



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES
TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES DE
BAMAKO



FAPH

Année Universitaire
2018-2019

THESE

N°...../P

**Prévalence des virus de la famille des
Herpesviridae détectés par PCR en temps réel
dans les uvéites chez les patients reçus au
CHU-IOTA**

Présentée et soutenue publiquement le .../.../2019
Devant le jury de la faculté de pharmacie

Par

M. Barnabas DIARRA

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie

(DIPLOME D'ETAT)

JURY

Président : Professeur Japhet Pobanou THERA
Membre : Docteur Mohamed AG BARAÏKA
Membre : Docteur Nouhoum GUIROU
Co-directeur : Docteur Ibréhima GUINDO
Directeur : Professeur Flabou BOUGOUDOGO

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

**FACULTE DE PHARMACIE
ANNEE UNIVERSITAIRE 2018-2019**

ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE - Professeur

VICE-DOYEN : M. Ababacar I. MAIGA - Professeur

SECRETAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY Administrateur civil

AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN, inspecteur des finances

PROFESSEURS HONORAIRES

M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie générale & minérale
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie- Virologie
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
M. Boulkassoum	H Aidara	Législation
M. Moussa	HARAMA	Chimie organique (décédé)
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
M. Alou A	KEITA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
M. Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bakary M.	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie/parasitologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
M. Alassane	DICKO	Santé Publique
M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
M. Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

M. Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Boubacar Tiétié	BISSAN	Biologie clinique
M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique

Prévalence des virus de la famille des Herpesviridae détectés par PCR en temps réel dans les uvéites chez les patients reçus au CHU-IOTA

M. Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
M. Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
Mme Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
M. Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
M. Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
M.Yaya	GOITA	Biochimie clinique
M. Ibrehima	GUINDO	Bactériologie virologie
Mme Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
M. Kassoum	KAENTAO	Santé Publique/Bio statistiques
M. Birama Apho	LY	Santé publique
Mme. Dinkorma	OULOUEM	Biologie Cellulaire
M. Issaka	SAGARA	Santé Publique/Bio statistiques
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
Mme Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire
M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique/Bio statistiques

4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

Mme Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
M. Issa	DIARRA	Immunologie
M. Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
Mme Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
Mme Merepen dit Agnes	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
M. Falaye	KEITA	Santé publique/Santé environnement
Mme.N'Deye Lallah Nina	KOITA	Nutrition
M. yacouba	MAIGA	Bio statistique
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
M. Oumar	SANGHO	Epidémiologie
M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/ DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. Saibou	MAIGA	Législation
Mme Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

Néant - -

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
M. Bakary Moussa	CISSE	Galénique
M. Yaya	COULIBALY	Législation
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
M. Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
M. Moussa	SANOGO	Gestion
Mme Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
------------------	-----------	------------------------

M. Antoine	DARA	Sciences pharmaceutiques
M. Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Sekou	DOUMBIA	Pharmacognosie
M. Mahamane	HADARA	Pharmacognosie
Mme. Assitan	KALOGA	Législation
M. Ahmed	MAIGA	Législation
Mme. Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
M. Aboubacar	SANGHO	Législation
M. Bourama	TRAORE	Législation
M. Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
M. Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
Mme. Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

DER DES SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
M. Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

M. Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER
----------	-----	----------------------------------

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
M. Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie
M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
M. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie analytique
M. Blaise	DACKOUCO	Chimie Analytique
Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
M. Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
M. Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

DER SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
M. Cheik F.	TRAORE	Biologie/Entomologie
M. Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

M. Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée
------------	---------	------------------

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Abdoulaye	KANTE	Anatomie
--------------	-------	----------

Prévalence des virus de la famille des Herpesviridae détectés par PCR en temps réel dans les uvéites chez les patients reçus au CHU-IOTA

M. Boureima KELLY Physiologie médicale

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Seydou Simbo DIAKITE Chimie organique

M. Modibo DIALLO Génétique

M. Moussa KONE Chimie Organique

M. Massiriba KONE Biologie Entomologie

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

M. Cheik Oumar BAGAYOKO Informatique

M. Babou BAH Anatomie

M. Abdourahamane COULIBALY Anthropologie médicale

M. Souleymane COULIBALY Psychologie

M. Boubacar DIARRA Bactériologie

M. Modibo DIARRA Nutrition

M. Moussa I DIARRA Biophysique

M. Babacar DIOP Chimie

M. Atimé DJIMDE Bromatologie

M. Yaya KANE Galénique

M. Boubacar KANTE Galénique

M. Aboubacary MAIGA Chimie organique

M. Massambou SACKO SCMP/SIM

M. Modibo SANGARE Anglais

M. Sidi Boula SISSOKO Histologie-embryologie

Mme. Fatoumata SOKONA Hygiène du milieu

M. Fana TANGARA Maths

M. Abdel Kader TRAORE Pathologie médicales

Mme. Djénébou TRAORE Sémiologie et Pathologie médicale

M. Boubacar ZIBEÏROU Physique

REMERCIEMENTS

Je rends grâce à Dieu l'Éternel des Armées, créateur des cieux et de la terre.

« L'Éternel est mon berger : je ne manquerai de rien.

Il me fait reposer dans de verts pâturages, Il me dirige près des eaux paisibles.

Il restaure mon âme, Il me conduit dans les sentiers de la justice, A cause son nom.

Quand je marche dans la vallée de l'ombre de la mort, je ne crains aucun mal, car tu es avec moi : Ta houlette et ton bâton me rassurent.

Tu dresses devant moi une table, en face de mes adversaires ; tu oins d'huile ma tête, Et ma coupe déborde.

*Oui, le bonheur et la grâce m'accompagneront tous les jours de ma vie, et j'habiterai dans la maison de l'Éternel jusqu'à la fin de mes jours » **Psaumes 23.***

**Je te rends grâce Père pour le Salut que tu nous as accordé par ton Fils
Jésus-Christ !**

**HOMMAGES
AUX
MEMBRES DU JURY**

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY :

Professeur Japhet Pabanou THERA

- **Maitre de conférence en Médecine Légale.**
- **Maitre de conférence en Ophtalmologie.**
- **D.U d'Epidémiologie.**
- **DEA en Droit international et Européen des Droits fondamentaux.**
- **Ophtalmo-Pédiatre à l'IOTA.**
- **Responsable des enseignements de Médecine Légale à la FMPOS.**

Homme de grande simplicité ; nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait en acceptant la présidence de notre jury de thèse, au privilège d'avoir bénéficié de vos conseils si précieux et pour votre disponibilité sans faille. Recevez ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Directeur de thèse :

Professeur Flabou BOUGOUDOGO

- **Maitre de conférences Agrégé de bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie et de Médecine ;**
- **Responsable de l'enseignement de la bactériologie et de la virologie à la Faculté de Pharmacie**
- **Directeur de l'INRSP de 2002 à 2012 ;**
- **Officier de l'ordre du mérite de la Santé.**

Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos conseils précieux, de votre écoute permanent, et surtout de votre patience. Nous sommes reconnaissants de la confiance que vous nous avez accordée et des discussions enrichissantes que nous avons eues. Nous sommes intarissables d'éloges à votre égard et nous tenons à vous assurer toute notre admiration et notre respect.

A notre Maître et Juge : Docteur Nouhoum GUIROU

- **Ophthalmologiste Oculoplasticien**
- **Maître assistant**
- **Chef de service des consultations externes au CHU-IOTA**
- **Chevalier de l'ordre du mérite de la santé.**

Nous vous remercions d'avoir contribué à mener à bien ce projet en étant l'un des initiateurs de ce travail et d'avoir accepté de juger ce travail. Trouvez ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

A notre Maître et Juge : Docteur Mohamed AG BARAIKA,

- **Pharmacien Microbiologiste**
- **Maître Assistant en bactériologie-virologie à la Faculté de Pharmacie**
- **Enseignant-chercheur au centre de Recherche et de Lutte Contre la Drépanocytose.**

C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail, ce qui nous offre l'opportunité de vous exprimer notre profonde admiration et notre profonde gratitude. Recevez ici nos sincères remerciements et notre respect.

A notre Maître et Co-Directeur de thèse : Docteur Ibréhima GUINDO

- **Pharmacien biologiste au service de bactériologie – virologie à l’INRSP ;**
- **Responsable du laboratoire des IST/VIH de l’INRSP ;**
- **Maitre-assistant de Bactériologie Virologie à la Faculté de Pharmacie de Bamako.**

Nous avons eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et avons trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui nous a reçu en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance. Vos compétences professionnelles incontestables ainsi que vos qualités humaines vous valent l’admiration et le respect de tous. Nous vous restons à jamais reconnaissants, sincèrement respectueux et toujours disciples dévoués.

Veillez, cher Maitre, trouvé dans ce modeste travail, l’expression de notre haute considération, de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.

Que chacun d'entre vous soit ici vivement remercié de nous avoir fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury et le plaisir d'assister à notre soutenance. Recevez ici, l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'attention et l'intérêt que vous avez portés à ce travail.

Je remercie...

Toute l'équipe du service de bactériologie-virologie de l'INRSP : Dr I. GUINDO, Dr A. DIALLO, Mr ONGOÏBA, la Maman Mme Traore H. SAMAKE, Mr Alou SANOGO, Mr Demba KOÏTA, Mr Guindo et tous les internes (FID, Aicha, Traore, Dieng, Samake, Guedjouma, M. le président NYK, Kondo, Seth, Aliou, Jacques, Tinimba, Houssénatou, Fodé) ainsi que les aînés Dicko et Sangaré, vous m'avez permis, par votre aide, votre soutien et votre dévouement, de mener à bien ce projet de recherche.

Tout le personnel du CHU-IOTA qui nous ont aidé durant l'étude, Dr Michel, Dr Diallo, Dr A. BORO, Mr Moussa COULIBALY ; avec une mention spéciale au Dr D. GOÏTA pour son engagement et sa persévérance lors de cette étude.

Le personnel de la Pharmacie Kajuru Pathé Jallo : Dr BAH A.M. Diallo, Dr J.Y. Coulibaly, Bako, Koudédia, Mariam, Mariko, pour votre soutien et votre compréhension qui m'ont permis de travailler librement sur cette étude.

Les Docteurs : Ousmane Guindo ; Kamaté et Adama Goïta pour vos conseils, votre encadrement et tous les apports sur le plan scientifique que j'ai pu bénéficier tout au long de mon cursus.

Tous les enseignants de la Faculté de Pharmacie et de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie pour la qualité de l'enseignement prodiguée.

Tous ceux qui m'ont enseigné depuis l'école fondamentale pour la bonne base que j'ai reçue grâce à vous.

Un travail scientifique ne saurait se réduire à une réalisation isolée. Que chacun d'entre vous soit ici très sincèrement remercié d'avoir contribué à l'aboutissement de ce projet de recherche.

Je remercie...

Mes parents Wambé DIARRA et Kadidia TRAORE, pour votre amour, votre persévérance, votre soutien et tous les sacrifices consentis depuis toujours. Trouvez ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour ;

Mes frères et sœurs, Paul, Silas et Lydie pour votre aide et votre soutien par la prière ainsi que pour la complicité qui nous unit ;

Mes cousins et cousines, Konimba, Youwadi, Bintou, Lydie ainsi que mon tonton Loumbé pour votre soutien permanent, je suis fier d'être de la famille.

Mes grands-mères maternelles et paternelles, pour vos bénédictions, vos encouragements ainsi que vos conseils,

Mes oncles et tantes, Loumbé, Aminata, Youma, Antoine, Bossobé, Douba, pour vos encouragements et vos prières,

William PETTY dit Bill, pour ton amitié, ton soutien financier et moral infaillible depuis le numérisé. Ce travail est aussi le tien ; que Dieu t'accorde longue vie et pourquoi pas l'occasion de nous voir un jour.

... sans eux, rien n'aurait été possible... je leur dédie cette thèse.

Toute ma famille et tous mes amis (Mohamed, Jédeon, Ozias, Alassane, Koudedia, Seth, Baradji, Juliette, Barthélémy...) qui me sont chers.

Enfin, ce projet n'aurait pu aboutir sans votre soutien. Que chacun d'entre vous soit ici de tout cœur remercié d'avoir participé de près ou de loin à cette aventure.

Table des matières

1	Etude bibliographique	4
----------	------------------------------------	----------

1.1	Chapitre I : Vue d'ensemble des <i>Herpesviridae</i>	4
1.1.1	Définition	4
1.1.2	Propriétés des <i>Herpesviridae</i>	5
1.2	Chapitre II : Etude monographique	10
1.2.1	Herpès simplex virus 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2)	10
1.2.2	<i>Herpesvirus simplex de type 1(HSV-1)</i> :	11
1.2.3	<i>Herpesvirus simplex de type 2(HSV-2)</i>	11
1.2.4	Virus de la varicelle et du zona (VZV)	16
1.2.5	Cytomégalovirus (CMV)	19
1.2.6	Virus d'Epstein-Barr (EBV)	22
1.2.7	Herpes Virus Humain 6 et 7 (HHV-6,7)	26
1.2.8	Herpesvirus Humain 8 (HHV-8)	27
1.3	Chapitre III : Vue d'ensemble des uvéites virales et de la PCR	29
1.3.1	Les uvéites virales	29
1.3.2	Réaction en chaîne par polymérase (PCR)	32
2	Deuxième partie : Étude expérimentale	33
2.1	Chapitre I : Matériel et Méthodes	33
2.1.1	Conception	33
2.1.2	Matériel	35
2.1.3	Méthodes	36
2.1.4	Variables analysées	40
2.1.5	Traitement et analyse des données	41
3	Résultats	42
4	Discussion	49
5	Conclusion	51
6	Recommandations	52
7	Références	53
8	Annexe	1

Listes des tableaux

Tableau I: Propriétés générales des Herpesviridae.	7
Tableau II: Diagnostic de l'infection à EBV.	25
Tableau III : Paramètres du LC 480®	39
Tableau IV: Caractéristiques sociodémographiques des patients	42
Tableau V : Aspects thérapeutiques avant le prélèvement.	43
Tableau VI : Répartition des patients selon la sérologie HIV et de la présence de MST	44
Tableau VII : Résultat de la PCR en fonction des virus retrouvés.	45
Tableau VIII: Répartition des patients en fonction de la profession.	46
Tableau IX : Répartition des patients selon le sexe	46
Tableau X: Répartition selon les germes retrouvés et le mode évolutif.....	47
Tableau XI: Répartition des germes retrouvés selon la localisation de l'uvéite.	47
Tableau XII: Répartition selon les germes et localisation anatomique.....	48

Liste des figures

Figure 1 : Relations phylogéniques entre herpesvirus(14).....	5
Figure 2 : Déroulement des infections à Herpesviridae (15).....	6
Figure 3 : Cycle de réplication des Herpesviridae (14).....	10
Figure 4 : Gingivostomatite à HSV-1 (14).....	12
Figure 5 : Herpès labial récidivant (14).....	12
Figure 6 : Herpès oculaire	13
Figure 7 : Structure chimique de l'aciclovir (26)	15
Figure 8 : Etablissement de la latence du VZV dans les ganglions sensitifs (14).....	18
Figure 9 : Diagnostic de l'infection à EBV.....	25
Figure 10 : Uvéite antérieure hypertensive liée à HSV-1 (30).....	30
Figure 11 : Séance de prélèvement.....	35
Figure 12 : Sigma-virocult.	36
Figure 13 : Kit QIAGEN.....	36
Figure 14 : Image du Light Cycler 480	36
Figure 15 : Aspect de l'acuité visuelle chez les patients	43
Figure 16 : Répartition de nos patients selon la localisation anatomique de l'uvéite.....	44
Figure 17 : Résultat de la PCR en temps réel.....	45

Liste des sigles et abréviations

°C	: Degré Celsius
ADN	: Acide désoxyribonucléique
Ac	: Anticorps
Ag	: Antigène
ARN	: Acide ribonucléique
CD34	: Cluster of differentiation number 34
CDK	: Cluster of differentiation K
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire
CMV	: <i>Cytomegalovirus</i>
CP	: Crossing Point
dNTPs	: Désoxyribonucléotides triphosphates
EA	: Early antigen
EBNA	: Epstein-Barr Nuclear Antigen
EBV	: Epstein-Barr Virus
ECP	: Effet cytopathogène
EFS	: Etablissement Français du Sang
EHV	: <i>Equins herpes virus</i>
ELISA	: Enzymz-linked immunosorben assay
EMA	: Early Membrane antigen
EPA	: Etablissement Public à caractère administratif
Fc	: Fragment Fc
gB	: Glycoprotéine de type B
gC	: Glycoprotéine de type C
gD	: Glycoprotéine de type D
gH	: Glycoprotéine de type H
gL	: Glycoprotéine de type L
HHV-6	: <i>Human herpes virus</i> de type 6
HHV-7	: <i>Human herpes virus</i> de type 7
HHV-8	: <i>Human herpes virus</i> de type 8
HSV-1	: <i>Herpes simplex virus</i> de type 1
HSV-2	: <i>Herpes simplex virus</i> de type 2
IC	: Contrôle interne
ID	: Immunodéprimé
IFI	: Immunofluorescence indirecte
IgM	: Immunoglobuline M
INRSP	: Institut National de Recherche en Santé Publique
IOTA	: Institut d'Ophtalmologie Tropicale de l'Afrique
IST	: Infection sexuellement transmissible

IV	: Intra veineuse
L	: Segment long
LC	: Light Cyclor
LCR	: Liquide céphalo rachidien
LMA	: Late membrane antigen
LMP	: Late membrane protein
Mm	: Millimètre
mm ³	: Millimètre cube
MNI	: Mononucléose infectieuse
MRC5	: Medical Research Council Cell strain 5
Nm	: Nanomètre
OCCGE	: Organisation de coordination et coopération pour la lutte contre les grandes endémies
PBD	: Paul-Bunnell et Davidson
PCR	: Polymerase Chain Reaction ou Réaction en Chaîne par Polymérase
PRV	: <i>Pseudo-rage virus</i>
QS	: Standard de quantification
R	: Réactif
RE	: Réticulum endoplasmique
RM	: République du Mali
SC	: Contrôle de sensibilité
SOP	: Standard Operating Procedure
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TK	: Tymidine Kinase
U	: Séquence unique
UA	: Uvéite Antérieure
µl	: Microlitre
UL	: Sequence of unique long (Séquence unique long)
US	: Sequence of unique short (Séquence unique courte)
VCA	: Viral capsid antigen
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine
VP	: Viral Protein
Vhs	: Viral host shot off protein
VZV	: Virus de la varicelle et du zona
W0	: Water (en français :Eau pour extraction)
Zig	: Zona immunoglobuline

*Prévalence des virus de la famille des Herpesviridae détectés par PCR en temps réel dans les uvéites
chez les patients reçus au CHU-IOTA*

Introduction

Les uvéites désignent une inflammation du tractus uvéal (uvéie), la région de l'œil qui contient l'iris, le corps ciliaire et la choroïde. Elles représentent la 5^{ème} cause de cécité dans le monde (soit 5-10 % des cas) et la 4^{ème} dans les pays industrialisés (1,2). Elles touchent le plus souvent les patients en âge actif entre 20 et 50 ans (3,4).

