

Actualités cliniques et diagnostiques de l'herpès cornéen

P.-Y. Robert

Service d'Ophtalmologie, CHU Dupuytren, 2, avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex.
 Correspondance : P.-Y. Robert, à l'adresse ci-dessus. E-mail : pierre-yves.robert@unilim.fr
 Reçu le 18 juillet 2003. Accepté le 4 novembre 2003.

Clinical and diagnostic developments in corneal herpes

P.-Y. Robert

J. Fr. Ophtalmol., 2004; 27, 5: 524-527

The indications for keratoplasty in treating herpes keratitis are currently declining because of recent progress in diagnosis and treatment. Clinically, corneal signs may be caused by HSV reactivation or a secondary anti-HSV immune response. Corneal opacification may be acute or the expression of sequela (meta-herpetic keratitis). The virus can be detected on a corneal surface sample by direct examination or cell culture, the only way to detect an infective virus. The detection of local antibody production in the aqueous humor is an inexpensive method, indicating the local immune anti-HSV response. Detection of HSV DNA using PCR is more sensitive, but the presence of HSV DNA within corneal tissue may be more delicate to interpret. It is now proven that HSV can be transmitted through a corneal graft from donor to recipient, but no diagnostic test currently detects potentially infective corneas in eyebanks.

Key-words: HSV, herpes keratitis, viral culture, antibodies, PCR, eyebanks.

Actualités cliniques et diagnostiques de l'herpès cornéen

Les indications de kératoplastie pour kératite herpétique sont en diminution en raison des progrès dans le diagnostic et le traitement. Cliniquement, les signes peuvent être liés à la réactivation du virus, ou à la réaction immunitaire secondaire. L'opacification cornéenne peut être aiguë ou séquellaire (kératite méta-herpétique). La mise en évidence du virus peut se faire sur prélèvement de surface par examen direct ou culture sur cellules, c'est la seule façon de détecter un virus infectant. La recherche de production d'anticorps dans l'humeur aqueuse est une méthode peu coûteuse, elle témoigne de la réaction immunitaire anti-HSV. La recherche d'ADN viral par PCR est plus sensible, mais la présence d'ADN viral dans la cornée est d'interprétation équivoque. Le risque de transmission du virus du donneur au receveur de cornée est à présent prouvé, mais aucun test diagnostique ne permet actuellement de dépister les cornées infectantes au sein des banques de cornée.

Mots-clés : HSV, kératite herpétique, culture virale, anticorps, PCR, banques de cornée.

INTRODUCTION

La kératite herpétique, secondaire à la réactivation dans le tissu cornéen du virus Herpes Simplex (HSV) est une indication fréquente de kératoplastie, représentant selon les séries entre 3 % et 23,4 % des indications. Cependant, ces taux ont tendance à diminuer, probablement en raison des développements des moyens diagnostiques et thérapeutiques de la kératite herpétique [1, 2]. Le diagnostic est fait cliniquement, par mise en évidence du virus (examen direct ou culture), par recherche de production locale d'anticorps dans l'humeur aqueuse, ou par recherche d'ADN viral (PCR). Dans les banques d'yeux, la contamination du donneur au receveur par HSV peut entraîner des tableaux cliniques particuliers. Le problème reste de détecter les cornées potentiellement infectantes dans les banques d'yeux.

DIAGNOSTIC CLINIQUE

Cliniquement, l'herpès oculaire est très varié dans sa présentation et peut concerner toute la surface oculaire.

Sur les paupières, la réactivation herpétique entraîne une blépharite aiguë vésiculaire. Le prélèvement viral fait le diagnostic à la phase vésiculaire, mais le diagnostic rétrospectif est parfois difficile au stade des croûtes.

La réactivation conjonctivale serait la plus fréquente des réactivations herpétiques sur la surface oculaire.

Elle peut être isolée, ou associée à une réactivation cornéenne ou intra-oculaire. En cas de conjonctivite herpétique, la présentation est typiquement celle d'un nodule hyperhémémié. Le prélèvement peut être utile, car la souche retrouvée au niveau de la conjonctive est souvent la même que celle d'une éventuelle kératite associée. Par ailleurs, le traitement corticoïde de ces nodules de réactivation herpétique peut être très dangereux.

La kératite herpétique débutante typique est dendritique. La dendrite est, en fait, l'arborescence de plusieurs lésions élémentaires, vésiculaires, entourées d'une réaction inflammatoire. Le virus est concentré dans les vésicules, et les cellules de l'immunité dans les lames cornéennes adjacentes.

