée en dessous de 500-1 000 copies/mL d'échantillon (cf. ci-dessus).

5. Epidémiologie moléculaire et génotypage

Pour chacun des *Herpes Virus*, de nombreuses souches sont présentes dans la population. On peut les distinguer par l'analyse de la séquence nucléotidique de régions variables, et étudier la prévalence de certains variants dans une population, à la recherche d'une association préférentielle de certains "génotypes" viraux à certaines pathologies. Ces études visent à étayer l'hypothèse de variants viraux plus "virulents", ou ayant un tropisme spécifique de tissu ou d'organe, bien que les bases moléculaires de ce tropisme ou de cette virulence dans le cas des *Herpes Virus* soient encore inconnues. Les résultats de ces travaux ne permettent pas à l'heure actuelle de démontrer de façon formelle l'existence d'une association préférentielle d'un génotype à un pouvoir pathogène accru. Cependant, ils ont mis en évidence la présence possible chez un même patient de génotypes différents du CMV dans le sang et l'humeur aqueuse, ce qui suggère, si plusieurs souches d'un même *Herpes Virus* peuvent infecter un individu, un tropisme préférentiel de certains variants.

L'analyse moléculaire des séquences virales permet d'étudier l'hypothèse d'infections nosocomiales. Cette question s'est posée dans le cas d'infections aiguës par *Herpes Simplex* au décours de greffes de cornées. Pour répondre à cette question, il faut disposer de la souche de virus source de la contamination potentielle ou de son ADN, et de la souche du patient infecté ou de son ADN. Si le

patient était déjà lui-même infecté par HSV, pour différencier une réactivation endogène d'une surinfection exogène, il faut également disposer de la souche endogène du patient. En pratique, ces conditions sont rarement réunies. En raison de la grande taille des génomes viraux, on peut plus facilement écarter l'hypothèse d'une contamination, si les courtes séquences du virus présumé source de la contamination et du virus identifié chez un patient supposé contaminé sont différentes, que la confirmer, même si ces séquences sont identiques : il faudrait pour cela analyser la totalité de la séquence des génomes viraux, ce qui est impossible. Si l'on connaît la répartition dans la population générale d'un variant viral donné, on peut tout au plus apporter un diagnostic de probabilité d'infection nosocomiale.

6. Suivi thérapeutique et analyse de la sensibilité aux antiviraux

Une fois le diagnostic de l'infection virale posé, la quantification de la charge virale intraoculaire permet de suivre l'efficacité du traitement antiviral. On dispose de peu de données sur le délai moyen de disparition de l'ADN des *Herpes Virus* des liquides intraoculaires sous l'effet des traitements antiviraux. Les quelques données disponibles sont certainement biaisées, car les prélèvements intraoculaires sont plus souvent répétés lorsque le traitement semble inefficace que lorsque les lésions guérissent. Dans notre expérience, nous avons constaté la persistance de l'ADN viral dans l'humeur aqueuse pendant plusieurs semaines au décours d'une nécrose rétinienne à VZV ou HSV. Des observations comparables ont été publiées.

Une résistance clinique au traitement antiviral peut théoriquement découler soit d'un mauvais accès de la drogue au compartiment biologique, soit d'une résistance virologique. La résistance du virus est classiquement mise en évidence par des tests phénotypiques

qui nécessitent l'isolement du virus en culture : on détermine les concentrations de la drogue antivirale qui inhibe la multiplication virale. De nombreux travaux ont permis de cartographier les mutations de résistance les plus fréquentes associées à la résistance phénotypique des *Herpes Virus* (HSV, VZV, CMV). Ces mutations siègent dans les gènes codant les enzymes cibles des traitements antiviraux : le premier code une thymidine kinase (HSV et VZV) ou une protéine à activité phospho-transférase UL97 (CMV), et le deuxième code une ADN polymérase. Lorsqu'on ne peut pas isoler le virus en culture, comme dans le cas des uvéites, on peut, à partir de l'ADN extrait des liquides intraoculaires, directement amplifier les fragments des gènes cibles, puis analyser leur séquence. Ces analyses, lourdes et coûteuses, sont encore du domaine de la recherche clinicobiologique et ne relèvent pas du diagnostic de routine, car les mutations déjà connues et associées à la résistance sont nombreuses, et siègent sur diverses portions de la séquence des gènes cibles, ce qui impose une analyse quasi totale de la séquence de ces gènes. Si l'on met en évidence une mutation non encore décrite, on ne peut différencier polymorphisme et mutation conférant la résistance sans établir des tests biologiques qui sortent du cadre de l'activité du laboratoire de diagnostic.