Dans les pays industrialisés, l'incidence des uvéites est de 17 à 52 cas pour 100 000 habitants par an et leur prévalence se situe entre 38 et 204 cas pour 100 000 habitants (5,6). Cette prévalence varie de 60 à 700/ 100 000 habitants dans le monde et est estimée à 150 en France (7). Dans la région de Fès au Maroc, les uvéites ont représenté 3,1% des cas d'hospitalisations au CHU Hassan II (8).

Cette pathologie peut être causée par des agents viraux (*Herpès*) ou bactériens (*Pseudomonas*, Staphylocoques), une affection auto-immune ou une maladie inflammatoire telle que la spondylarthrite ankylosante (7). Il est recommandé de classer les différentes formes d'uvéites selon leur localisation anatomique. Ainsi, on parlera d'uvéites antérieure, lorsque l'inflammation se situe dans la chambre antérieure et qu'elle touche l'iris et le corps ciliaire. Elle est secondaire à une maladie contagieuse telle que la syphilis ou l'Herpès. L'uvéite est dite intermédiaire lorsque l'inflammation atteint le vitré. Elle est moins fréquente et reste généralement d'origine indéterminée. On parlera d'uvéite postérieure, lorsque l'inflammation touche la choroïde et/ou la rétine. Elle est en général associée à la tuberculose ou à la toxoplasmose. Elle touche surtout la choroïde. L'uvéite est dite totale ou panuvéite, lorsque l'inflammation atteint la chambre antérieure, le vitré, la choroïde et/ou la rétine. Elle est due à des maladies auto-immunes telles que la maladie de Behçet, la sarcoïdose, la maladie de Vogt Kayanagi Harada ; ou à une infection (toxoplasmose, toxocarose) ou même restent d'étiologie inconnue (7,9,10).

Les uvéites antérieures (UA) herpétiques se caractérisent par un tableau d'uvéite hypertensive unilatérale associée à une atrophie irienne. Elles sont la conséquence d'une réactivation d'un virus latent après une primo-infection. Les principaux virus, de la grande famille des *Herpesviridae*, responsables de ces uvéites, sont le *virus herpès simplex* (HSV), le virus de la *varicelle* et du *zona* (VZV), ainsi que le *cytomégalo virus* (CMV). Ces trois virus sont responsables de tableaux d'UA assez similaires, mais qui se différencient notamment par la sévérité et l'évolution de l'inflammation.

Le diagnostic positif d'UA herpétique est un diagnostic clinique, lorsque le tableau est typique, associant une UA granulomateuse, hypertensive avec une atrophie irienne, et parfois une kératite ou un hyphéma. Il sera confirmé, notamment dans les formes atypiques, par la recherche d'ADN viral par réaction en chaîne par polymérase (PCR) sur un échantillon d'humeur aqueuse (11).

Dans les pays occidentaux, les uvéites antérieures sont les plus fréquentes (50 à 90%). Elles sont majoritairement dues à une infection (l'herpès en particulier) ou une maladie auto-immune et elles restent, dans près de la moitié des cas sans cause connue. Quant aux uvéites postérieures, elles représentent 10 à 20% des uvéites (7). En Afrique les études sur les étiologies des uvéites sont rares ; cependant au Maroc en 2013, les uvéites postérieures ont représentées 19% de l'ensemble des uvéites lors d'une étude menée sur le profils épidémiologique, étiologique et thérapeutique des uvéites postérieures (8).

Au Mali, malgré la fréquence des uvéites rencontrées en consultation à l'IOTA, nous disposons de très peu de données sur les différentes étiologies d'où l'intérêt de la présente étude qui a pour but de déterminer la prévalence des uvéites dues aux *Herpesviridae* au CHU-IOTA.

Question de recherche : Quelle est la prévalence des *Herpesviridae* chez les patients atteints d'uvéites reçus en consultation au CHU-IOTA ?

Objectif général

- Déterminer la prévalence des *Herpesviridae* chez les patients atteints d'uvéites à l'IOTA.

Objectifs spécifiques

- Déterminer la prévalence des virus de la famille des *herpesviridae* incriminés dans les uvéites chez les patients reçus à l'IOTA.
- Déterminer la prévalence des *Herpesviridae* en fonction de la localisation anatomique.
- Analyser les résultats de la PCR en temps réel en fonction du profil sociodémographique des patients.

1 Etude bibliographique

1.1 Chapitre I : Vue d'ensemble des *Herpesviridae*

1.1.1 Définition

Le mot « *Herpes* » dérive du grec « *Herpein* » : ramper (12).

Les premiers faits historiques relatant l'existence des manifestations cliniques causées par l'infection au virus de l'herpès simplex ont été retracés dans la Grèce antique où le mot "*herpes*" est apparu pour la première fois dans des écrits. En effet, Hippocrate utilisa ce terme pour décrire les lésions qui semblaient "ramper" à la surface de la peau des individus infectés. Par la suite, ce fut Hérodote qui associa les ulcères et les vésicules labiales avec de la fièvre. Même certains textes de Shakespeare sous-entendent la présence de l'herpès labial. Ce n'est cependant pas avant le 18^{ième} siècle que l'infection génitale est décrite par Astruc, un physicien du roi Louis XIV. Vidal, en 1893 fut ensuite le premier à reconnaître la transmission de personne à personne de l'infection herpétique (13).

Les *Herpesviridae* font partie d'un ordre viral : les *Herpesvirales*. La famille des *Herpesviridae* comprend une centaine d'espèces dont seulement 8 qui infectent l'homme et appartiennent à 3 sous-familles :

- *Alphaherpesvirinae* : *Herpes Simplex Virus 1 et 2* (HSV-1 et HSV-2) , *Varicelle Zona Virus* (VZV).
- *Betaherpesvirinae* : *Cytomegalovirus* (CMV) ; *Human Herpes Virus 6 et 7* (HHV-6 et HHV-7).
- *Gammaherpesvirinae* : *Epstein Barr Virus* (EBV); *Human Herpes Virus* (HHV-8) (14).

Ce schéma représente les différentes sous-familles des *Herpesviridae*.

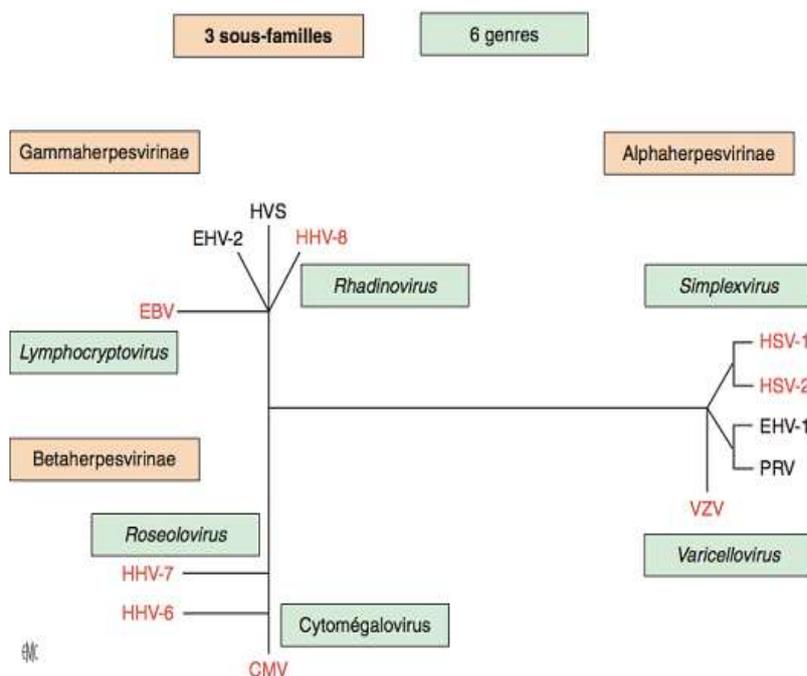


Figure 1. Relations phylogéniques entre herpesvirus. Les herpesvirus humains sont représentés en rouge. CMV : cytomégaloherpesvirus ; EBV : virus Epstein-Barr ; EHV-1/-2 : virus équins types 1/2 ; HHV-6/-7/-8 : herpesvirus humains 6/7/8 ; HSV-1/-2 : virus herpes simplex types 1/2 ; HVS : herpesvirus *saimiri* ; PRV : virus de la pseudo-rage ; VZV : virus de la varicelle et du zona.

Figure 1 : Relations phylogéniques entre *herpesvirus*(14).

1.1.2 Propriétés des *Herpesviridae*

1.1.2.1 Structure et composition

Les *Herpesviridae* ont :

- La même morphologie (on ne peut pas les différencier en microscopie électronique).
- Une taille comprise entre 150 et 200 nm de diamètre.
- Une enveloppe provenant de la cellule hôte, donc ils sont fragiles car la capsule est un facteur de fragilité.
- Un ADN double brin linéaire codant pour un grand nombre de protéines (supérieur à 100 gènes).
- Une capsidie icosaédrique (forme d'une petite sphère).
- Un téguement spécifique constitué de plusieurs protéines virales indispensables à la réplication.

Ces herpes virus peuvent entraîner deux types d'infections :

- Soit une infection productive lytique, caractéristique de la primo-infection, on aura une production des virus et une destruction cellulaire.
- Soit une infection non productive latente : il n'y a pas de production de virus et est non symptomatique (14).

1.1.2.2 Infection latente

Après primo-infection, les *Herpesvirus* persistent à vie dans l'organisme, sous forme « dormante ». Il existe différents sites de latence selon les sous-familles des herpès. La réactivation du virus par des causes variées est responsable de résurgences (15). On peut avoir le virus sans s'en rendre compte et l'excréter, sans que cela soit symptomatique. Lors de la latence, l'ADN viral non intégré au génome cellulaire est présent sous forme d'épisomes dans le noyau (14).

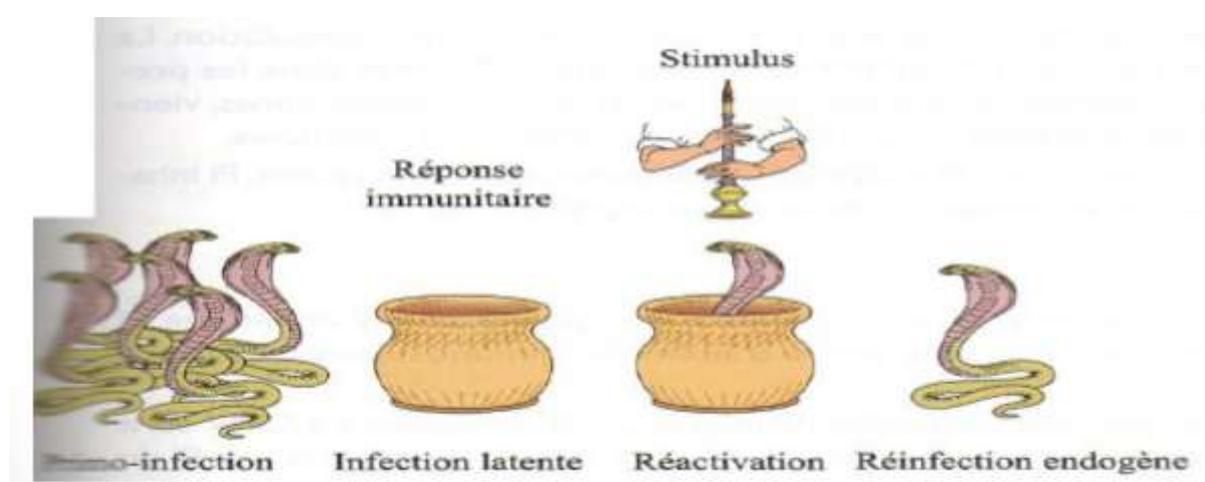


Figure 2 : Déroulement des infections à *Herpesviridae* (15).

1.1.2.2.1 Propriétés générales des infections latentes

- La cellule de latence

Elle ne se divise pas. Mais si se divise, le génome viral synchronise sa réplication avec celle de la cellule. Les deux cellules filles vont porter le génome viral de la cellule mère.

- Les cellules infectées ne sont pas détectées par le système immunitaire.
- Il n'y a pas de réplication productive : pas de production de virus.
- Maintien du génome viral intact dans sa totalité (14).

Tableau I: Propriétés générales des *Herpesviridae*.

Sous famille	Virus	Réplication	Latence	Contagiosité
<i>AlphaherpesV</i>	HSV-1	Epithélium CM	Neurones	Directe
	HSV-2	Epithélium CM	Neurones	Directe, Sexuelle
	VZV HHV3	Epithélium CM	Neurones	Respiratoire
<i>BetaherpesV</i>	CMV HHV5	Monocytes, lymphocytes, épithélium	Monocytes, endothélium	Directe, sang, greffon
	HHV6	Lymphocytes	Monocytes	Respiratoire
<i>GammaherpesV</i>	EBV HHV4	Lymphocytes B épithélium	Lymphocytes B	Salive
	HHV8	Lymphocytes B épithélium	Lymphocytes B	Salive

1.1.2.3 Cycle de réplication virale

Il y a plusieurs phases successives de réplication pour le virus des herpès : une phase très précoce, une phase précoce et une phase tardive. Et, ce sont ces phases qui expliquent la latence de ces virus, qui ne vont synthétiser que certains gènes et certaines protéines pour leur permettre de rester à l'état latent dans les cellules cibles et ce, sans intégration de leur ADN dans le génome cellulaire (contrairement au VIH). En effet, le VIH reste à l'état latent dans des sanctuaires, dans les lymphocytes latents, grâce à son intégration dans l'ADN cellulaire. En latence, les *Herpesvirus* ne vont répliquer qu'une seule des phases qui vont leur permettre de rester présents dans l'organisme infecté (14).

L'infection productive d'une cellule par les *Herpesvirus* requiert plusieurs étapes clés incluant I) l'entrée du virus, II) l'expression des gènes viraux ; III) la synthèse de l'ADN viral et ; IV) l'assemblage et le bourgeonnement des virions (16) (Figure 2).

1.1.2.3.1 Attachement et entrée du virus

Pour initier l'infection, le virus doit s'attacher à des récepteurs présents à la surface des cellules et fusionner son enveloppe avec la membrane cellulaire. Les glycoprotéines de l'enveloppe du virus assurent l'attachement et la pénétration du virus dans les cellules. Il est à noter qu'elles

induisent également une réponse immunitaire de l'hôte contre le virus. Des douze glycoprotéines de l'enveloppe des *herpesvirus*, les gB, gC, gD, gH et gL semblent spécifiquement impliquées dans ce processus. Les gE et gI forment une partie du récepteur Fc, alors que la fonction des autres glycoprotéines n'est pas encore tout à fait connue (17). L'attachement du virus est initié par l'interaction de la gC et de la gB avec les glycosaminoglycans du sulfate d'héparane de la surface cellulaire (18). La nucléocapside et les protéines du tégument sont alors libérées dans le cytoplasme de la cellule hôte. La nucléocapside et certaines protéines du tégument (VP16, VP1-2) sont transportées dans le noyau via les microtubules, alors que les autres protéines du tégument (vhs, US11) demeurent dans le cytoplasme de la cellule (16).

1.1.2.3.2 Expression des gènes

Les virus à ADN se servent de la cellule hôte de manière à exprimer leurs propres protéines nécessaires à leur réplication et à leur prolifération. De façon générale, les virus expriment deux types de protéines ; les protéines non-structurales impliquées dans la réplication de l'ADN viral et les protéines de structure qui forment le virion et une partie de l'enveloppe virale (19). Tous les virus herpétiques partagent la caractéristique d'une expression séquentielle hautement régulée de leurs gènes (20). Les gènes des *herpesvirus* peuvent donc être classés en trois groupes selon leur apparition dans le temps : I) les gènes très précoces (α); II) les gènes précoces (β) et; III) les gènes tardifs (γ). Les gènes α sont transcrits immédiatement suite à l'infection et assurent la transcription des gènes β qui codent pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral. Certaines protéines virales α et β entraînent également l'expression des gènes γ , qui codent majoritairement pour des protéines structurales (17). Les événements clés de la réplication des *herpesvirus*, la transcription de l'ADN, la synthèse, l'assemblage de la capsid, l'emballage de l'ADN et l'acquisition de l'enveloppe, prennent place dans le noyau de la cellule infectée (16).

1.1.2.3.3 Réplication de l'ADN viral

La réplication de l'ADN viral s'effectue dans des structures spécialisées formées dans le noyau de la cellule infectée, nommées compartiments de réplication (21). L'ADN linéaire viral nouvellement arrivé dans la cellule hôte se circularise à son entrée dans le noyau (22). La réplication de l'ADN est alors initiée à l'une des trois origines de réplication. La réplication de l'ADN viral nécessite absolument l'apport de sept protéines virales. La protéine de liaison (VP16) d'origine UL9 se lie à des éléments spécifiques dans une des origines de réplication et a pour effet le dédoublement de l'ADN viral (16).

1.1.2.3.4 Assemblage, encapsidation et bourgeonnement

L'assemblage de la capsid virale requiert la synthèse de plusieurs protéines virales tardives. Les quatre principales protéines de la capsid (UL19 : VP5, UL38 : VP19c, UL18 : VP23 et UL35 : VP26), la protéine d'échafaudage codée par le gène UL26.5 et la protéase UL26 sont nécessaires à ce processus. D'autres protéines ont également été impliquées dans l'assemblage de la capsid, mais ne sont pas indispensables, du moins dans des systèmes in vitro (19). Les capsides vides sont alors chargées de l'ADN viral par un processus qui implique simultanément le clivage de l'ADN concatémère en de simples unités monomériques et l'empaquetage de l'ADN, pour ainsi former la nucléocapsid (23, 24). Le bourgeonnement se fait à partir de la membrane nucléaire et encapsidation/décapsidation dans le RE et le Golgi.