La réactivation cornéenne herpétique peut prendre cependant une forme plus atypique sous la forme d'une kératite ponctuée, d'une ulcération marginale ou d'un ulcère géographique. Dans tous les cas, l'unilatéralité et l'anesthésie cornéenne sont des éléments diagnostiques importants.

À ces lésions, s'ajoutent des signes cornéens liés à la réaction inflammatoire qui suit la kératite de départ : opacités stromales nummulaires, anneau de Wessely, nécrose stromale focalisée. Enfin, l'atteinte cornéenne peut comporter des séquelles des réactivations herpétiques passées (« fantôme » de la dendrite, mauvaise adhérence de l'épithélium) ou secondaires à l'anesthésie cornéenne (ulcère torpide, épithéliopathie toxique, néovascularisation, surinfection, perforation). Ces troubles cornéens consécutifs à l'infection et/ou à la réaction immunitaire sont regroupés sous le terme « kératite métaherpétique ».

Enfin, l'atteinte cornéenne à virus de la Varicelle et du Zona (HHV-3, ou VZV), qui est habituellement secondaire au zona ophtalmique (zona dans le territoire du nerf ophtalmique de Willis), peut entraîner une kératite virale de même présentation clinique que l'atteinte

liée à HSV-1 et HSV-2, sans éruption zostérienne (*zoster sine herpette*). Seul le prélèvement virologique permet de faire le diagnostic différentiel.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Mise en évidence du virus

Le prélèvement d'une kératite herpétique doit se faire par grattage direct de l'épithélium cornéen, transporté dans un milieu spécifique au transport des virus. La recherche de virus VZV requiert même une inoculation directe dans un flacon de culture cellulaire, car le virus survit très mal dans le milieu de transport.

Le prélèvement destiné à l'examen direct sur lame doit comporter un nombre de cellules suffisant, sur une lame bien dégraissée. On peut effectuer un étalement sur lame au cabinet, et envoyer également le scarificateur pour culture virale dans un milieu de transport virus.

La mise en évidence du virus se fait par immunofluorescence directe : on applique à la lame un anticorps anti-HSV-1 et anti-HSV-2 couplé avec un fluorochrome, et on lit les lames au microscope à fluorescence immédiatement. La culture virale se fait sur des lignées de cellules en culture (lignées Hep-2, VERO ou MRC-5 par exemple). Les cellules inoculées sont examinées tous les jours à la recherche d'un effet cytopathogène du virus, pendant 3 semaines. La mise en évidence du virus par examen direct ou culture est la seule méthode permettant de prouver la présence d'un virus répliatif, donc présentant un pouvoir infectant. C'est aussi la technique la moins sensible.

Recherche d'anticorps anti-HSV dans l'humeur aqueuse

La détection d'anticorps dans l'humeur aqueuse [3] a été standardi-

sée par Goldmann et Witmer en 1954 [4], puis par Baron et Desmond en 1959 [5]. La technique micro-ELISA permet un diagnostic plus rapide [6, 7]. Cliniquement, plusieurs études ont été publiées traitant de la détection des anticorps dans l'humeur aqueuse. La plupart des études publiées font état de recherche d'anticorps anti-HSV dans l'humeur aqueuse, pour des patients atteints d'uvéite herpétique [8-11]. Cependant, il est admis maintenant qu'une production locale d'anticorps anti-HSV peut accompagner les kératites herpétiques [12, 13].

Dans l'évaluation de la charge d'anticorps de l'humeur aqueuse, il convient de distinguer les anticorps produits localement des anticorps ultrafiltrés par altération de la barrière hémato-aqueuse. Pour cela, deux coefficients ont été proposés.

Le coefficient C est le rapport (charge immunitaire de l'humeur aqueuse)/(charge immunitaire sérique), la « charge immunitaire » étant le rapport de la concentration d'anticorps spécifiques sur les immunoglobulines totales. Le coefficient C montre une production locale d'anticorps spécifiques, lorsqu'il est supérieur à 3.

Le coefficient C' est le rapport (anticorps de l'humeur aqueuse)/(anticorps sériques). Il met en évidence une concentration des anticorps spécifiques dans l'humeur aqueuse, et permet d'affiner le diagnostic lorsque plusieurs antigènes sont suspectés (par exemple HSV-1, HSV-2, VZV).

Parmi les patients souffrant de kératite herpétique aiguë, la production d'anticorps dans l'humeur aqueuse est associée à l'inflammation intra-oculaire. Parmi les kératites métaherpétiques, ce sont les patients avec une cornée néovascularisée qui présentent le plus souvent des anticorps intra-caméculaires anti-HSV [13].