Intérêt et limites du diagnostic indirect

Les infections par les *Herpes Virus* sont très répandues dans la population générale : près de la moitié des adultes en France ont des anticorps sériques dirigés contre le CMV, les deux tiers contre HSV-1, plus de 90 % contre VZV et EBV. Les complications oculaires surviennent souvent à distance de la primo-infection. L'intérêt du dosage sérique des anticorps est donc limité. Cependant, le résultat négatif d'un test

sérologique permet d'éliminer de façon certaine l'étiologie présumée virale d'une uvéite. Dans notre expérience, au sein d'une population de patients adressés pour uvéite, on confirme aussi souvent une étiologie virale par une PCR positive qu'on l'infirme par une sérologie négative (10-15 % des patients). Malgré la prévalence des infections par HSV et CMV, il est donc justifié de contrôler ces sérologies au moins une fois dans l'histoire d'un patient atteint d'uvéite présumée virale.

Le dosage des anticorps dans l'humeur aqueuse a été décrit depuis les années 1950. Au décours des uvéites virales, on observe dans l'humeur aqueuse une production d'anticorps spécifiquement dirigés contre le virus causal. Pour démontrer cette synthèse intraoculaire, il faut comparer les taux d'anticorps dans l'humeur aqueuse aux taux sériques. Pour éviter toute erreur d'interprétation due à l'inflammation qui peut entraîner un transsudat protéique dans les fluides intraoculaires, on s'aide du dosage des taux d'IgG totales. Le coefficient de Goldmann-Witmer s'obtient en établissant le rapport des ratios humeur aqueuse/sérum des IgG spécifiques et des IgG totales. Un coefficient supérieur à 3 est considéré comme spécifique. Lorsqu'on ne peut pas effectuer les dosages d'IgG totales, on peut comparer les ratios humeur aqueuse/sérum des IgG spécifiques de différents agents pathogènes. Une synthèse intraoculaire est démontrée si le ratio humeur aqueuse/sérum des IgG spécifiques d'un virus est plus de trois fois supérieur au ratio des autres IgG testées.

En pratique, le diagnostic virologique apporte une aide certaine dans la prise en charge des uvéites herpétiques. Le diagnostic moléculaire est privilégié à la phase aiguë de l'atteinte oculaire, le diagnostic sérologique est intéressant à la phase tardive, au moins 10-15 jours après le début des signes cliniques.

Pour en savoir plus

1. ASANO S, YOSHIKAWA T, KIMURA H *et al.* Monitoring herpesvirus DNA in three cases of acute retinal necrosis by real-time PCR. *J Clin Virol*, 2004; 29 : 206-209.
2. BISWAS S, SURESH P, BONSHKE RE *et al.* Graft failure in human donor corneas due to transmission of herpes simplex virus. *Br J Ophthalmol*, 2000; 84 : 701-705.
3. BODAGHI B, ROZENBERG F, CASSOUX N *et al.* Nonnecrotizing herpetic retinopathies masquerading as severe posterior uveitis. *Ophthalmology*, 2003; 110 : 1737-1743.
4. BORDERIE VM, MERITET JF, CHAUMEIL C *et al.* Culture-proven herpetic keratitis after penetrating keratoplasty in patients with no previous history of herpes disease. *Cornea*, 2004; 23 : 118-124.
5. DE BOER JH, VERHAGEN C, BRUINENBERG M *et al.* Serologic and polymerase chain reaction analysis of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis. *Am J Ophthalmol*, 1996; 121 : 650-658.
6. DE GROOT-MIJNES JD, ROTHOVA A, VAN LOON AM *et al.* Polymerase chain reaction and Goldmann-Witmer coefficient analysis are complementary for the diagnosis of infectious uveitis. *Am J Ophthalmol*, 2006; 141 : 313-318.
7. GANATRA JB, CHANDLER D, SANTOS C *et al.* Viral causes of the acute retinal necrosis syndrome. *Am J Ophthalmol*, 2000; 129 : 166-172.
8. GILBERT C, BESTMAN-SMITH J, BOIVIN G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist Updat*, 2002; 5 : 88-114.
9. PEEK R, VERBRAAK F, BRUINENBERG M *et al.* Cytomegalovirus glycoprotein B genotyping in ocular fluids and blood of AIDS patients with cytomegalovirus retinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39 : 1183-1187.
10. TRAN TH, ROZENBERG F, CASSOUX N *et al.* Polymerase chain reaction analysis of aqueous humour samples in necrotising retinitis. *Br J Ophthalmol*, 2003; 87 : 79-83.
11. YIN PD, KURUP SK, FISCHER SH *et al.* Progressive outer retinal necrosis in the era of highly active antiretroviral therapy: Successful management with intravitreal injections and monitoring with quantitative PCR. *J Clin Virol*, 2007; 38 : 254-259.

L'auteur a déclaré ne pas avoir de conflits d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.