La libération de nouveaux virions se fait par exocytose après passage dans l'appareil de Golgi où il y aura des phénomènes d'enveloppement comme la phosphorylation pour finaliser les virus (14).

La réplication virale est approximativement achevée en l'espace de 18 heures et ce processus entraîne des dommages cellulaires irréversibles (14, 16).

Les *Herpesvirus* sont des virus fragiles : ils résistent très peu de temps dans le milieu extérieur. L'infection se fait donc nécessairement par contact étroit (rapport sexuel, grossesse, accouchement). L'infectiosité des tissus infectés congelés est cependant conservée (15).

Cycle de réplication

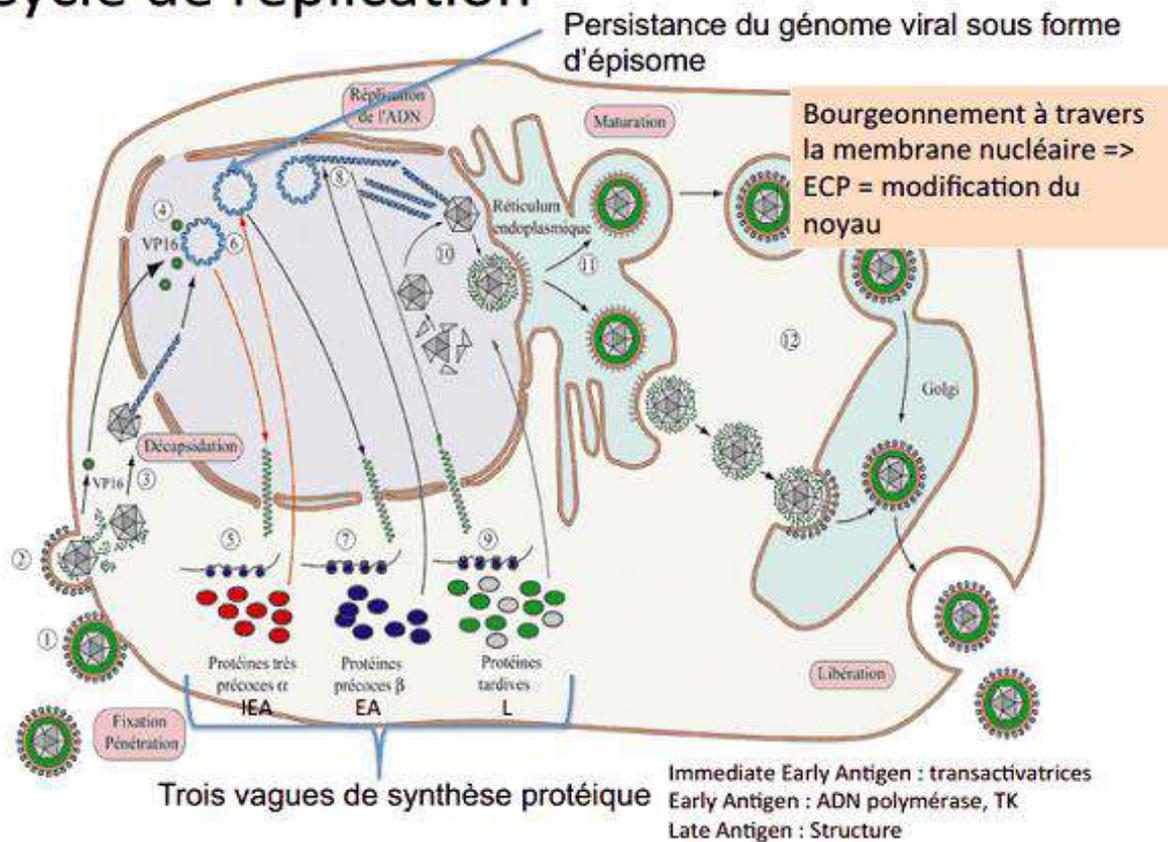


Figure 3: Cycle de réplication des *Herpesviridae* (14).

1.2 Chapitre II : Etude monographique

1.2.1 Herpès simplex virus 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2)

1.2.1.1 Caractères généraux

La structure des *Herpesvirus simplex* ou *Herpesvirus hominis* est identique à celle des autres *Herpesvirus*. Le cycle de réplication est le cycle classique d'un virus à ADN : (voir section 1.1.2.3.).

1.2.1.2 Epidémiologie

C'est une maladie strictement humaine car l'Homme est le seul hôte naturel. Il n'y a pas de variations saisonnières ni de vaccins.

- **Séroprévalence :**
 - **HSV-1 :** Elle varie de **40% à 95%** au niveau mondial (en fonction des mesures d'hygiène) (14).
 - **HSV-2 :** qui est une IST donc la prévalence est fonction du nombre de partenaires : de **0%** (dans l'enfance) à **90%** (pour les patients qui ont de nombreux partenaires) (14).

- **Tropisme :**

- HSV 1 : muqueuse oropharyngée, oculaire. Au-dessus de la ceinture.
- HSV 2 : muqueuse génitale. Au-dessous de la ceinture.

Dans la majorité des cas, l'herpès oral, c'est HSV-1 et l'herpès génital, c'est HSV-2, mais on peut très bien retrouver de l'HSV-1 au niveau génital et l'inverse (14, 15).

1.2.2 *Herpesvirus simplex de type 1(HSV-1) :*

1.2.2.1 Primo-infection :

La primo-infection a lieu très précocement vers un an (après la disparition des anticorps maternels). Elle est d'autant plus précoce que les conditions socio-économiques sont défavorables.

Dans 90% des cas, la primo-infection est inapparente. Sinon, elle se manifeste par une gingivostomatite avec fièvre et adénopathies cervicales (15).

1.2.2.2 Résurgence

Elle se fait par réactivation sous des causes diverses (soleil, froid, règles, émotion) et se localise dans le même territoire que la primo-infection : l'herpès est récidivant (15).

1.2.3 *Herpesvirus simplex de type 2(HSV-2)*

1.2.3.1 Primo-infection

En dehors du contexte néonatal, elle a lieu à partir de la puberté, à l'occasion des premiers rapports sexuels.

Dans 75% des cas la primo-infection est inapparente. Sinon elle se manifeste par des bouquets de vésicules ulcérées siégeant sur le gland, le prépuce, la vulve, le vagin (15).

1.2.3.1.1 Résurgence

Elle se fait par réactivation sous des causes diverses (soleil, froid, règles, émotion) et se localise dans le même territoire que la primo-infection : l'herpès est récidivant (15).

1.2.3.2 Pathogénie de l'infection à *herpes simplex virus*

Les virus sont fragiles et ne se propagent donc que par contact direct.

Les HSV ont un tropisme ectodermique (muqueuses buccales pour HSV-1, génitales pour HSV-2). Les virus pénètrent par voie muqueuse buccale, oculaire ou génitale et se

multiplient dans les cellules épithéliales. Après l'infection (apparente ou inapparente), le virus se réfugie dans un ganglion nerveux sensitif (trijumeau, ganglions sacrés). A la suite d'une réaction qui semble entraîner une diminution locale de l'immunité, le virus se distribue par voie nerveuse dans les mêmes territoires (15). Le pouvoir pathogène chez l'Homme des virus HSV-1 et HSV-2 est fonction de l'âge, le statut immunitaire, du type d'infection (primo-infection ou une récurrence) et du type de virus (14).

Les formes cliniques sont :

- **L'herpès oral** : la primo-infection est le plus souvent asymptomatique, mais peut-être à l'origine de gingivostomatites (le plus souvent due à HSV-1) qui touche principalement l'enfant de 6 mois à 5 ans et plus rarement l'adulte (25, 26). Cette gingivostomatite se caractérise par l'apparition de multiples vésicules douloureuses rapidement ulcérées dans la cavité buccale (14). L'infection latente a lieu dans le ganglion de Gasser (neurones sensitifs en relation avec le monde extérieur et le monde intérieur). Les réactivations peuvent être asymptomatiques (excrétion salivaire du virus) ou symptomatique (herpes labial) (25).



Figure 4 : Gingivostomatite à HSV-1 (14).



Figure 5: Herpès labial récidivant (14).

- **L'herpès génital :** La primo-infection a lieu à l'âge des premiers rapports sexuels et est asymptomatique 2 fois sur 3.

Le virus HSV-2 est la première cause d'herpès génital et est l'une des infections sexuelles les plus transmissibles dans le monde (27).

Bien que le virus HSV-1 soit le plus souvent transmis par contact non sexuel, des données récentes recueillies dans les pays industrialisés indiquent une proportion non négligeable de primo-infection d'herpès génital causée par HSV-1 (28).

- **L'herpès oculaire :** ça commence par une conjonctivite uni ou bilatérale qui peut se compliquer d'une atteinte cornéenne : kératite superficielle tout d'abord puis kératite profonde au fur et à mesure des récurrences (14). La primo-infection s'accompagne de signes généraux à type de fièvre, d'asthénie, d'adénopathies pré-auriculaires douloureuses (26). L'herpès oculaire est en général lié à la récurrence de HSV-1. La guérison est longue, les récurrences fréquentes et peut conduire à une baisse de l'acuité visuelle jusqu'à la cécité (si on ne les guérit pas) (14).

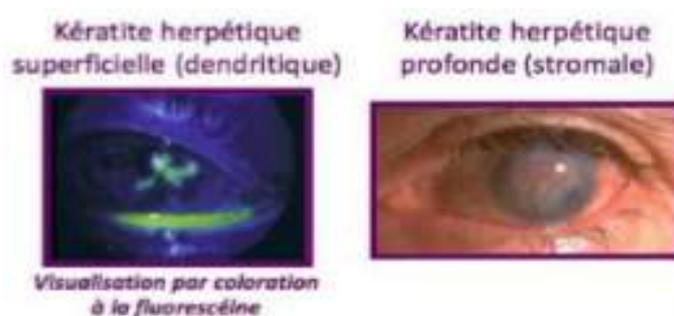


Figure 6 : Herpès oculaire

- On distingue également : l'herpès néonatal ainsi que l'encéphalite herpétique (15).

1.2.3.3 Diagnostic biologique

Les techniques directes sont à privilégier beaucoup plus que la sérologie, pour les herpès simplex. La sérologie des herpès simplex est complètement inutile.

1.2.3.3.1 Diagnostic direct

Le prélèvement doit se faire sur des lésions récentes à l'écouvillon et le transport se fera sur un milieu spécifique.

- **Culture cellulaire :**

Les virus herpès sont cultivables sur un grand nombre de cellules (Véro, Hep2, MRC5).

Les cellules les plus couramment utilisées sont les cellules diploïdes de fibroblastes humains MRC5 (26).

Le délai d'apparition de l'effet cytopathogène (ECP) de l'HSV est très caractéristique : il varie entre **1 et 5 jours** (contrairement au CMV où ça peut prendre 4 à 5 semaines) (14).

À l'isolement, les souches d'HSV-2 donnent souvent quelques syncytiums à deux ou trois noyaux. En coloration, le noyau est hypertrophié (ballonné), occupé par une vaste inclusion éosinophile amorphe, tandis que le nucléole a disparu, et que la chromatine est marginée en mottes basophiles sur la membrane nucléaire (26).

- **Détection du génome viral par PCR :**

Les techniques d'amplification génique sont de plus en plus utilisées pour le diagnostic des infections herpétiques car elles sont 3 à 4 fois plus sensibles que l'isolement par contamination des cellules en culture (14, 26). C'est l'examen de référence sur le LCR pour le diagnostic de l'encéphalite herpétique que l'on fait en urgence. La qualité du prélèvement est absolument primordiale (il ne faut pas juste effleurer les lésions, auquel cas, le résultat de la PCR sera faussement négatif). Il ne faut pas le faire sur des écouvillons secs, il existe des milieux de conservation pour les écouvillons qui permettent de ne pas passer à côté du résultat, à cause de la qualité du prélèvement (14).

- **Immunocyodiagnostic** par immunofluorescence ou immunoperoxydase ou détection d'Ag par ELISA à l'aide d'Ac monoclonaux spécifiques. Le principe est basé sur une immunocapture de l'antigène sur un support de plaque et une révélation par un deuxième anticorps marqué avec une enzyme. Elles sont réalisables sur des liquides de vésicules, mais non adaptées au dépistage des infections asymptomatiques (14, 25).

1.2.3.3.2 Diagnostic indirect

La sérologie

Elle est peu utilisée en pratique car la séroprévalence est élevée dans la population générale. Elle peut être utile en cas de primo-infection notamment chez l'enfant atteint de gingivostomatite et se fait par technique ELISA (14, 25). L'examen d'un sérum tardif (prélevé 2 à 3 semaines plus tard) est utile en cas d'infection primaire si l'on observe une séroconversion, une élévation du taux des anticorps (écart d'au moins 4 dilutions) et la présence d'IgM spécifiques du virus responsable. De nombreuses techniques sont utilisables. Les plus couramment utilisées sont les réactions d'immunofluorescence indirecte (IFI) et immuno-enzymatiques (ELISA) (15).

1.2.3.4 Traitement

- **L'aciclovir (Acycloguanosine)**

Il s'agit d'un analogue nucléosidique de la guanine qui est un inhibiteur de l'ADN polymérase mais n'agit que dans les cellules dans lesquelles les *herpèsvirus* sont en cours de réplication : elle n'est en effet active que sous forme phosphorylée et, au cours de la phase de réplication, la thymidine kinase capable de phosphoryler cette molécule est produite en forte quantité par le virus. L'affinité pour la thymidine kinase virale étant beaucoup plus élevée que pour la thymidine kinase cellulaire, cette molécule peut donc être administrée à des doses thérapeutiques non toxiques (15).

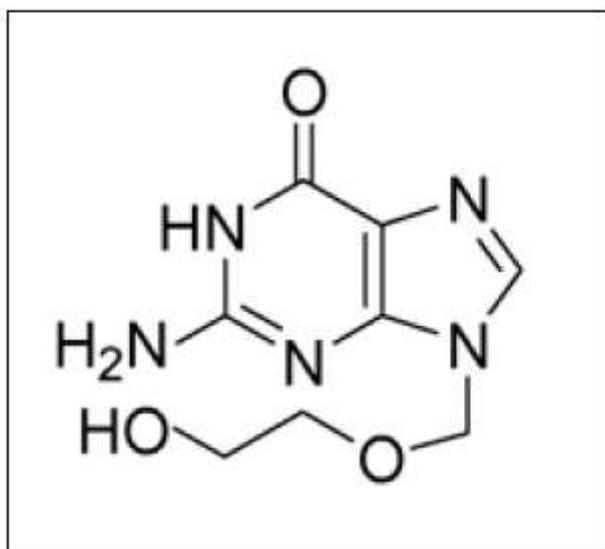


Figure 7: Structure chimique de l'aciclovir (26)

- **Foscarnet (Phosphonoformate)**

Les mutants TK sont responsables de manifestation graves chez les patients immunodéprimés. On a alors recours à d'autres molécules, telles le Foscarnet, molécule très toxique qui agit en déplaçant l'équilibre de la réaction de polymérase de l'ADN (15).

- **Vidarabine (Adénine-arabinoside)**

Il s'agit d'un inhibiteur compétitif de l'ADN polymérase des *herpèsvirus* qui provoque une distorsion de la double chaîne d'ADN et dont la faible toxicité autorise l'administration par voie intraveineuse au cours des encéphalites. On peut également l'utiliser sous forme de collyre dans les kératoconjunctivites (15).

- **Iduviran (5 iodo désoxyuridine)**

Il s'agit d'un analogue nucléosidique de la thymidine. Il peut être utilisé localement, en particulier sous forme de collyre dans les herpès viraux oculaires (15).

1.2.4 Virus de la varicelle et du zona (VZV)

Le virus zona varicelle correspond au HHV-3. Il fait partie de la sous-famille des *Alphaherpèsvirinae*. Il s'agit d'un virus strictement humain ayant un tropisme dermo-neurotrope (pour la peau et le système nerveux), ce qui va expliquer les signes cliniques.

Ce virus va donner 2 pathologies :

- La varicelle qui est une infection généralisée résultant de la primo-infection chez l'enfant, bien que l'on puisse avoir la varicelle en tant qu'adulte.
- Le zona qui est l'infection localisée résultant de la réactivation du virus latent chez l'adulte (14).

1.2.4.1 Epidémiologie

Le VZV est le même virus qui donne la varicelle en primo infection et le zona lors de la résurgence. C'est un virus ubiquitaire dont la séroprévalence est très élevée (90 % de la population adulte). C'est l'*herpesvirus* le plus contagieux, il se transmet à partir des vésicules cutanées, d'inhalation des gouttelettes respiratoires du sujet infecté et par passage transplacentaire pour le fœtus (25).

1.2.4.1.1 La primo-infection : la Varicelle

La primo-infection se traduit par la varicelle (varius=tacheté, moucheté), maladie bénigne chez l'enfant immunocompétent mais redoutable chez l'immunodéprimé.

Chez l'enfant de 2 à 6ans, la varicelle est très contagieuse ; 95% des enfant font une forme symptomatique (15).

Cette primo-infection se déroule en plusieurs phases :

- **Incubation** de quinze (15) jours.
- **Phase d'invasion** courte : elle dure deux (2) jours, caractérisée par une fièvre modérée puis la succession de vagues d'éruptions prurigineuses évoluant indépendamment en huit (8) jours et atteignent tout le corps (même le cuir chevelu et les paumes des mains) ainsi que la bouche et le pharynx (exanthème + énanthème) sous la forme de macules, de papules, puis de croûtes à liquide clair. Les lésions disparaissent sans laisser de cicatrices (celles-ci ne surviennent qu'en cas de surinfection de lésions de grattage).
 - **La période d'état** dure deux (2) à trois (3) semaines (15).

1.2.4.1.2 La récurrence : le Zona

Le zona est une réinfection endogène souvent unique caractérisée par une éruption unilatérale de vésicules disposées par groupe sur le trajet des nerfs de la sensibilité, souvent précédée d'une phase pré-éruptive fébrile et douloureuse.

Le zona est souvent intercostal (15).

L'évolution est plus ou moins rapide (2 à 4 semaines), bénigne sauf chez le vieillard, l'immunodéprimé et au cours du zona ophtalmique par suite des complications ophtalmiques possibles (15, 25).

1.2.4.2 Pathogénie de l'infection

1.2.4.2.1 Varicelle

La contamination est respiratoire mais, le contact avec les vésicules est aussi contaminant (14, 15).

La période d'incubation est de 14 jours.