Recherche de l'ADN viral

Les techniques de biologie moléculaire permettent de détecter l'ADN

du virus. La présence d'ADN d'herpès a été mise en évidence dans des cornées herpétiques et non herpétiques. Biney *et al.* [14] ont trouvé de l'ADN d'herpès chez 2 cornées parmi 83 cornées de banque. Openshaw *et al.* [15] ont trouvé 10 cornées positives parmi 24 cornées de banque, principalement dans la périphérie cornéenne. Dans cette étude, un seul donneur avait les deux cornées positives.

L'ADN d'herpès est retrouvé inconstamment dans les cornées herpétiques. Cantin *et al.* [16] trouvent de l'ADN viral dans 8 cornées sur 11 après greffe de cornée pour herpès (contre 4 sur 11 chez les receveurs non herpétiques). Récemment, Kaye *et al.* [17] en trouvent dans 42 cornées herpétiques sur 51, et dans 12 cornées non herpétiques sur 55. Enfin, Van Gelderen *et al.* [18] ont mis en évidence de l'ADN HSV-1 dans 10 cornées herpétiques sur 31, HSV2 dans 1 cornée herpétique sur 31 et dans 13 cornées non herpétiques sur 78.

Dans une série personnelle, nous avons trouvé 1 cornée positive sur 5 kératites herpétiques, et 7 sur 33 kératites non herpétiques [19]. Ces données confirment que la recherche d'ADN d'herpès sur tissu cornéen ne peut pas être un test diagnostique, même rétrospectif. La présence d'ADN d'herpès évoque plutôt la possibilité d'une latence du virus à l'intérieur du tissu cornéen. Durant la latence, le virus ne produit pas d'ARN excepté les LAT (*Latency Activated Transcripts*), qui sont nécessaires à la réactivation [20]. Des LAT ont été mis en évidence dans le tissu cornéen par PCR-ARN [21, 22], mais pas par immunohistochimie [17].

L'ADN détecté dans la cornée peut également correspondre à un génome détérioré. Rong *et al.* [23] ont montré des séquences altérées de l'ADN de HSV1 dans la cornée de 4 patients parmi 18 kératites herpétiques.

L'isolation du virus par culture a été décrite avant, et est restée le

test de référence pendant des années avant l'avènement de la PCR [21, 24, 25]. Cependant, la culture virale est moins sensible, car elle exige la présence d'un virus répliquatif, ce qui peut en particulier être gêné par un traitement antiviral donné au moment du prélèvement. Dans une étude récente, Kaye *et al.* [17] ont trouvé uniquement 1 cornée positive en culture sur 51, alors que 42 étaient positives en PCR. Cependant, la positivité de la PCR étant de signification clinique diverse, seule la positivité de la culture virale peut être retenue comme la preuve de présence d'un virus répliquatif et d'un pouvoir infectant.

En pratique clinique, la PCR est possible sur une ponction de chambre antérieure, cependant il existe dans l'humeur aqueuse des inhibiteurs naturels de la Taq polymérase (enzyme nécessaire à la PCR), qui entraînent fréquemment des faux négatifs [26]. La PCR n'est donc pas un examen de routine.

Herpès et greffe de cornée

La kératite herpétique peut prendre des formes cliniques particulières chez le receveur de cornée. Il est prouvé à présent que l'herpès entraîne chez le receveur de cornée une nécrose endothéliale primitive, à partir de cas isolés [27-29], ainsi que dans 33 % d'une série de 14 échecs primaires de greffe [30]. Reméijer *et al.* [31] ont apporté récemment la preuve que le virus responsable d'une nécrose endothéliale aiguë venait du donneur, en séquençant les mêmes gènes hypervariables du virus chez le donneur et chez le receveur.

La présence d'une infection à HSV chez le receveur de cornée pose le problème de l'origine du virus. Celle-ci peut être triple.

Le premier mécanisme est la transmission du donneur au receveur. Dans ce cas, l'infection provoque une nécrose endothéliale primitive, dans les jours qui suivent la transplantation. On ne connaît pas les raisons responsables de la

nécrose rapide de l'endothélium dans ces cas là. Probablement s'agit-il d'un virus latent dans la cornée greffée, qui réactive à la faveur du stress opératoire ou de la corticothérapie locale.

Le deuxième mécanisme est la réactivation d'un virus latent dans l'anneau limitant. Il se produit chez des receveurs pré-sensibilisés, à la faveur de la corticothérapie locale. Il peut être responsable de kératites stromales sur la cornée greffée et justifie le traitement antiviral préventif chez le receveur de cornée herpétique.