Le virus atteint la peau et les muqueuses après contamination respiratoire, par dissémination hématogène : fièvre (38-38,5°C). Donc, au cours de la primo-infection, on aura une virémie transitoire.

Il va y avoir une multiplication dans l'épithélium bronchique et aussi dans le système réticulo-endothélial (lymphocytes, monocytes), qui va être à l'origine d'une virémie. Lors de cette virémie, il peut y avoir un passage possible transplacentaire chez une jeune femme qui fait une primo-infection. L'éruption se fait avec l'atteinte des cellules endothéliales de l'épiderme, il s'agit donc d'une éruption au niveau de la peau. Il y a une dissémination du virus avec l'atteinte de l'ensemble des cellules épithéliales de l'épiderme (14).

A la fin de la phase éruptive, quelques virus gagnent par voie nerveuse centripète les racines rachidiennes postérieures : c'est l'infection latente (15).

Les vésicules de la varicelle sont intra-épidermiques. Ce sont en fait des kératinocytes ballonnés par la réplication virale (effet cytopathique).

On va avoir une succession de plusieurs types de vésicules : Macules rosées ; vésicules en « goutte de rosée » et croûtes.

Les anticorps commencent à apparaître au 5ème jour et sont au maximum à 20 jours (14).

1.2.4.2.2 Zona

La latence du VZV se fait dans les nerfs crâniens et rachidiens. On aura donc : Soit le plus fréquemment, un zona intercostal ou dorsolombaire ; soit un zona apparaissant sur tout le territoire sensitif cutané (14).

Une fois que la primo-infection est terminée, le virus gagne les ganglions sensitifs, on a une infection latente. Le virus va se nicher dans le ganglion sensitif. Lors d'une diminution de l'immunité, il va y avoir une réactivation. Le virus est transporté par le nerf sensitif jusqu'à l'épiderme et il donnera un zona.

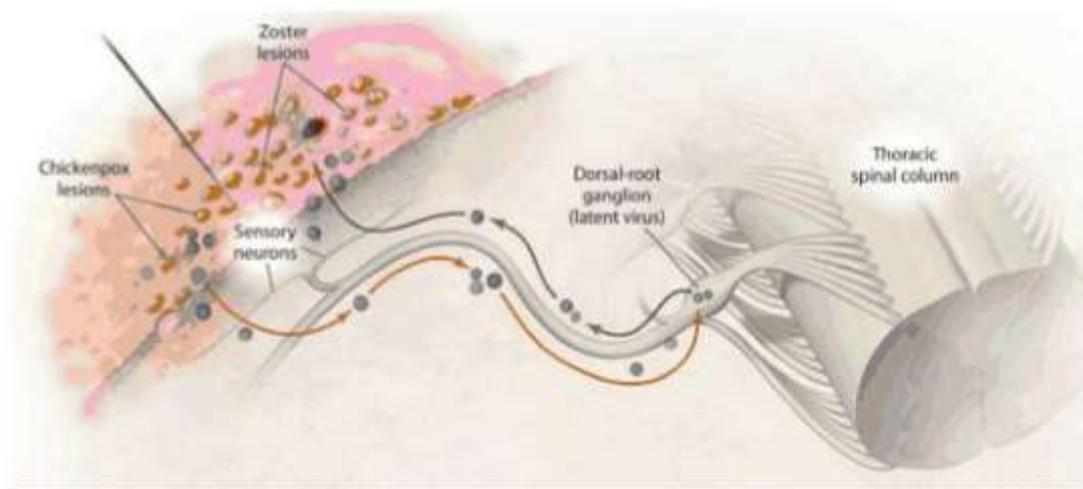


Figure 8: Etablissement de la latence du VZV dans les ganglions sensitifs (14).

Ce sont des récurrences qui sont localisées, avec des lésions unilatérales et à caractère métamérique.

Il y a des douleurs radiculaires à type de brûlure (très invalidantes et extrêmement douloureuses).

Le zona est fréquent chez le sujet âgé par « vieillissement du système immunitaire »

En général, on ne fait un zona qu'une seule fois dans sa vie (sauf pour les ID).

Si un patient atteint de zona est en contact avec une personne qui est séronégative pour le VZV, il est contagieux et peut lui donner une varicelle. En revanche, faire une varicelle ne peut pas entraîner l'apparition d'un zona chez une personne qui aura déjà fait une varicelle (14).

1.2.4.3 Diagnostic biologique

Chez l'immunocompétent, le diagnostic biologique n'est pas nécessaire car le diagnostic est clinique.

Le diagnostic biologique est réservé aux formes atypiques.

Dans ces cas-là, on fait principalement un diagnostic direct qui consiste à prélever du liquide de vésicule pour :

- Soit la recherche du virus par culture cellulaire.
- Soit la recherche de l'ADN du virus par PCR

Certains cas nécessitent un diagnostic de certitude :

- Femme enceinte : sérologie
- Immunodéprimé : PCR sur le LCR ou sur les vésicules.

La sérologie (recherche des Ac) n'a pas d'intérêt pratique, sauf épidémiologique ou pour un contrôle préalable à la vaccination, ou encore chez la femme enceinte qui a été en contact avec un patient atteint (14).

1.2.4.4 Prévention et traitement

1.2.4.4.1 Prévention

- Les gamma globulines de convalescents de zona (ZIg) sont fournies par les EFS (les immunoglobulines standard ont très peu d'anticorps spécifiques) et ne sont utilisées que dans le cadre de la prévention de la varicelle chez les sujets à risque. Elles doivent, pour être efficaces en cas d'infection, être injectées dans les 72 heures suivant le comptage.
- Le vaccin est un vaccin vivant atténué administrable par voie cutanée, qui génère une séroconversion dans 80 à 100% des cas (14).

1.2.4.4.2 Traitement

1.2.4.4.2.1 Varicelle

Chez l'immunocompétent, il n'y a pas besoin de traitement du virus lui-même, seulement des traitements symptomatiques (désinfection des lésions et antalgiques).

Pour une varicelle grave ou compliquée on utilise l'Acyclovir en IV.

1.2.4.4.2.2 Zona

Pour l'immunocompétent : Valaciclovir per os (pro-drogue de l'Acyclovir qui est transformée par des tyrosine kinases cellulaires et qui permet d'avoir plus de principe actif au niveau cellulaire) en cas de zona ophtalmique et chez les patients de plus de 50 ans en prévention des douleurs post-zostériennes.

Pour l'immunodéprimé on utilisera l'Acyclovir en IV.

On traite également les douleurs associées (algies post-zostériennes) avec des traitements symptomatiques : Paracétamol-codéine ; morphine ; anesthésiques locaux (14).

1.2.5 Cytomégalovirus (CMV)

1.2.5.1 Epidémiologie

L'étude histologique des glandes salivaires de nouveau-nés autopsiés met en évidence de grandes cellules avec une inclusion intranucléaire géante. La maladie, presque toujours fatale, a été de ce fait appelée maladie des inclusions cytomégaliennes néonatale (14, 15)

Ces inclusions sont retrouvées dans les parenchymes malades (cellules rénales, poumons, cerveau, foie). En 1956, Smith isole l'agent responsable par culture des sécrétions salivaires sur fibroblastes humains (15).

C'est un virus ubiquitaire dont la séroprévalence est très élevée pouvant atteindre les 100% dans la population adulte. La transmission se fait par contacts répétés, rapprochés : enfants en crèche ; transmission par voie sexuelle ; transmission nosocomiale par transfusion ou greffe d'organe ; transmission verticale de la mère au fœtus in utero, au nouveau-né lors de l'accouchement ou lors de l'allaitement (25). La dissémination est d'abord hématogène, par

les cellules endothéliales, mastocytes, macrophages et les polynucléaires. Il va y avoir une multiplication dans de nombreux types cellulaires, sauf dans les leucocytes (14).

1.2.5.2 Pouvoir pathogène

1.2.5.2.1 La primo-infection

Presque toujours inapparente. Elle se traduit chez l'enfant par un syndrome mononucléosique (15).

La dissémination est d'abord hématogène, par les cellules endothéliales, mastocytes, macrophages et les polynucléaires. Il va y avoir une multiplication dans de nombreux types cellulaires, sauf dans les leucocytes. L'incubation est de 4 à 8 semaines et la primo-infection est asymptomatique dans 90% des cas. Cependant il peut y avoir présence d'une fièvre dite en plateau avec une splénomégalie, une hépatomégalie ainsi qu'une adénopathie axillaire. Il peut y avoir dans de rares cas une primo-infection grave avec par exemple des myocardites qui sont très compliquées à mettre en évidence (14).

1.2.5.2.2 Fœtus et nouveau-né

L'infection congénitale est acquise par la transmission de la mère à l'enfant (14).

La forme asymptomatique est courante (le virus est pourtant excrété massivement à la naissance) (15).

On aura donc 10 à 15% de surdité uni ou bilatérales ainsi que 10 à 15% de séquelles neurologiques avec un retard psychomoteur grave (14, 15).

1.2.5.2.3 Infection latente

Le réservoir du virus se sont les monocytes du sang périphérique et les progénitures CD34+ de la moelle osseuse. L'ADN viral peut être mis en évidence dans les cellules endothéliales et épithéliales mais ce n'est pas fait en routine (14). Le virus serait actif périodiquement chez la personne immunocompétente et se traduirait par son excrétion à travers la salive, les urines et même les sécrétions lactées (14, 15).

1.2.5.2.4 Immunodéprimés

Chez les patients immunodéprimés, si leur taux de lymphocytes CD4 est inférieur à 100/mm³. S'ils sont inférieurs à 200/mm³ on aura apparitions de maladies opportunistes. Il peut y avoir une infection qui conduit à une chorioretinite à CMV qui va entraîner une cécité. Des atteintes gastro intestinales (surtout le colon) peuvent apparaître chez ce genre de patients, ainsi que des méningites lymphocytaires. Chez les receveurs d'organe l'infection surviendra dans les 3 premiers mois suivant la transplantation. Cette infection se traduira par une fièvre, une anorexie, parfois des myalgies, des arthralgies. On procèdera à

un suivi par PCR ainsi qu'un test de virémie hebdomadaire pour surveiller l'évolution d'un potentiel traitement préventif (14).

1.2.5.3 Diagnostic biologique

1.2.5.3.1 Diagnostic cytologique

Recherche de l'effet cytopathogène : recherche des cellules géantes dans le sédiment urinaire, les sécrétions bronchiques, les liquides amniotiques, les liquides de lavage broncho-alvéolaires, les biopsies d'organes, l'humeur aqueuse... après coloration (cellules dont le noyau contient une vaste inclusion en 'œil de chouette' avec margination nette de la chromatine) ou recherche des antigènes viraux par immunofluorescence directe à l'aide d'anticorps spécifiques marqués (15).

1.2.5.3.2 Culture cellulaire

Elle se fait sur cellules fibroblastiques humaines et est lente (8 à 15 jours). C'est une méthode sensible mais très lourde, qui dépend de la rapidité d'inoculation, un isolement positif doit être discuté puisque l'excrétion accompagne des résurgences cliniquement inapparentes (15).

1.2.5.3.3 Recherche du génome viral

La recherche de l'ADN viral par hybridation in situ ou par PCR est utile dans les cas graves (15).

1.2.5.3.4 Immunofluorescence indirecte

L'antigène est constitué par les cellules fibroblastiques inoculées par le CMV. On met en contact avec le sérum à étudier puis on visualise l'union Ag-Ac à l'aide d'un sérum anti-IgG ou anti-IgM humaines marqué à la fluorescéine (15).

1.2.5.3.5 Réactions immuno-enzymatiques (E.L.I.S.A)

L'antigène (extrait soluble d'une culture de CMV) est fixé sur les parois des puits d'une plaque de polystyrène. On met en contact avec le sérum à étudier puis on ajoute un sérum anti-IgG ou anti-IgM humaines marqué par une enzyme.

L'addition du substrat de l'enzyme est alors suivie de sa dégradation qui se manifeste par une coloration dont la densité optique est proportionnelle à la quantité d'enzyme (donc de complexes Ag-Ac) présents dans le milieu (15).

1.2.5.4 Traitement

Préventif

Il se fait surtout par voie orale. Les molécules utilisées sont : Ganciclovir ; Acyclovir chez les patients transplantés.

Traitement

Aujourd'hui on dispose de 3 inhibiteurs de l'ADN polymérase du CMV :

- Gancyclovir (Cymevan®) : analogue de nucléoside
- Cidofovir : analogue de nucléotide
- Foscarnet : analogue du pyrophosphate (14).

1.2.6 Virus d'Epstein-Barr (EBV)

1.2.6.1 Epidémiologie

Le *virus Epstein-Barr* ou EBV a été découvert en 1964 dans les cellules de lymphome de Burkitt au microscope électronique (14).

Comme tous les virus de la famille des *Herpesviridae*, l'EBV a pour seul hôte l'homme. Il est également ubiquitaire avec une séroprévalence > 90% chez les adultes (14, 25). Il y a deux pics au niveau de l'âge d'acquisition, qui dépendent de la classe socio-économique. 50% des enfants de 4 ans ont déjà des anticorps anti-EBV. La contamination est salivaire. La majorité des primo-infections à EBV sont asymptomatiques, il y a rarement de diagnostic à EBV avant 4 ans alors que la moitié de la population est déjà infectée. Le virus infecte les cellules épithéliales oropharyngées et s'y réplique. Ce sont essentiellement les lymphocytes B au niveau de l'oropharynx qui vont être activés et proliférer de façon polyclonale. Chez l'immunocompétent, cette prolifération est rapidement contrôlée (14).

1.2.6.2 Pouvoir pathogène

L'EBV infecte 2 types de cellules :

- les cellules épithéliales dans lesquelles a lieu un cycle productif entraînant une lyse cellulaire.
- les lymphocytes B où a lieu un état de latence.

Lors de la primo infection le virus se multiplie dans les cellules épithéliales de l'oropharynx, puis va infecter les lymphocytes B (15). Les lymphocytes B infectés ont à leur surface un antigène viral contre lequel a lieu une réponse immunitaire à médiation cellulaire : les lymphocytes T détruisent les lymphocytes B infectés, stimulant la production d'anticorps et sont responsables de l'apparition des signes cliniques de la maladie (14).

L'EBV est donc l'agent de la mononucléose infectieuse (MNI). De nombreux antigènes de types différents sont connus pour ce virus :

EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen) : Cet antigène est présent dans le noyau de toutes les cellules immortalisées par l'EBV. C'est le premier à apparaître lors de l'infection cellulaire par le virus.

LMP (Late Membrane Protein) : Cet antigène est présenté par les cellules transformées et il est reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques d'un sujet atteint de MNI ou de lymphome de Burkitt.

Les antigènes EBNA et LMP sont des antigènes de latence.

EMA (Early Membrane Antigen) : C'est un antigène glycoprotéique de l'enveloppe virale, détecté seulement par immunofluorescence directe.

EA (Early antigen) : Cet antigène apparaît à la phase précoce de réplication et correspond à des protéines qui interviennent dans la réplication du génome et sont présentes dans le noyau et le cytoplasme.

Les antigènes EMA et EA sont dits antigènes précoces.

LMA (Late Membrane Antigen) : C'est un antigène glycoprotéique d'enveloppe d'apparition tardive, cible des anticorps neutralisants.

VCA (Viral Capsid Antigen) : C'est l'antigène de la capside virale présent dans le cytoplasme et le noyau.

Les antigènes LMA et VCA sont dits antigènes tardifs (15, 25).

1.2.6.2.1 Primo-infection

Presque toujours inapparente (précoce dans les pays pauvres). Chez l'adolescent, la primo-infection est la mononucléose infectieuse (MNI) : c'est une maladie lymphoproliférative bénigne. L'incubation est longue (30 à 50 jours).

L'affection se caractérise par l'apparition des signes cliniques suivants : Asthénie ; fièvre ; adénopathies cervicales ; pharyngite ; céphalée ; splénomégalie ; éruption.

L'exanthème est quasiment certain si le sujet reçoit de l'ampicilline. La rupture de la rate est une complication possible (15).

1.2.6.2.2 Infection latente :

Elle est silencieuse et se traduit uniquement par une excrétion oropharyngée du virus qui peut contaminer un sujet séronégatif (15). Après la primo-infection, l'EBV qui est un virus lymphotrope (qui va infecter les lymphocytes) va persister à vie dans les noyaux des lymphocytes B. Cette infection latente va s'accompagner de l'expression d'une partie du génome virale, avec un cycle de réplication virale qui se divise en 3 phases. L'une de ces phases va permettre la production de protéines EBNA ce qui va nous permettre de les détecter grâce à des anticorps anti EBNA. Les EBNA n'apparaissent que 6 mois après la primo-infection (14).

1.2.6.3 Diagnostic biologique

1.2.6.3.1 Diagnostic direct

- **Culture cellulaire** : On ne la pratique pas en routine.

- **Biologie moléculaire (PCR)** :

La PCR peut révéler la présence du génome mais ne présente guère d'intérêt. En effet, à l'âge adulte, la plupart des sujets sont porteurs de virus à l'état latent, après primo-infection connue ou méconnue, et cela pendant leur vie entière (15). Elle constitue la principale technique du diagnostic virologique chez les sujets immunodéprimés (25).

- **Utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre un/des antigènes viraux** : utilisés dans le diagnostic anatomopathologique des proliférations tumorales associées à l'EBV.

1.2.6.3.2 Diagnostic indirect (Sérologie)

- **Recherche d'anticorps spécifiques** :

D'abord apparition des IgM puis relais par les IgG anti-VCA qui apparaissent en 1er, puis IgG anti-EBNA. Les éléments importants en diagnostic sont : IgM anti-VCA, IgG anti-VCA et IgG anti-EBNA. Les IgG anti-EBNA apparaissent tardivement, si elles sont présentes il s'agit d'une infection relativement ancienne (3 mois après le début de l'infection). Les IgM sont présentes surtout en phase aiguë (en théorie...), mais elles ne sont pas spécifiques de la phase aiguë. La sérologie est donc importante pour faire le diagnostic de primo-infection (14).

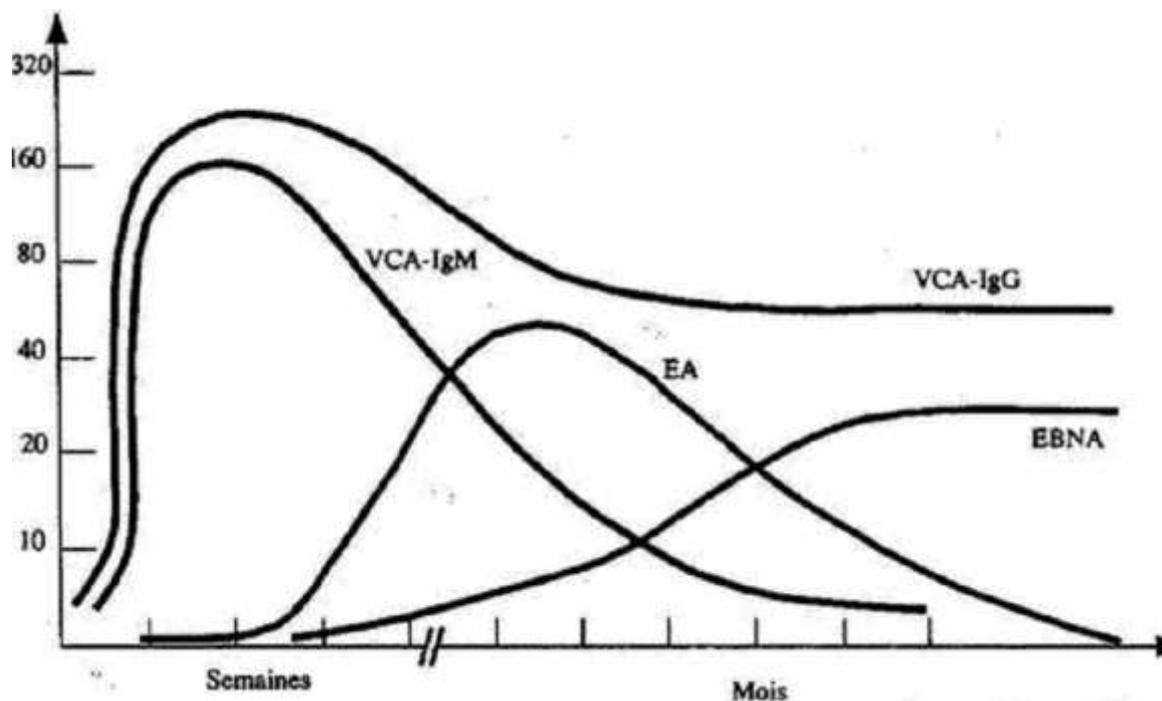


Figure 9: Diagnostic de l'infection à EBV.

Tableau II: Diagnostic de l'infection à EBV.

Interprétation	Ac hétérophiles	IgM VCA	IgG VCA	IgG EBNA	IgG EA
Séronégatif	-	-	-	-	-
Primo-infection	+/-	+	+/-	-	+
Infection ancienne	-	-	+	+	+/-
Carcinome du nasopharynx	-	-	+	+	+
Lymphome de Burkitt	-	-	+	+/-	+

-Recherche des anticorps hétérophiles :

Ces anticorps ont la propriété d'agglutiner les hématies de mouton, de cheval et de bœuf. Leur dépistage est possible par la recherche sur lame d'une agglutination des hématies de cheval formolées : c'est la MNI test.

- Positif, le test doit alors être contrôlé par la réaction de Paul-Bunnell et Davidson (PBD) ou, mieux par la recherche des anticorps spécifiques, car il pêche par excès.
- Le sérum peut en effet contenir d'autres anticorps hétérophiles qui ne sont pas caractéristiques de la mononucléose infectieuse.

Le PBD n'est positif que chez 30% des enfants atteints de mononucléose infectieuse : la recherche des anticorps spécifiques est alors indispensable (15).

1.2.7 Herpes Virus Humain 6 et 7 (HHV-6,7)

1.2.7.1 Epidémiologie, transmission

Les *Herpes Virus Humains 6 et 7* sont des virus de reconnaissance assez récente. Ce sont des virus ubiquitaires, très répandus dans la population générale puisque la séroprévalence est supérieure à 90% à l'âge adulte. La primo infection a lieu chez le jeune enfant, à partir de l'âge de 6 mois (qui correspond à la disparition des anticorps maternels). Pour HHV-6, la transmission se fait essentiellement par voie salivaire, ainsi que par les sécrétions respiratoires, le don de sang de tissu ou d'organe, par voie sexuelle. HHV-7 se transmet par voie salivaire et sexuelle (25).

1.2.7.2 Primo-infection

- **HHV-6** : La primo-infection est le plus souvent asymptomatique. Le tableau clinique le plus classique est l'exanthème subit, ou roséole infantile, ou 6e maladie. Il s'agit le plus souvent d'enfants de 6 mois à 3 ans, présentant une fièvre élevée pendant 3 à 5 jours, suivie d'une éruption du cou et du tronc disparaissant en 1 à 2 jours. Chez l'immunodéprimé, en particulier sidéen, il peut être responsable de pneumopathies, encéphalites, rétinites (15, 25).

- **HHV-7** : Le pouvoir pathogène de HHV-7 n'est pas très bien connu, semble proche de celui de HHV-6 (25).

1.2.7.3 Latence

Elle est inapparente. Après la primo-infection, les virus persistent dans l'organisme puisque leur génome est détecté dans les glandes salivaires et les monocytes de nombreux sujets sains (15).

1.2.7.4 Formes graves

Il en existe pas assez chez le sujet immunocompétent, pour qui l'évolution est toujours favorable. Chez les immunodéprimés, ils se comportent en pathogènes opportunistes et peuvent être à l'origine d'affections mortelles (pneumopathies, syndrome lymphoprolifératifs, encéphalites, hépatites fulminantes, rétinites) (15).

1.2.7.5 Pouvoir pathogène

Les lymphocytes T CD4⁺ circulants constituent le site majeur de la réplication des virus HHV-6 et 7 au cours de la phase d'infection virale active, tandis que les cellules épithéliales des glandes salivaires semblent constituer un site d'infection virale chronique. Les virus sont

fragiles et ne se propagent donc que par contact direct, la salive constituant le principal vecteur de la contamination interhumaine.

La présence d'HHV-6 et 7 dans le sang en font des virus théoriquement transmissibles par transfusion sanguine. Néanmoins, leur forte prévalence chez l'adulte (90%) ne permet pas de mettre en évidence un tel mode de transmission.

Quelques cas de primo-infection à HHV-6 ont été observés après transplantation rénale, hépatique et greffe médullaire (15).

1.2.7.6 Diagnostic biologique

Le diagnostic virologique, quand il est indiqué (en particulier chez les sujets immunodéprimés), repose sur la détection du génome viral par PCR dans le sang (lymphocytes circulants) ou dans le LCR en cas de signes d'atteinte neurologique.

Le génome viral peut être détecté dans la salive de sujets immunocompétents en dehors de tout contexte pathologique (25).

1.2.7.7 Traitement

La sensibilité des HHV-6 et 7 aux antiviraux est plus proche de celle du CMV que des HSV-1 et 2. Ils sont globalement sensibles au ganciclovir, au cidofovir, à l'acide phosphonoformique mais relativement résistant à l'acyclovir.

Si un traitement s'avérait nécessaire (formes graves de l'immunodéprimé), on pourrait utiliser :

- **Dihydropropoxyméthylguanine (Ganciclovir)**
Efficace si le virus est en phase de multiplication, pas s'il est à l'état latent. Toxicité hématologique et sur le sperme.
- **Phosphonoformate (Foscarnet) (15).**

1.2.8 Herpesvirus Humain 8 (HHV-8)

1.2.8.1 Epidémiologie, transmission

Il donne une primo-infection asymptomatique avec une latence dans les lymphocytes B. Il s'agit d'un virus grave car c'est l'agent du sarcome de Kaposi. Le sarcome de Kaposi est une atteinte cutanée fréquente chez les patients atteints de VIH. L'HHV-8 peut également donner des sarcomes lymphoprolifératifs comme la maladie de Castelman (14).

La transmission se fait essentiellement par voie sexuelle en Europe du Nord et aux Etats Unis. En Afrique, la transmission se fait également par voie horizontale (de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement, d'enfant à enfant) (25).

1.2.8.2 Pouvoir pathogène

L'histoire naturelle des infections à HHV-8 reste mal connue. Ces cibles cellulaires probables sont les lymphocytes B, les macrophages.

HHV-8 est associé formellement à des maladies, survenant le plus souvent au cours de l'infection par le VIH :

- Maladie de Kaposi : tumeur, qui se manifeste sous forme de lésions dermatologiques à type de macule ou plaque.
Des anticorps anti HHV-8 sont retrouvés dans 80 à 100% des cas de Maladie de Kaposi. Cette pathologie a presque entièrement disparu avec les associations d'antirétroviraux.
- Syndrome lymphoprolifératif (25).

1.2.8.3 Diagnostic biologique

- Diagnostic indirect :

Fait appel au sérodiagnostic (actuellement, seule l'IFI est disponible) (25).

- Diagnostic direct :

Amplification génique par PCR : dans les biopsies pour la maladie de Kaposi, sur les lymphocytes du sang périphérique (15, 25).

1.2.8.4 Traitement

Seuls les antirétroviraux sont utilisés en première intention chez les patients co-infectés par le VIH. Une diminution des traitements immunosuppresseurs est à discuter chez les patients transplantés et les traitements locaux et généraux non spécifiques sont proposés en fonction du stade de gravité de la maladie (15).

1.3 Chapitre III : Vue d'ensemble des uvéites virales et de la PCR

1.3.1 Les uvéites virales

Les virus sont des agents transmissibles de petite taille (20 à 250nm) formés d'un squelette protéique d'architecture variable et d'un acide nucléique de type ADN ou ARN (29).

Les virus les plus fréquemment rencontrés en pathologie oculaire appartiennent à la grande famille des *Herpesviridae* (incluant l'HSV-1,2 ; le VZV, le CMV, l'EBV et l'HHV-6,7,8). Il s'agit de virus enveloppés qui ont établi une relation privilégiée avec leur hôte. La primo-infection est souvent asymptomatique mais une atteinte cutanée ou un syndrome mononucléosique ne sont pas exceptionnels. Il existe alors une latence virale avec récurrence ultérieure soit au niveau du segment antérieur, sous forme de kérato-uvéite ou d'uvéite, soit au niveau du segment postérieur, sous forme d'uvéite ou de rétinite nécrosante.

Les virus de cette famille coexistent avec l'homme depuis plusieurs siècles. Ils ont développé des relations hôte/virus subtiles permettant une adaptation remarquable dans la majorité des cas. A l'occasion d'un événement particulier, l'équilibre pourrait être rompu, aboutissant alors à des lésions irréversibles mettant en jeu le pronostic vital (30).

1.3.1.1 Caractéristiques cliniques

Les viroses intraoculaires se manifestent principalement sous forme d'uvéites antérieures et plus rarement postérieures sans oublier les rétinites nécrosantes (31, 32).

Les présentations cliniques sont généralement stéréotypées mais beaucoup de progrès sont nécessaires avant d'associer avec une grande probabilité un tableau clinique spécifique à un virus donné (30).

1.3.1.2 Les atteintes liées aux virus de la famille des herpesviridae

1.3.1.2.1 Uvéites herpétiques (HSV)

Il s'agit de la première cause infectieuse d'UA (uvéite antérieure). L'atteinte uvéale se produit au cours d'une récurrence de la maladie et plus rarement lors de la primo-infection. Le virus rejoint la cornée et les structures uvéales par voie axonale à partir du site de latence ganglionnaire. L'uvéite est le plus souvent isolée, mais elle peut être associée à une kératite (11).

Il n'y a pas de continuum clairement établi entre l'atteinte initiale de l'épithélium cornéen, les poussées de kératite stromale et enfin l'uvéite antérieure. Ainsi l'uvéite antérieure herpétique est souvent isolée. Malgré l'isolement viral en culture ou l'identification par PCR, il n'est pas correctement établi si l'inflammation est en rapport avec l'effet cytopathogène ou la réaction immunitaire secondaire (33, 34). L'uvéite est classiquement aiguë, unilatérale, de type

granulomateux ou non granulomateux, hypertensive, discrètement synéchiante, associée à une atrophie sectorielle de l'iris (30).

Van der Lelij et al. ont précisé le diagnostic virologique à partir de l'humeur aqueuse au cours des uvéites antérieures isolées associées à une atrophie sectorielle de l'iris sur une série de 31 patients(35).

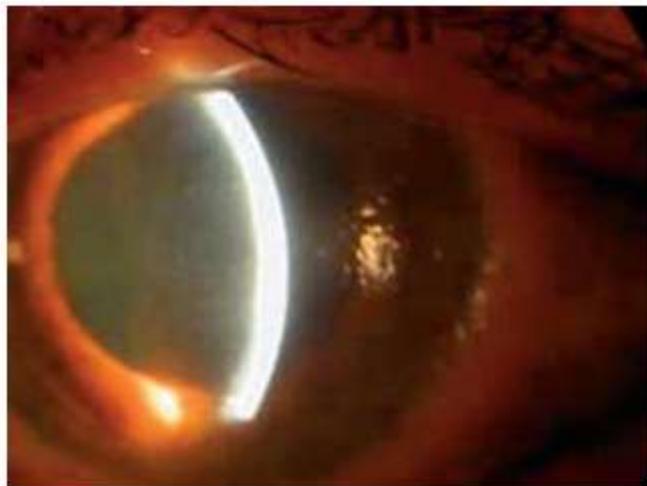


Figure 10: Uvéite antérieure hypertensive liée à HSV-1 (30).

1.3.1.2.2 Uvéites zostériennes (VZV)

Elles sont secondaires à une réactivation d'une infection latente par le VZV, et peuvent se voir au décours d'un zona ophtalmique dans 40 % des cas (36).

L'atteinte cornéenne n'est pas constamment associée à la segmentite antérieure. Le risque d'atteinte oculaire est plus important lorsqu'il existe une atteinte du nerf nasociliaire. Les uvéites antérieures survenant précocement sont volontiers bénignes mais les atteintes plus tardives (après 1 mois) sont généralement plus graves, s'associant parfois à une rétinite nécrosante, en particulier chez les patients immunodéprimés.

L'uvéite antérieure est souvent aiguë, unilatérale, hypertensive, plastique ou granulomateuse, synéchiante associée à une atrophie sectorielle de l'iris de plus petite taille par rapport à l'uvéite herpétique et à une hypertonie parfois majeure. L'uvéite est volontiers chronique nécessitant un traitement antiviral systémique et une corticothérapie locale à doses dégressives sur plusieurs mois voire plusieurs années (30).

1.3.1.2.3 Uvéites à cytomégalovirus

Elles étaient anecdotiques jusqu'en 2002 (37). En effet, elles étaient précédemment rapportées chez les patients immunodéprimés atteints du SIDA, les transplantés d'organe et les nouveau-nés. De véritables uvéites unilatérales chroniques granulomateuses rencontrées plus souvent chez les patients âgés mais immunocompétents doivent faire suspecter le diagnostic. La

biomicroscopie met en évidence des précipités retro cornéens de type viral, plutôt de petite taille et brunâtres. L'atrophie sectorielle de l'iris n'est pas constante mais aide au diagnostic. Les synéchies postérieures sont rares et éparses.

Il n'y a pas de rétinite à CMV associée. Les tests thérapeutiques basés sur l'acyclovir et ses dérivés sont inefficaces, mettant en doute le diagnostic d'uvéite virale chez ces patients pendant plusieurs années. Il s'agit encore une fois du triomphe de la PCR. En effet, la mise en évidence du génome du CMV au niveau de l'humeur aqueuse permet de modifier le traitement antiviral en introduisant le foscarnet ou le ganciclovir à doses d'attaque initialement, suivi du valganciclovir à doses d'entretien par la suite. La corticothérapie devient alors pleinement efficace et on assiste à une résorption des précipités rétro cornéens en quelques semaines (30). Le CMV serait présent à l'état latent au niveau des couches profondes de la rétine, en particulier l'épithélium pigmentaire. En l'absence de réplication virale, les antigènes viraux sont exprimés à la surface des cellules. Les lymphocytes T spécifiques vont être dirigés contre les cellules infectées. La cytotoxicité associée à la sécrétion de cytokines et de chimiokines proinflammatoires entraînerait l'uvéite en l'absence de tout effet cytopathogène viral (38).

1.3.1.2.4 Uvéites à Epstein-Barr virus

Des uvéites antérieures bénignes et transitoires ont été décrites au cours de la mononucléose infectieuse. La séroconversion a été longtemps considérée comme une preuve mais elle reste relative. C'est ensuite l'utilisation du coefficient de charge immunitaire qui a permis à plusieurs équipes de rapporter différentes associations comme certaines uvéites antérieures hypertensives(fig.7), choroidites multifocales, épithéliopathies en plaques et uvéites intermédiaires.

La PCR a été utilisée plus récemment pour identifier l'EBV dans certaines uvéites antérieures chroniques granulomateuses (30).

1.3.1.2.5 Uvéites à HHV-8

Il s'agit d'une nouvelle entité associant une atteinte conjonctivale basée sur une désorganisation anarchique de la trame vasculaire et d'une uvéite totale corticodépendante à fortes doses. La biopsie conjonctivale et la sérologie permettent de confirmer l'atteinte par le virus du sarcome de Kaposi qui ne touche pas exclusivement les sujets immunodéprimés. Le traitement par l'interféron-alpha recombinant semble être efficace mais des études complémentaires sont nécessaires avant de conclure (30).

1.3.2 Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Il s'agit d'une technique d'analyse moléculaire basée sur la mise en évidence d'une portion du génome viral. Les modalités de l'amplification sont bien connues et la procédure est appliquée aux liquides oculaires depuis le début des années 90. Toute présence de génome viral au niveau intra-oculaire doit être considérée comme pathologique. Il est difficile d'évaluer la fréquence de positivité de la PCR au cours des atteintes virales en faisant abstraction des rétinites. Différentes variantes de la PCR conventionnelle ont été récemment utilisées. La sensibilité et la spécificité de la méthode ne cessent donc de croître. La PCR en temps réel représente l'une des dernières nouveautés diagnostiques (39, 40). Elle a l'avantage de permettre une quantification rapide du matériel génétique viral après un cycle unique (30).

2 Deuxième partie : Étude expérimentale

2.1 Chapitre I : Matériel et Méthodes

2.1.1 Conception

2.1.1.1 Cadre, type et durée de l'étude

Le CHU-IOTA et l'INRSP nous ont servi de cadre pour l'étude.

Le CHU-IOTA a servi de lieu de collecte des échantillons ; tandis que l'INRSP a servi de lieu pour le traitement biologique des échantillons. Il s'agissait d'une étude prospective transversale à visée descriptive qui s'est déroulée du 1^{er} Janvier au 31 Août 2018.