Le troisième mécanisme est la réactivation d'un virus latent dans un ganglion sensitif du receveur sur le greffon. Ce mécanisme pré-suppose une bonne innervation du greffon, et en pratique, il est impossible de l'observer avant quelques mois dans la période post-opératoire. Le tableau clinique est celui d'une réactivation herpétique classique.

Virus et milieu de conservation

Les procédures de conservation de cornée dans les banques d'yeux impliquent deux principaux modes de conservation : la conservation à + 35 °C pendant 3 à 5 semaines, ou à + 4 °C pendant 8 jours. Le comportement du virus HSV durant la période de conservation cornéenne a été peu exploré. Deux études montrent un effet délétère du virus contre des cornées conservées : kératite dendritique sur une cornée de banque [32], ou détection d'ADN viral par PCR sur 3 cornées avec nécrose endothéliale [33]. Deux études ont montré que l'ADN viral pouvait également être retrouvé dans le milieu de conservation : 3 prélèvements positifs sur une série de 80 cornées avec nécrose endothéliale dans la première [34], et 12 milieux positifs sur 199 avec nécrose endothéliale dans la deuxième [32].

Enfin, Garweg a démontré expérimentalement sur 451 milieux de culture inoculés avec HSV-1 et

conservés à 4 températures différentes (+ 35 °C, + 4 °C, - 20 °C, - 80 °C), que l'ADN viral subissait une dégradation naturelle avec le temps et dépendant de la température dans le milieu de conservation [35].

En revanche, si on sait à présent qu'une cornée morphologiquement normale peut héberger de l'ADN viral, il faudra attendre d'autres tests et d'autres études pour déterminer de façon non invasive, parmi les cornées de banque destinées à la greffe, lesquelles constituent un risque de contamination par HSV pour le receveur.