Description du CHU-IOTA

Situé entre le camp militaire et le CHU Gabriel Touré, le CHU-IOTA est un établissement hospitalier public qui s'occupe des affections médicales et chirurgicales de l'œil. Depuis 1953 l'IOTA a existé et a intégré l'organisation de coordination et de coopération pour la lutte contre les grandes endémies (OCCGE) en 1960. Il est devenu propriété de l'état à la suite de la dissociation en 2000 et ayant pour vocation : soins, formation et recherche.

Le CHU-IOTA est composé de trois départements dirigés par une direction générale :

- Département clinique,
- Département de formation,
- Département de recherche et de santé publique.

Description de l'INRSP

Créé par la loi N° 81-17/AN-RM du 31 mars 1981, et érigé en Établissement Public à caractère Administratif (EPA) par la loi N° 93-014 du 11 février 1993, l'INRSP est passé de ce statut à celui d'Établissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST) par l'ordonnance N° 06-007/P– RM du 28 Février 2006.

Ses missions se résument comme suit :

- Promouvoir la recherche médicale et pharmaceutique en santé publique, notamment dans les domaines des maladies infectieuses, néoplasiques et sociales, de la santé familiale, de l'éducation sanitaire, de l'hygiène du milieu, de la biologie clinique appliquée à la nutrition et aux affections endémo-épidémiques, de la toxicologie médicale et expérimentale, de la bromatologie, de la génétique, de la socio économie, de la médecine et pharmacopée traditionnelle ;

- Participer à la formation technique, au perfectionnement et à la spécialisation dans le domaine de sa compétence ;
- Assurer la référence dans le domaine de la biologie clinique ;
 - Assurer la mise au point et la formulation des médicaments traditionnels améliorés ;
 - Assurer la protection du patrimoine scientifique relevant de son domaine ;
 - Promouvoir la coopération nationale et internationale dans le cadre des programmes et d'accords d'assistance mutuelle ;
 - Gérer les structures de recherche qui lui sont confiées.

L'INRSP comprend cinq départements et une agence comptable qui sont :

- Département Santé Communautaire (DSC) ;
- Département Médecine Traditionnelle (DMT) ;
- Département Formation (DF) ;
- Département Administration et Personnel (DAP) ;
- Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDR) qui se compose de :
 - o Service de biochimie clinique
 - o Service de parasitologie
 - o Service de sérologie
 - o Service d'hématologie
 - o Service de bactériologie-virologie

Le service de bactériologie-virologie est composé de plusieurs laboratoires et d'unités dont le laboratoire des IST/VIH. Ce dernier dispose de plateforme de PCR classique et de PCR en temps réel permettant le diagnostic moléculaire des agents pathogènes responsables d'IST dont les HSV.

2.1.1.2 Population d'étude

L'étude concernait les patients de tout âge reçus en consultation à l'IOTA et atteints d'uvéite.

2.1.1.3 Taille de l'échantillon

Nous avons procédé à un recrutement exhaustif des patients chez lesquels le diagnostic de l'uvéite a été posé cliniquement. 55 échantillons prélevés chez 52 patients ont été collectés et traités.

2.1.1.4 Critères d'inclusion et de non inclusion

- Ont été inclus dans cette étude, tout patient ayant un diagnostic clinique de l'uvéite confirmé par un sénior et consentant pour un prélèvement oculaire.
- N'ont pas été inclus dans l'étude, les patients qui n'ont pas donné leur consentement et ceux dont le prélèvement d'humeur aqueuse n'a pas pu être réalisé.

2.1.2 Matériel

2.1.2.1 Matériel biologique

Il s'agit de prélèvements d'humeur aqueuse effectués au niveau de la chambre antérieure de l'œil chez les patients atteints d'uvéites reçus en consultation au CHU-IOTA.

2.1.2.2 Matériel de prélèvement et de laboratoire

2.1.2.2.1 Matériel de prélèvement et de transport

- La seringue à insuline : elle a un volume de 1ml, un diamètre de 0,33x13mm et une dimension de 29Gx1/2"
- Le blépharostat qui sert à écarter les paupières.
- Le sigma-virocult qui est un milieu de conservation et de transport pour les virus.
- Une caisse isotherme pour le transport des échantillons.
- Un anesthésique local.
- La povidone iodine pour éviter toute infection.



Figure 11 : Séance de prélèvement.

Source : photo prise le 23/03/2019 à l'IOTA.



Figure 12 : Sigma-virocult.

Source : www.alifax.com

2.1.2.2.2 Matériel de laboratoire

- Le QIAGEN QIAMP DNA Blood Mini Kit pour l'extraction d'ADN.
- Les troussees HSV1 HSV2 VZV R-gene®, EBV R-gene®,
Et CMV HHV6,7,8 R-gene® pour l'amplification.
- Le Light Cycler 480® était l'automate utilisé pour l'amplification génique.



Figure 13 : Kit QIAGEN.

Source : www.clpmag.com

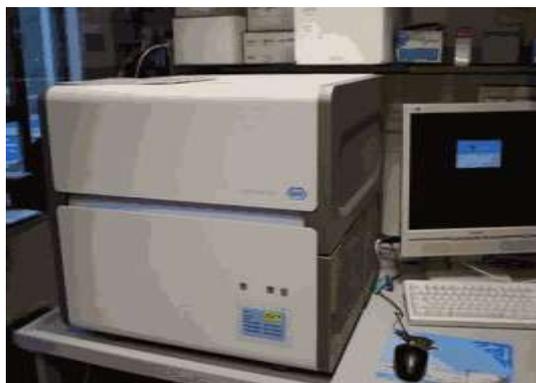


Figure 14 : Image du Light Cycler 480

Source : photo prise le 4/08/2019 dans la salle IST.

2.1.3 Méthodes

2.1.3.1 Collecte des données

Les données ont été collectées à l'aide d'un questionnaire chez les patients pour qui le diagnostic d'uvéite a été posé pendant la période de l'étude. La collecte a concerné les données suivantes :

- Données socio démographiques (âge, sexe, début de la maladie, résidence, profession) ;

- Données cliniques (Siège, type d'inflammation, latéralité, mode évolutif) ;
- Les facteurs de risques (antécédents médicaux, possession de chats).

2.1.3.2 Prélèvement et transport des échantillons

2.1.3.2.1 Prélèvement des échantillons

Les gouttes d'humeurs aqueuses prélevées au niveau de la chambre antérieure de l'œil à l'aide d'une seringue à insuline dans les conditions d'asepsies totales ont été recueillies dans des tubes stériles (virocult= milieu de conservation) pré positionnés sur le site et conditionnés par les techniciens de laboratoire du site.

2.1.3.2.2 Transport des échantillons

Les échantillons ont été transportés à l'INRSP à +4°C dans les caisses isothermes. Chaque échantillon était accompagné du questionnaire portant les informations sur le patient. Les échantillons étaient conservés à -80°C avant analyse.

2.1.3.3 Analyse des échantillons

Les échantillons ont été analysés selon des protocoles préétablis pour chaque virus. La PCR en temps réel a été utilisée pour le diagnostic quantitatif des différents virus.

2.1.3.3.1 Définition des témoins et des amorces utilisées

2.1.3.3.1.1 Composition du kit d'extraction

Le kit d'extraction QIAamp DNA Blood Mini Kit QIAGEN était constitué de :

- Mini-colonne QIAamp®
- Tubes collecteurs (2 mL)
- Tampon AL
- Tampon AW1 (concentré)
- Tampon AW2 (concentré)
- Tampon AE
- Protéinase K

2.1.3.3.1.2 Composition du Kit d'amplification et quantification

Pour toutes les réactions d'amplification génique, les réactifs suivants étaient utilisés :

- W0 : eau pour PCR
- IC2 : contrôle interne
- QS3 : contrôle qualitatif
- SC : contrôle de sensibilité
- R1 : prémix d'amplification pour HSV-1
- R2 : prémix d'amplification pour HSV-2

- R3 : prémix d'amplification pour VZV
- R4 : prémix d'amplification pour EBV
- R5 : prémix d'amplification pour CMV

2.1.3.3.1.3 Reconstitution des réactifs d'extractions

La plupart des réactifs étaient déjà prêts à l'emploi après homogénéisation.

Le volume et la concentration finale à utiliser pour chaque réactif non constitué ont été déterminés en fonction de la concentration initiale de la solution utilisée (voir SOP dans l'annexe).

Tous les produits nécessaires à la PCR ont été dégelés sur glace. Les éléments en contact avec les réactifs sont à usage unique.

Après reconstitution des réactifs d'extraction, les échantillons ont été analysés suivant les étapes suivantes de la PCR en temps réel :

✓ Extraction

L'ADN cible contenu dans l'échantillon et dans le contrôle d'extraction + inhibition (IC2) est extrait à l'aide du kit d'extraction QIAamp DNA Blood Mini Kit. Cette extraction manuelle associe les propriétés sélectives de liaison de gels de silice sur membrane avec la vitesse de micro centrifugation.

L'utilisation des colonnes de silice permet, une fois l'ADN fixé, de laver efficacement l'échantillon pour éliminer les contaminants.

L'étape d'élution permet d'obtenir un ADN purifié pour réaliser l'amplification.

✓ Amplification

Elle est réalisée au moyen de la technique des sondes d'hydrolyse 5' nucléase TaqMan®. Les Kits d'amplification que nous avons utilisés sont : HSV1 HSV2 VZV R-gene® ; CMV HHV6,7,8 R-gene® et EBV R-gene® pour rechercher les virus CMV ; EBV ; HSV-1,2 et VZV.

Les mélanges d'amplification prêts à l'emploi contiennent les amorces, les dNTPs, le tampon d'amplification, la Taq Polymérase, les sondes de chacun des paramètres viraux ainsi que la sonde et les amorces spécifiques du contrôle interne introduit dès l'extraction.

Les plaques étaient ensuite introduites dans le Light Cycler 480® pour subir une analyse par détection qualitative et quantitative.

2.1.3.4 Paramétrage du Light Cycler 480®

Tableau III : Paramètres du LC 480®

ETAPES	DUREE	TEMPERATURE	CYCLES
ACTIVATION TAQ POLYMERASE	15MIN	95°C	1
DENATURATION	20 SEC	95°C	} 45
HYBRIDATION ELONGATION	40 SEC	60°C	
REFROIDISSEMENT	30 SEC	40°C	1

2.1.3.5 Analyse et Interprétation des résultats

Le « System II » du LC 480® intègre dans son logiciel une compensation de couleur automatique FAM - HEX qui nous a permis d'effectuer la lecture.

L'analyse de la cible virale est effectuée en mode Absolute Quantification à 530 nm (FAM).

L'analyse du contrôle d'extraction + inhibition est effectuée en mode Absolute Quantification à 560 nm (HEX).

Pour chaque échantillon positif, un Crossing Point (CP) est calculé à 530 nm.

L'analyse des contrôles d'extraction + inhibition est effectuée en comparant le CP calculé pour chaque contrôle d'extraction + inhibition (IC2sample) au CP obtenu avec le contrôle d'extraction + inhibition de référence (IC2W0) à 560 nm (HEX).

2.1.3.6 Considérations éthiques

2.1.3.6.1 Confidentialité et anonymat

Chaque patient a été identifié dans l'étude par un nom de code unique suivi de son numéro de réception au labo. La confidentialité et l'anonymat ont été respectés.

2.1.3.6.2 Consentement libre et éclairé

L'adhésion à l'étude a été subordonnée au consentement des patients atteints d'uvéites à se faire prélever.

La démarche a été expliquée en langue locale pour s'assurer de sa bonne compréhension par les patients et éviter toute ambiguïté. Le DES en charge des prélèvements, expliqua au représentant légal (parent ou tuteur) de la patiente mineure et aux autres patients les objectifs, les procédures de l'étude ainsi que les risques et les avantages potentiels.

2.1.3.6.3 Risques et bénéfices

- ✓ **Risques** : l'étude ne présente aucun risque majeur pour les patients car l'acte médical pratiqué était fait sous la supervision d'un spécialiste.
- ✓ **Bénéfices** : Les examens de laboratoire ont été gratuits pour les patients inclus dans l'étude. L'identification et la maîtrise des pathogènes responsables des uvéites chez ces patients faciliteront leur prise en charge thérapeutique.

2.1.4 Variables analysées

- **Age** : dans notre étude l'âge était exprimé en année. Nous avons reparti les patients en fonction des tranches d'âges, il y en avait six au total.
- **Sexe** : il s'agissait soit du sexe masculin soit du sexe féminin.
- **Résidence ou quartier** : nous avons reparti les patients en fonction de leur provenance. Il s'agissait des six communes du district de Bamako, les régions et ceux qui venaient de l'extérieur du Mali.
- **Prise de médicament** : il s'agissait de savoir si le patient était sous traitement médicamenteux en l'occurrence la corticothérapie.
- **Profession** : c'est de savoir quel est le travail quotidien du patient.
- **Forme de l'uvéite** : il s'agissait d'uvéite aiguë ou d'uvéite chronique.
- **Localisation anatomique** : il s'agissait des uvéites antérieures, intermédiaire, postérieure et d'uvéite totale ou panuvéite.
- **Localisation latérale** : Il s'agissait de savoir si c'est un œil qui est touché (unilatérale) ou les deux yeux (bilatérale).
- **Résultat de la PCR** : il s'agissait de connaître ceux qui ont un résultat positif ou négatif.
- **Agent viral** : elle consistait à définir l'*herpesvirus* retrouvé après amplification génique.

- **Sérologie HIV** : il s'agissait de demander au patient s'il est séropositif ou non.
- **MST** : elle consistait à savoir si le patient a une maladie sexuellement transmissible.

2.1.5 Traitement et analyse des données

Les données ont été saisies sur une base élaborée sur Excel 2016, leur analyse sur IBM SPSS Statistic version 21, nous avons utilisé le test Khi 2 pour l'analyse statistique et le pack office 2016 nous a permis de réaliser la rédaction de ce travail.

3 Résultats

Caractéristiques des patients

L'étude a porté sur 55 échantillons d'humeur aqueuse prélevés chez 52 patients au CHU-IOTA. L'âge des patients varie de 13 (1 patient) à 80 ans (1 patient).

Les uvéites qui se définissent comme étant l'inflammation du tractus uvéal (iris, le corps ciliaire et la choroïde) étaient présentes chez l'ensemble des 52 patients reçus (100%). Nos données sur caractéristiques sociodémographiques sont traitées dans le tableau IV.

Tableau IV: Caractéristiques sociodémographiques des patients

Caractéristiques (n=52)	Effectif	Pourcentage	
Tranche d'âge	(11-20) ans	7	23,5
	(21-30) ans	19	36,5
Médiane =35ans	(31-40) ans	13	25
	(41-50) ans	8	25,4
	(51-60) ans	1	1,9
	(61 ans et plus)	4	7,7
	Sexe	Féminin	24
	Masculin	28	53,9
Adresse	C I	7	13,5
	C II	4	7,7
	C III	4	7,7
	C IV	1	1,9
	C V	13	25
	C VI	7	13,5
	Kayes	1	1,9
	Koulikoro	5	9,6
	RCI	1	1,9
	Segou	6	11,5
	Sikasso	3	5,8

La répartition des patients en fonction du sexe nous a donné une prédominance masculine avec un sex-ratio de 1,16. Nous avons également constaté que 76,5% des patients étaient âgés de plus de 20 ans avec une prédominance dans la tranche d'âge 21-30 ans représentant 36,5% et une médiane de 35ans.

La majorité de nos patients soit 25% provenaient de la Commune V du district de Bamako soit un total de 13 patients.

Tableau V : Aspects thérapeutiques avant le prélèvement.

Traitement	Effectifs	Pourcentage
OUI	8	15,4
Non	44	84,6
Total	52	100,0

L'analyse de ce tableau montre que 84,6% de nos patients n'étaient pas sous traitement médicamenteux.

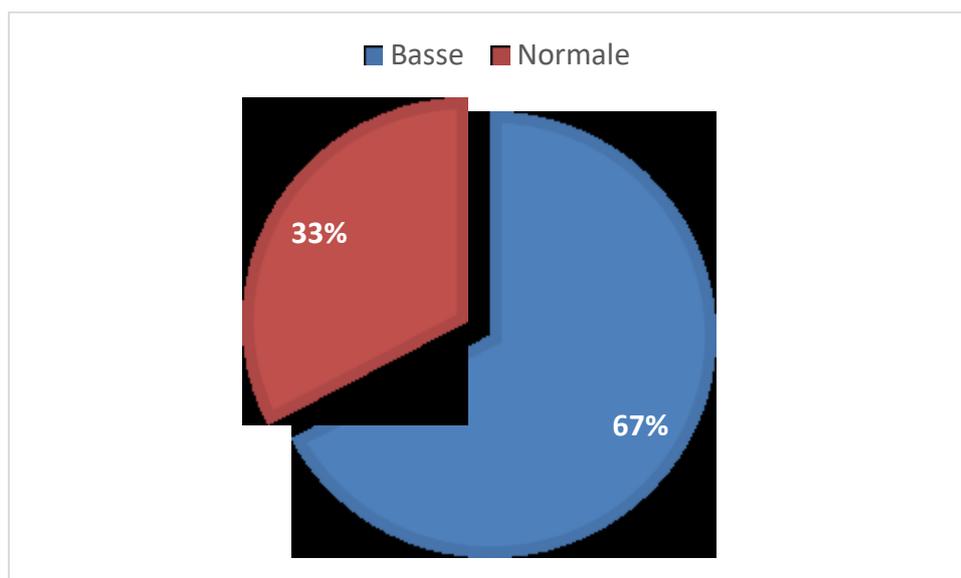


Figure 15 : Aspect de l'acuité visuelle chez les patients

La baisse de l'acuité visuelle était observée chez la plupart soit 67% de l'ensemble de nos patients.