RÉFÉRENCES

1. Legeais JM, Labetoulle M, Renard G, Gaillot D, Pouliquen Y. Indications des kératoplasties transfixiantes. Etude rétrospective de 2 962 cas sur onze ans. *J Fr Ophtalmol*, 1993;16:516-22.
2. Leger F, Vital C, Negrier ML, Bloch B. Histologic findings in a series of 1,540 corneal allografts. *Ann Pathol*, 2001;21:6-14.
3. Van Dungern E. Die Antikörper: Resultate früherer Forschungen und neue Versuche. Fischer, Jena, 1902.
4. Goldmann H, Witmer R. Antikörper im Kammerwasser. *Ophthalmologica*, 1954;127:323-30.
5. Baron A, Desmots G. L'examen sérologique de l'humeur aqueuse au cours des uvéites. *Bull Soc Ophtalmol Fr*, 1959;59:793-6.
6. Felgenhauer K. Differentiation of the humoral immune response in inflammatory diseases of the central nervous system. *J Neurol*, 1982;228:223-47.
7. Hartmann C, Felgenhauer K, Hanssen C. Filtration und lokale Synthese von Proteinen im Kammerwasser und Liquor Cerebrospinalis. *Fortsch Ophthalmol*, 1983;80:103-7.
8. Dussaix E, Cerqueti PM, Pontet F, Bloch-Michel E. New approaches to the detection of locally produced antiviral antibodies in the aqueous of patients with endogenous uveitis. *Ophthalmologica*, 1987;194:145-9.
9. Timsit JC, Fortier B, Pontet F, Bloch-Michel E. Valeur de la méthode immuno-enzymatique (ELISA) dans la détermination du niveau d'immunoglobulines anti-herpès dans le serum et l'humeur aqueuse. *J Fr Ophtalmol*, 1982;5:669-74.
10. Kijlstra A, Onkosuwito J, Wienesenvan Doorn M *et al.* Serological and PCR analysis of ocular fluids is an important tool in the diagnostic workup of a uveitis patient presenting as a diagnostic dilemma. *Ophthalmic Res*, 1997;30:98.
11. Liekfeld A, Schweig F, Jaeckel C, Wernecke KD, Hartmann C, Pleyer U. Intraocular antibody production in intraocular inflammation. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2000;238:222-7.
12. Van der Lelij A, Rothova A. Diagnostic anterior chamber paracentesis in uveitis: a safe procedure? *Br J Ophthalmol*, 1997;81:976-9.
13. Robert PY, Liekfeld A, Ranger-Rogez S, Jaekel C, Pleyer U, Adenis JP *et al.* Ajustement du traitement antiviral après greffe de cornée par mesure de la production d'anticorps dans l'humeur aqueuse. *J Fr Ophtalmol*, 2003;26:350-4.
14. Biney EE, Orrett FA. Screening of human corneas for herpes simplex virus by tissue culture and polymerase chain reaction. *Jpn J Med Sci Biol*, 1997;50:151-60.
15. Openshaw H, McNeill JI, Lin XH, Niland J, Cantin EM. Herpes simplex virus DNA in normal corneas: persistence without viral shedding from ganglia. *J Med Virol*, 1995;46:75-80.
16. Cantin EM, Chen J, Mc Neil J, Willey DE, Openshaw H. Detection of herpes simplex virus DNA sequences in corneal transplant recipients by polymerase chain reaction assays. *Curr Eye Res*, 1991;10:15-21.
17. Kaye SB, Baker K, Bonshek R, Maseruka H, Grinfeld E, Tullo A *et al.* Human herpes viruses in the cornea. *Br J Ophthalmol*, 2000;84: 563-71.
18. Van Gelderen BE, Van der Lelij A, Treffers WF, van der Gaag R. Detection of herpes simplex virus type 1, 2 and varicella zoster virus DNA in recipient corneal buttons. *Br J Ophthalmol*, 2000; 84:1238-42.
19. Robert PY, Adenis JP, Denis F, Ranger-Rogez S. Corneal HSV DNA in corneal transplantation. Prospective study of 38 recipients. *J Med Virol*, 2003;71:69-74.
20. Perng GC, Dunkel EC, Geary PA, Slanina SM, Ghiasi H, Kaiwar R *et al.* The latency-associated transcript gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is required for efficient in vivo spontaneous reactivation of HSV-1 from latency. *J Virol*, 1994;68:8045-55.
21. Kaye SB, Lynas C, Patterson A, Risk JM, McCarthy K, Hart CA. Evidence for herpes simplex viral latency in the human cornea. *Br J Ophthalmol*, 1991;75:195-200.
22. Zheng X, Marquart ME, Loustch JM, Shah P, Sainz B, Ray A, O'Callaghan RJ *et al.* HSV-1 migration in latently infected and naive rabbits after penetrating keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999;40:2490-7.
23. Rong BL, Pavan-Langston D, Weng QP, Martinez R, Cherry JM, Dunkel EC. Detection of herpes simplex virus thymidine kinase and latency-associated transcript gene sequences in human herpetic corneas by polymerase chain reaction amplification. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991;32:1808-62.
24. Tullo AB, Easty DL, Shimeld C, Stirling PE, Darville JM. Isolation of herpes simplex virus from corneal discs of patients with chronic stromal keratitis. *Trans Ophthalmol Soc UK*, 1985;104:159-63.
25. Coupes D, Klapper PE, Cleator GM, Bailey AS, Tullo AB. Herpes simplex virus in chronic human stromal keratitis. *Curr Eye Res*, 1986;5:735-8.
26. Wiedbrauk DL, Werner JC, Drevon AM. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J Clin Microbiol*, 1995;33:2643-6.
27. Biswas S, Suresh P, Bonshek RE, Corbitt G, Tullo AB, Ridgway AE. Graft failure in human donor corneas due to transmission of herpes simplex virus. *Br J Ophthalmol*, 2000;84:701-5.
28. De Kesel RJ, Koppen C, Ieven M, Zeyen T. Primary graft failure caused by herpes simplex virus type 1. *Cornea*, 2001;20:187-90.
29. Rasquin F, Demols P, Schrooyen M, Liesnard C, Delforge ML, Zanen A. Primary herpetic infection after transfixing keratoplasty. *Bull Soc Belge Ophtalmol*, 1998;268:79-85.
30. Cockerham GC, Bijwaard K, Sheng ZM, Hidayat AA, Font RL, McLean IW. Primary graft failure: a clinicopathologic and molecular analysis. *Ophthalmology*, 2000;107:2083-90.
31. Remeijer L, Maertzdorf J, Doornenbal P, Verjans GM, Osterhaus AD. Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation. *Lancet*, 2001;357:442.
32. Neufeld MV, Steinemann TL, Merin LM, Stroop WG, Brown MF. Identification of a herpes simplex virus-induced dendrite in an eye-bank donor cornea. *Cornea*, 1999;18:489-92.
33. Cleator GM, Klapper PE, Dennett C, Sullivan AL, Bonshek RE, Marcyniuk B *et al.* Corneal donor infection by herpes simplex virus: herpes simplex virus DNA in donor corneas. *Cornea*, 1994;13:294-304.
34. Morris DJ, Cleator GM, Klapper PE, Cooper RJ, Biney EO, Dennett C *et al.* Detection of herpes simplex virus DNA in donor cornea culture medium by polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol*, 1996;80:654-7.
35. Garweg JG, Boehnke M. Low rate shedding of HSV-1 DNA, but not of infectious virus from human donor corneae into culture media. *J Med Virol*, 1997;52:320-5.