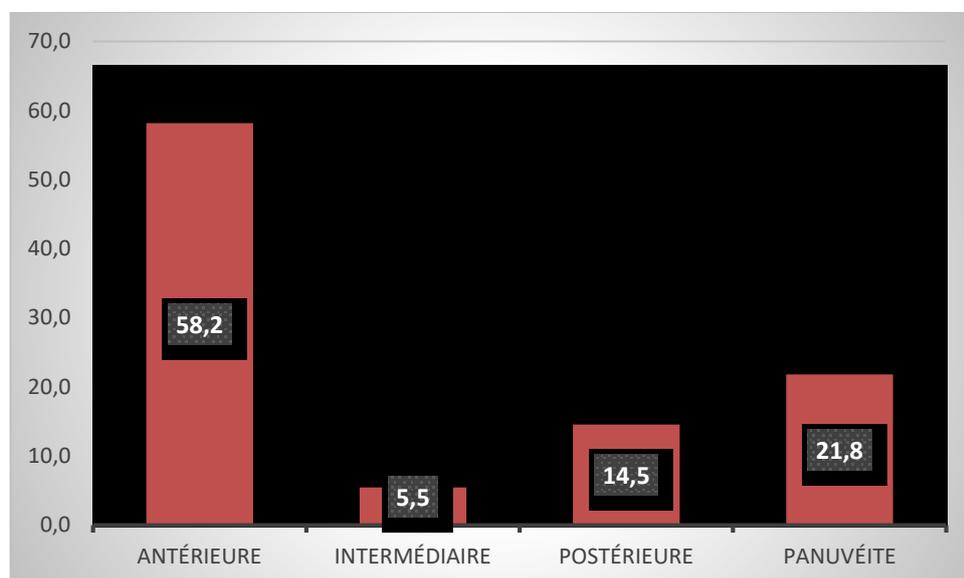


Figure 16: Répartition de nos patients selon la localisation anatomique de l'uvéite.

L'uvéite antérieure était la plus retrouvée dans notre population d'étude avec 58% des cas suivie de la panuvéite avec 22% des patients étudiés.

Tableau VI : Répartition des patients selon la sérologie HIV et de la présence de MST

	Sérologie HIV		MST	
	Effectifs	Pourcentage	Effectifs	Pourcentage
Oui	4	7,7	7	13,5
Non	48	92,3	45	86,5
Total	52	100,0	52	100,0

La majorité soit 86,5% de nos patients n'avaient pas de MST, tandis que quatre (4) de nos patients soit 7,7% avaient une sérologie HIV positive.

Résultats de l'amplification génique

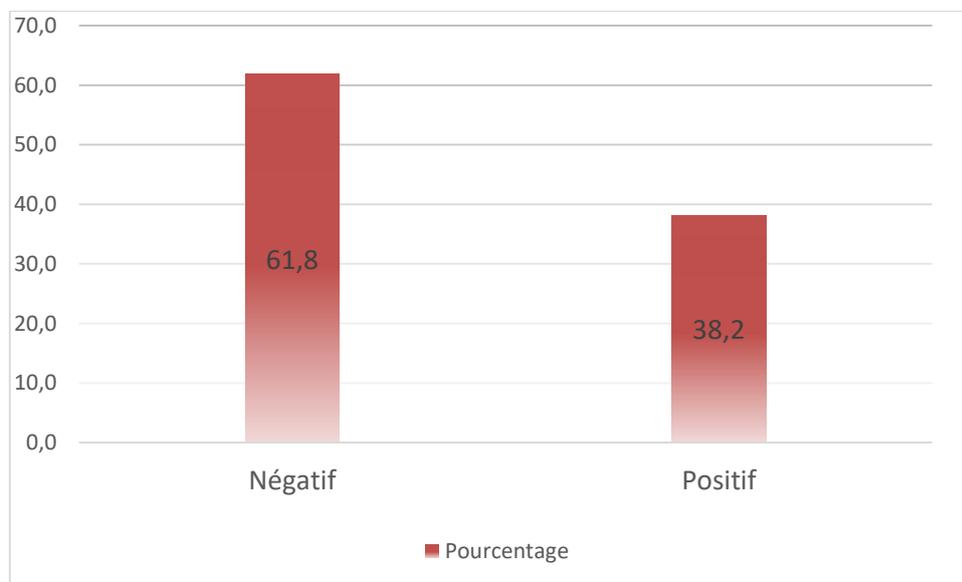


Figure 17: Résultat de la PCR en temps réel.

La détection par amplification génique des virus par la PCR en temps réel sur l'ensemble de nos échantillons a révélé 38% de positivité des virus visés par l'étude soit 21 patients de l'étude.

Tableau VII : Résultat de la PCR en fonction des virus retrouvés.

Résultats	Fréquences	Pourcentage
Absence de virus	34	61,8
CMV	3	5,5
EBV	6	10,9
HSV-1	5	9,1
HSV-2	6	10,9
VZV	1	1,8

Total	55	100,0
--------------	----	-------

Le tableau VII nous révèle une forte prédominance dans notre population d'étude des virus HSV-2 et EBV qui avaient un taux de 10,9% chacun.

Profil des patients détectés positifs pour les *Herpesviridae*.

Tableau VIII: Répartition des patients en fonction de la profession.

Profession	Effectifs	Pourcentage
Artisans	2	9,6
Agent de sécurité	1	4,8
Chauffeur	1	4,8
Commerçant	3	14,2
Cultivateur	2	9,5
Elève/Étudiant	3	14,3
Ménagère	8	38,0
Secrétaire	1	4,8
Total	21	100,0

L'analyse de ce tableau nous montre que les femmes ménagères étaient les plus touchées avec 38% de la population d'étude.

Tableau IX : Répartition des patients selon le sexe

Sexe	Négatif N(%)	Positif N(%)	Total
Féminin	13 (54,2%)	11 (45,8%)	24
Masculin	19 (67,9%)	9 (32,1%)	28
Total	32 (61,5%)	20 (38,5%)	52

Ce tableau nous montre que l'infection par les virus Herpès était plus retrouvée chez les femmes que chez les hommes.

Chi2=0,470 ; p= 0,395

Tableau X: Répartition selon les germes retrouvés et le mode évolutif.

Etiologies	Uvéite aiguë	Uvéite chronique
CMV	3	0
EBV	1	5
HSV-1	4	1
HSV-2	3	3
VZV	1	0
Total	12	9

Le tableau X montre que les HSV-1 et HSV-2 étaient les virus majoritairement retrouvés dans les uvéites aiguës alors que l'EBV était le plus diagnostiqué dans les uvéites chroniques.

Tableau XI: Répartition des germes retrouvés selon la localisation de l'uvéite.

Etiologies	Uvéite unilatérale	Uvéite bilatérale
CMV	3	0
EBV	3	3
HSV-1	4	1
HSV-2	5	1
VZV	1	0
Total	16	5

Ce tableau nous montre que chez nos patients qui avaient une uvéite unilatérale, le virus HSV-2 était le plus incriminé ; tant dis que le virus EBV était le plus en cause chez ceux qui avaient une uvéite bilatérale.

Tableau XII: Répartition selon les germes et localisation anatomique.

Etiologies	Uvéite	Uvéite	Uvéite	Panuvéite
	antérieure	intermédiaire	postérieure	
CMV	1	1	0	1
EBV	4	0	1	1
HSV-1	2	1	1	1
HSV-2	5	1	0	0
VZV	0	0	0	1
Total	12	3	2	4

Le tableau XII nous montre que le virus HSV-2 était majoritairement retrouvé dans les uvéites antérieures.

4 Discussion

• Limites de l'étude

L'effectif sur lequel a porté notre étude était de 52 patients venus en consultation au CHU-IOTA. Le choix de ce centre a été motivé par leur activité de consultation plus importante. Il s'agit de la seule structure spécialisée dans la prise en charge des maladies oculaires au Mali. Le faible nombre de patients inclus dans notre étude ainsi que le non diagnostic systématique des virus HHV6,7,8 pourraient être un point faible. Par contre nous avons réalisé la recherche concomitante de cinq virus de la famille des *Herpesviridae*. Cette étude nous a permis d'avoir des données sur le plan moléculaire de 55 prélèvements d'humeur aqueuse dont 2 chez le même patient.

• Résultats

- Caractéristiques des patients

L'étude a permis de faire un point sur le profil clinique et virologique de 52 patients. Dans notre série, 76,5% des patients étaient âgés de plus de 20 ans avec une prédominance dans la tranche d'âge comprise entre 21 et 30 ans représentant 36,5% de notre population d'étude. Une prédominance masculine a été constatée dans notre étude avec un sex-ratio de 1,16. Les uvéites surviennent à tout âge avec un pic de fréquence chez les individus en âge actif.

La moyenne d'âge globale était de 34ans (35,9 ans pour les hommes et 32,5 ans pour les femmes). Nos chiffres sont très proches de ceux rapportés par Singh et al., en 2004 en Inde lors d'une étude sur le modèle d'uvéite dans un centre ophtalmologique de référence au nord où ils ont rapporté que la moyenne d'âge était de 34,4 ans pour les hommes et 31,7 pour les femmes avec une prédominance du sexe masculin (51,98%) (43). La grande majorité des séries rapportent des fréquences plus faibles d'uvéites chez les enfants et les personnes âgées (44, 45). Dans notre étude, 25% de nos patients provenaient de la commune V du district de Bamako soit un total de 13 patients. Ce fort taux peut s'expliquer par le fait que c'est la deuxième commune la plus peuplée du district de Bamako.

Force est de constater que dans cette étude très peu de nos patients avaient déjà entrepris un traitement médicamenteux avant d'être reçu en consultation.

Parmi les patients qui avaient un résultat positif pour la PCR, les ménagères étaient les plus touchées avec un taux de 38%. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'elles sont plus exposées aux facteurs favorisant la réactivation des *Herpesviridae* comme l'hyperthermie et la fumée du bois ou du charbon.

- Caractéristiques cliniques

L'uvéite antérieure était la plus retrouvée chez les patients avec un taux de 58% suivie de l'uvéite totale 22%. Ce résultat est similaire à ceux rapportés par plusieurs auteurs en Arabie Saoudite, en Inde 2004 , et Italie en 2001 (43,46,47) en contraste avec Hosseini S.M et al qui ont trouvé la panuvéite (46,8%) comme forme majoritaire suivie de l'uvéite antérieure (37%) en 2004 au Nord-Est de l'Iran (48).

La majorité soit 86,5% de nos patients n'avaient pas de MST, tandis que quatre (4) de nos patients soit 7,7% avaient une sérologie HIV positive. Parmi les patients qui avaient une sérologie HIV positive, seulement un (1) était positif pour l'un des *herpesvirus* recherchés. Cela pourrait nous pousser à dire que le statut immunitaire n'est pas la seule condition indispensable pour la réactivation des *Herpesviridae*.

Dans notre série, la majeure partie de nos patients souffraient d'uvéite unilatérale soit 80% de l'ensemble de la population d'étude.

L'uvéite aiguë était la forme la plus rencontrée soit 58,2% au sein de notre population d'étude. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les patients vont à l'hôpital tôt pour se faire consulter.

La baisse de l'acuité visuelle constitue l'un des principaux motifs de consultation. La plupart de nos patients avaient une diminution de l'acuité visuelle soit 67% ; ce même constat a été rapporté par Malki Najla en 2013 au Maroc lors d'une étude sur les uvéites postérieures (8).

- Résultats de l'amplification génique

Dans notre étude, 38% de nos échantillons étaient positifs pour les 5 virus de la famille des *Herpesviridae* recherchés.

Ce taux est inférieur à celui de N. Gongyai et al en 2012 en Thaïlande qui ont trouvé 67% de résultat positif dans les uvéites antérieures lors d'une étude sur le modèle d'uvéite dans un centre ophtalmologique de référence mais qui a porté sur un total de 30 échantillons préalablement analysés pour d'autres étiologies d'uvéites auxquelles ils étaient négatifs (36).

Dans notre série, il y avait une forte prédominance des virus HSV-2 et EBV avec un taux de 10,9% chacun.

Les résultats de l'étude menée par N. Gongyai et al en 2012 indiquent que le CMV (33%) était la principale cause d'uvéites antérieures au sein de la population Thaïlandaise (36).

Les virus HSV-1 et HSV-2 étaient les virus majoritairement retrouvés dans les uvéites aiguës alors que l'EBV était le virus le plus diagnostiqué dans les uvéites chroniques. Cette prévalence élevée du virus EBV dans les uvéites chroniques met en évidence son caractère chronique et sa tendance cancérogène (49).

Nous avons constaté une prédominance du virus HSV-2 dans les uvéites antérieures ; cela confirme que ce virus n'est pas seulement impliqué dans les infections génitales (14). Cependant dans la littérature, il est rapporté que l'*herpesvirus* le plus rencontré en pathologies oculaires est le CMV (37, 50).

Dans notre étude il y avait une fréquence élevée du virus HSV-2 dans les uvéites unilatérales, alors que le virus EBV était quant à lui plus prévalent dans les uvéites bilatérales.

5 Conclusion

Les progrès considérables dans la recherche et l'identification microbiologique ont largement contribué au diagnostic étiologique des uvéites virales et en particulier herpétiques.

Nos résultats confirment que les *Herpesviridae* constituent une cause majeure d'uvéites à l'IOTA.

La PCR est une précieuse technique d'analyse qui doit être vulgarisée pour un diagnostic poussé devant les cas d'uvéites. La prise en charge des uvéites doit être multidisciplinaire pour un meilleur rendement diagnostique et thérapeutique.

6 Recommandations

Au vu de nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

✚ Aux cliniciens :

Penser aux *Herpesviridae* dans le bilan de diagnostic étiologique des uvéites.

✚ A la direction de l'INRSP et aux autorités sanitaires :

Etablir de meilleurs rapports avec les structures sanitaires, pour faciliter leur implication aux travaux de recherche menés avec leur collaboration.

Ajouter la PCR aux différentes analyses de routine avec un personnel qualifié pour des résultats crédibles.

Organiser des ateliers de formation à l'endroit des agents de santé sur la PCR.

✚ A la direction du CHU-IOTA

Former les DES dans la technique de prélèvement de l'humeur aqueuse.

7 Références

1. Lipski DA, Dewispelaere R, Foucart V, Caspers LE, Defrance M, Bruyns C, et al. MHC class II expression and potential antigen-presenting cells in the retina during experimental autoimmune uveitis. *J Neuroinflammation*. 2017 Dec 18;14(1):136.
2. Miserocchi E, Fogliato G, Modorati G, Bandello F. Review on the Worldwide Epidemiology of Uveitis. *Eur J Ophthalmol*. 2013 Sep 2;23(5):705–17.

3. DARRELL RW, WAGENER HP, KURLAND LT. Epidemiology of Uveitis. Arch Ophthalmol. 1962 Oct 1 [cited 2018 Dec 10];68(4):502-514.
4. Nussenblatt RB. The natural history of uveitis. Int Ophthalmol. 1990 Oct;14(5-6):303-8.
5. Gritz DC, Wong IG. Ophthalmology IW. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California: the Northern California epidemiology of uveitis study. 2004;111(3):491-500.
6. Harthan JS, Opitz DL, Fromstein SR, Morettin CE. Diagnosis and treatment of anterior uveitis: optometric management. Clin Optom. 2016;8:23-35.
7. ANDRIEUX. C; HLAB27 et uvéite antérieure aiguë. Inflamm'oeil [Internet]. 2010;Tyndall N°:1. Available from: <http://www.inflamoeil.org/IMG/pdf/1003fulltyndall28.pdf?43/4dc3235aad438c34c0fc54cd17ae4ec362a428a5>
8. Malki NAJLA. Profils épidémiologique, étiologique et thérapeutiques des uvéites postérieures. [cited 2018 Dec 10] 2013.
9. Barsky D. Anatomie du tractus uvéal. Ophthalmol Clin Duane sur CD-Rom. Philadelphia: J B Lippincott, 1990: chapter 31, 1-10.
10. Offret H, Bloch-Michel E. In: Œil et virus. Uvéites. Masson Paris;2000;p 271-306.
11. Zeghidi H, Saadoun D, Interne BB-LR de médecine, 2014 U. Les manifestations oculaires de la maladie de Behçet. p 1-4.
12. Page Web. Les Herpesviridae. [cited 2018 Dec 14]. Available from: [https://psyaanalyse.com/pdf/LES-HERPESVIRIDAE-DIAPORAMA-\(67-Pages-3,3-Mo\).pdf](https://psyaanalyse.com/pdf/LES-HERPESVIRIDAE-DIAPORAMA-(67-Pages-3,3-Mo).pdf)
13. Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. Drug Resist Updat. 2002 Apr 1;5(2):88-114.
14. Dr Bénédicte Roquebert. UE8-De l'agent infectieux à l'hôte: Herpesviridae [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 14]. Available from: <https://studylibfr.com/doc/757031/ue8->

roquebert-herpesviridae

15. A.Decoster. Les herpesvirus humains. [cited 2018 Dec 14]; Available from: <http://anne.decoster.free.fr/d1viro/vtelechar/vpoly/herpes04.pdf>
16. Bernard Roizman; David Knipe. Virus de l'herpès simplex et leur réplication. In Fields Virology, Fourth edn, pp. 2399-2459.
17. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. Lancet. 2001 May 12;357(9267):1513–8.
18. Herold BC, WuDunn D, Soltys N, Spear PG. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. 1991, J Virol 65, 1090-8.
19. Beer DG, Kardia SLR, Huang C-C, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. Nat Med. 2002 Aug 15;8(8):816–24.
20. Honess RW, Roizman B. Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade Regulation of the Synthesis of Three Groups of Viral Proteins. 1974;J Virol 14, 8-19.
21. Quinlan MP, Chen LB, Knipe DM. The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. Cell. 1984 Apr 1;36(4):857–68.
22. Uprichard SL, Knipe DM. Herpes simplex ICP27 mutant viruses exhibit reduced expression of specific DNA replication genes. 1996, J Virol 70; 1969-80.
23. Ladin BF, Blankenship ML, Ben-Porat T. Replication of herpesvirus DNA. V. Maturation of concatemeric DNA of pseudorabies virus to genome length is related to capsid formation. 1980, J Virol 33; 1151-64.
24. Ladin BF, Ihara S, Hampl H, Ben-Porat T. Pathway of assembly of herpesvirus capsids: An analysis using DNA+ temperature-sensitive mutants of pseudorabies virus. Virology. 1982 Jan 30;116(2):544–61.
25. Dr. CHABANI. Les virus à ADN. [cited 2018 Dec 14]. Available from:

http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/viro3an16m-04virus_adn-chabani.pdf

26. EL ASRAOUI R, Rachid. Herpès simplex virus 1 et 2 Aspects cliniques, diagnostique et traitement. 2009;
27. Cusini M, Antimicrobial MG-J of, 2001 U. The importance of diagnosing genital herpes. *J Antimicrob Chemother* 47 Suppl T1, 9-16.
28. Brugha R, Keersmaekers K, Renton A, Meheus A. Genital herpes infection: a review. *Int J Epidemiol.* 1997 Aug 1;26(4):698–709.
29. Agut H, Virus AF-CE et, 2000 U. *Virologie générale.* Masson Paris;2000:p 3-25.
30. Bodaghi B. Les uvéites virale. *Journal français d’ophtalmologie.*2004;27:528-537.
31. Labetoulle M, Offret H, Haut J, Bloch-Michel E, Ullern M, Monin C. [Acute retinal necrosis syndrome. Retrospective study apropos of 14 eyes in 11 patients]. *J Fr Ophtalmol.* 1995;18(12):777–87.
32. Frau E, Dussaix E, Offret H, Bloch-Michel E. The possible role of herpes viruses in multifocal choroiditis and panuveitis. *Int Ophthalmol.* 1990 Oct;14(5–6):365–9.
33. Gaynor BD, Margolis TP CEJ. Progrès dans le diagnostic et la gestion de l’uvéite herpétique. *Int Ophtalmo clin,*2000;42:85-109.
34. Jr CS, Imai Y. Diagnostic et prise en charge de l’uvéite antérieure herpétique. *International.* 2002;42:43-8.
35. Van der Lelij A, Ooijman FM, Kijlstra A, Rothova A. Anterior uveitis with sectoral iris atrophy in the absence of keratitis. *Ophthalmology.* 2000 Jun 1;107(6):1164–70.
36. Wensing B, Relvas LM, Caspers LE, Valentincic NV, Stunf S, de Groot-Mijnes JDF, et al. Comparison of Rubella Virus- and Herpes Virus-Associated Anterior Uveitis: Clinical Manifestations and Visual Prognosis. *Ophthalmology.* 2011 Oct 1;118(10):1905–10.
37. Markomichelakis NN, Canakis C, Zafirakis P, Marakis T, Mallias I, Theodossiadis G. Cytomegalovirus as a cause of anterior uveitis with sectoral iris atrophy.

- Ophthalmology. 2002 May 1;109(5):879–82.
38. Bodaghi B, Michelson S. Cytomegalovirus: virological facts for clinicians. *Ocul Immunol Inflamm.* 1999 Jan 8;7(3–4):133–7.
 39. Dworkin LL, Gilber TM, Van Gelder RN. Real-time quantitative polymerase chain reaction diagnosis of infectious posterior uveitis. *Ophthalmology.* 2002;110:1534–9.
 40. Bodaghi B, Clinics PL-O, 2002 U. Testing ocular fluids in uveitis. *Clin North Am.* 2002;15:271–9.
 41. Schacher S, Garweg J, Russ C, Böhnke M. Die Diagnostik der herpetischen Uveitis und Keratouveitis. *Klin Monbl Augenheilkd.* 1998 May 25;212(05):359–62.
 42. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K. Utilisation de la PCR multiplexe et de la PCR en temps réel pour détecter le génome du virus de l'herpès humain dans les liquides oculaires de patients atteints d'uvéite. *Br J Ophthalmol.* 2008;92:928–932.
 43. Singh R, Gupta V, Ophthalmology AG-I . Pattern of uveitis in a referral eye clinic in north India. *ijournal.in.* 2004;52:121–25
 44. Jakob E, Reuland MS, Mackensen F, Harsch N, Fleckenstein M, Lorenz H-M, et al. Uveitis subtypes in a german interdisciplinary uveitis center--analysis of 1916 patients. *J Rheumatol.* 2009 Jan 1;36(1):127–36.
 45. Perkins ES. Pattern of uveitis in children. *Br J Ophthalmol.* 1966 Apr [cited 2019 Feb 28];50(4):169–85.
 46. Islam SMM, Tabbara KF. Causes of uveitis at The Eye Center in Saudi Arabia: A retrospective review. *Ophthalmic Epidemiol.* 2002 Jan 8;9(4):239–49.
 47. Mercanti A, Parolini B, Bonora A, Lequaglie Q, Tomazzoli L. Epidemiology of endogenous uveitis in north-eastern Italy. Analysis of 655 new cases. *Acta Ophthalmol Scand.* 2001 Feb;79(1):64–8.
 48. Hosseini S, Shoeibi N, Ebrahimi E, Ghasemi M. Patterns of uveitis at a tertiary referral center in Northeastern Iran. *ncbi.nlm.nih.gov.J of Ophthalmic Vis Res* 2018;13(2):138–143.

49. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. Clin Cancer Res [Internet]. 2004 Feb 1;10(3):803–21.
50. Kongyai N, Sirirungsi W, Eye KP. Viral causes of unexplained anterior uveitis in Thailand. (2012) 26, 529–534.

*Prévalence des virus de la famille des Herpesviridae détectés par PCR en temps réel dans les uvéites
chez les patients reçus au CHU-IOTA*

8 Annexe

8.1 Questionnaire

Prévalence des virus de la famille des *Herpesviridae* détectés par PCR en temps réel dans les uvéites chez les patients reçus au CHU-IOTA

FICHE D'ENQUETE

N° d'identification du patient

DATE :

Renseignements sociodémographiques

AGE : ans SEXE : 1-Masculin 2- Féminin

PROFESSION :

ADRESSE : Quartier :

Commune I ; II ; III ; IV ; V ; VI

NATIONALITE :

NIVEAU D'INSTRUCTION :

1- Fondamental 1 2- Fondamental 2 3- Secondaire 4- Supérieur

5- Analphabète 6- Autres à préciser

CLINIQUE

MOTIF DE CONSULTATION

.....
.....

CIRCONSTANCE DE DECOUVERTE

.....

MODE DE

DEBUT

NOMBRE D'EPISODES :

FACTEURS

ANTECEDENTS MEDICAUX :

VIH : SI OUI VIH-1 / VIH-2

Êtes-vous Diabétique ? OUI / NON

Êtes-vous hypertendu ? OUI / NON

Avez-vous une insuffisance rénale ? OUI / NON

Êtes-vous sous corticoïde : OUI / NON

Etes-vous sous traitement OUI / NON

Si OUI Quel(s) type(s) de médicament(s) ?

.....
.....

EXAMEN OPHTALMOLOGIQUE

Siège de l'uvéite :

.....

Forme évolutive : Aigue / Chronique

SIGNES PARTICULIERS

ASSOCIES
.....

ANALYSES DE LABORATOIRE

HSV-1

HSV-2

VZV

CMV

EBV

Autres :

.....

8.2 PROTOCOLE D'EXTRACTION DES ADN DES VIRUS HSV-1, HSV-2 ; VZV ; CMV ET EBV.

8.2.1 INTRODUCTION

Ce protocole consiste à détecter et/ou mesurer la charge virale des virus HSV-1, HSV-2 et VZV dans les liquides biologiques (LCR ; humeur aqueuse), les frottis gynécologiques et buccaux.

NB : l'extraction et la quantification des virus HSV-1, HSV-2, et VZV avec la trousse HSV1 HSV2 VZV R-gene® peut être lancée simultanément avec la mesure de la charge virale EBV avec la trousse EBV R-gene® (réf.: 69-002B) ainsi que la mesure de la charge virale de CMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8 avec la trousse CMV HHV6,7,8 R-gene®. De ce fait ce protocole est valable pour les virus CMV et EBV.

8.2.2 Extraction

8.2.2.1 Préalable

Cette étape s'inscrit dans le cadre de l'utilisation de la trousse d'extraction des échantillons DNA EXTRACTION. Elle nécessite la reconstitution des réactifs. La trousse est conservée avant et après première ouverture au sec à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur la boîte, l'exception de la protéase QIAGEN qui est stable 6 mois à température ambiante sous forme lyophilisée. Après reconstitution, celle-ci doit être conservée à -15°C/-31°C, aliquotée, afin d'éviter des cycles de congélation et décongélation successifs, nous constituerons 5 aliquots.

8.2.2.2 Composition du kit

➤ Réactifs d'extraction :

Le kit est composé de :

A Mini-colonne QIAamp®	25 x 10
B Tubes collecteurs (2 mL)	10 x 50
C* Tampon AL	2x33ml
D** Tampon AW1 (concentré)	98ml
E Tampon AW2 (concentré)	66ml
F Tampon AE	128ml
G*** Protéinase K	6ml
ATL	50ml

➤ Réactifs de quantification et d'Amplification :

W0 : Eau pour extraction (qualité PCR)2 x 1,8 mL

IC2 Contrôle interne 2	1 x 1 ml
R0 Eau pour amplification (qualité PCR).....	1 x 300µL
QS1 Standard de quantification 1 HSV1+HSV2+VZV (2 000 copies/µL)..	1 x 300µL
QS2 Standard de quantification 2 HSV1+HSV2+VZV (200 copies/µL)...	1x 300µL
QS3 Standard de quantification 3 HSV1+HSV2+VZV (20 copies/µL)	1 x 300µL
QS4 Standard de quantification 4 HSV1+HSV2+VZV (2 copies/µL) ...	1 x 300µL
SC Contrôle de sensibilité HSV1+HSV2+VZV (0,5 copie/µL)	1 x 300µL
R1 Prémix d'amplification de HSV-1 et d'IC2	2 x 450µL
R2 Prémix d'amplification de HSV-2 et d'IC2	2 x 450µL
R3 Prémix d'amplification de VZV et d'IC2	2 x 450µL

8.2.2.3 Réactifs et matériel nécessaire et non fournis

- Éthanol 96-100%.
- Centrifugeuse de paillasse (6 000 g – 12 000 g).
- Vortex
- Tubes en polypropylène de microcentrifugation (1,5 mL, 2 mL).
- Bain-marie à +56°C.
- Micropipettes et cônes à filtre.
- Gants jetables.
- plaques pour les plateformes

8.2.2.4 Reconstitution des réactifs de HSV-1, HSV-2 et de VZV

a) Tampon AL (C)

- Homogénéiser le tampon AL (C) avant utilisation.
- Ne jamais conserver la protéinase K dans le tampon AL (C).
- S'il y a un précipité dans le tampon AL, le dissoudre en le chauffant à +70°C.
- À conserver à +2°C/+8°C.

b) Préparation du tampon AW1 (D)

- À conserver à +2°C/+8°C.
- Le tampon AW1 (D) est fourni sous forme concentrée.

Avant utilisation la première fois, ajouter un volume de 130 ml d'éthanol 96-100%, aux 98 ml de tampon concentré pour obtenir au final 228ml

c) Préparation du tampon AW2 (E)

- À conserver à +2°C/+8°C.

- Le tampon AW2 (E) est fourni sous forme concentrée. Avant utilisation la première fois, ajouter un volume de 160mL d'éthanol 96-100% aux 66 ml de tampon concentré pour obtenir à la fin 226ml.

8.2.2.5 Protocole d'extraction

NB : Les échantillons, le réactif IC2 et W0, décongelés doivent avoir été impérativement homogénéisés avant de suivre l'étape.

8.2.2.5.1 Echantillons

Sont concernés par le présent protocole les prélèvements sur les ulcérations buccales et génitales, les liquides biologiques (LCR, humeur aqueuse).

8.2.2.5.2 Mode opératoire

8.2.2.5.2.1 Préalable

- Mettre les échantillons, IC2 et W0 à une température de +18°C/+25°C.
- Mettre la température du tampon d'éluion AE (F) à +18°C/+25°C.
- Vérifier que les tampons AW1 (D) et AW2 ont été reconstitués (Voir chapitre « Reconstitution des réactifs »)
- S'il y a un précipité dans le tampon AL (C), le dissoudre en le chauffant à +70°C.
- Toutes les étapes de centrifugation sont réalisées à température ambiante.

8.2.2.5.2.2 Lyse

- a) Préparer autant de tubes de 1,5 ml de microcentrifugation qu'il y a d'échantillons et ajouter un tube dans lequel le mélange (**W0+IC2**) sera extrait ; les identifier en les marquant sur le bouchon.
- b) Préchauffer le bain-marie à +56°C.
- c) Pipeter 200 µL de tampon AL(C) et les déposer au fond de chacun des tubes de microcentrifugation de 1,5 ml identifiés.
- d) Ajouter 20 µL de protéinase k.
- e) Ajouter 10 µL de contrôle interne **IC2**.
- f) Ajouter 200 µL de **W0** dans LE tube identifié pour le mix **W0+IC2**.
- g) Ajouter 200 µL d'échantillons dans les tubes identifiés pour les échantillons. Si le volume d'échantillon disponible est inférieur à 200µL, il peut être complété avec du PBS ou de TBE, mais ATTENTION, le résultat obtenu sur cet échantillon ne sera que qualitatif.
- h) Mélanger en vortexant pendant 15 sec. Pour que la lyse soit efficace, il est nécessaire de bien mélanger afin d'avoir une solution parfaitement homogène.
- i) Incuber à +56°C pendant 10 min.

j) La lyse est complète après 10 min d'incubation.

NB : Des temps d'incubation plus longs n'ont pas d'effet sur le rendement ou la qualité de l'ADN extrait. Les agents potentiellement infectieux peuvent être inactivés en incubant l'échantillon à +95°C pendant 15 min après la lyse. Toutefois des incubations prolongées à de telles températures peuvent conduire à une dégradation de l'ADN.

k) Centrifuger brièvement les tubes pour enlever les gouttes présentes dans les bouchons.

8.2.2.5.2.3 Chargement de la colonne

a) Ajouter 200 µL d'éthanol 96-100 % par tube et mélanger en respectant un temps de passage au vortex de 15 secondes.

b) Centrifuger brièvement les tubes pour enlever les gouttes présentes dans les bouchons.

c) Transférer avec précaution le contenu sur une colonne QIAamp® emboîtée sur un tube de 2 ml. S'assurer de ne pas mouiller le haut de la colonne (zone de contact avec le bouchon).

d) Fermer le bouchon afin d'éviter les contaminations croisées entre échantillons et centrifuger à 6000 g pendant 1 min. S'il reste de la solution sur la membrane de la colonne, centrifuger à nouveau jusqu'à ce que la solution passe au travers de la membrane.

e) Placer les colonnes sur un tube de 2 mL propre et éliminer les tubes contenant les filtrats.

8.2.2.5.2.4 Lavage

a) Ouvrir les colonnes avec précaution et ajouter 500 µL de tampon AW1 (**D**). Fermer les colonnes et centrifuger à 6 000 g pendant 1 min.

b) Placer les colonnes sur un tube de 2 mL propre et éliminer les tubes contenant les filtrats.

c) Ouvrir les colonnes avec précaution et ajouter 500 µL de tampon AW2 (**E**).

d) Fermer les colonnes et centrifuger à pleine vitesse (12 000 g) pendant 3 min.

e) Placer les colonnes sur un tube de 2 mL propre (non fourni) et éliminer les tubes contenant les filtrats.

f) Centrifuger 1 min à pleine vitesse (14000 rpm). Cette étape sert à éliminer tout risque de remontée de tampon AW2 (**E**) sur la colonne lors de la décélération de la centrifugeuse, ou lors du transfert des colonnes hors du rotor.

g) Placer chaque colonne sur un tube de 1,5 mL propre (non fourni) identifié et éliminer les tubes contenant les filtrats.

8.2.2.5.2.5 Elution

NB : Ce sont les colonnes qui doivent être jetées et non les tubes collecteurs.

a) Ouvrir les colonnes avec précaution et ajouter 50 µL de tampon d'éluion AE (**F**).

b) Fermer les colonnes et incubé pendant 5 min à température ambiante.

c) Centrifuger à 6000 g pendant 1 min.

d) L'ADN extrait est contenu dans l'éluât. L'ADN extrait est stable un an lorsqu'il est conservé à -15°C/-31°C.

8.3 Protocole d'Amplification et de détection en temps réel

8.3.1 Définition

L'amplification est réalisée au moyen de la technique des sondes d'hydrolyse 5' nucléase TaqMan® (n° de brevet : 5210015, 5487972).

Les mélanges d'amplification sont prêts à l'emploi, et contiennent les amorces, les dNTPs, le tampon d'amplification, la Taq Polymérase et les sondes de chacun des paramètres viraux HSV-1, HSV-2, VZV ainsi que la sonde et les amorces spécifiques du contrôle interne (IC2) introduit dès l'extraction (avant lyse).

8.3.2 Matériel nécessaire

Micropipette (P20) et cônes à filtre stériles de 20 µL.

- Light Cycler 480 (System II), Mx3005P.
- Centrifugeuse de plaque pour Applied Biosystems ou Mx3005P.
- Gants jetables.
- Capillaire, tube ou plaque adapté à chaque instrument d'amplification temps réel validé avec la trousse HSV1 HSV2 VZV R-gene®.
- Bloc froid adapté à chaque instrument d'amplification temps réel validé avec la trousse HSV1 HSV2 VZV R-gene®.

8.3.3 Préparation de la plaque

Avant chaque utilisation :

- Les réactifs doivent être décongelés complètement à **température ambiante** avant le début de l'essai.
- Homogénéiser chaque réactif (au vortex durant 2 secondes ou par pipetages successifs) et centrifuger brièvement.
- S'assurer que le portoir réfrigéré ait été décontaminé 30 min sous U.V.
- S'assurer que le portoir réfrigéré ait bien été pré-refroidi à +2°C/+8°C.

NB: Afin de suivre l'évolution de la charge virale d'un patient test après test, il est impératif que les analyses successives des échantillons soient réalisées strictement selon le même protocole et avec les mêmes instruments d'extraction et d'amplification.

Sur LC 480

ETAPES		DUREE	TEMPERATURE	CYCLES
Les rampes de montée et descente en température sont paramétrées par défaut, jusqu'à 20°C/sec, ou 100%				
ACTIVATION TAQ POLYMERASE		15MIN	95°C	1
AMPLIFICATION	DENATURATION	20 SEC	95°C	45
	HYBRIDATION ELONGATION	40 SEC	60°C	
	REFROIDISSEMENT	30 SEC	40°C	1

NB : Sur LightCycler 480, deux systèmes optiques existent : seul le « System II » est compatible avec l'utilisation de la trousse HSV1 HSV2 VZV R-gene® ainsi que les autres trousses. Le « System II » intègre dans son logiciel une compensation de couleur automatique

8.3.4 PREPARATION DE L'AMPLIFICATION

Dans la pièce réservée à l'amplification

NB : Afin d'éviter au maximum les contaminations, refermer les puits au fur et à mesure des distributions.

Replacer les prémix d'amplification (R1, R2, R3), les standards de quantification (QS) et le contrôle de sensibilité(SC) à -15°C/-31°C immédiatement après utilisation.

- Faire un flux et reflux de 15 µL dans les prémix afin d'assurer leur répartition homogène dans les puits.
- Pipeter 15 µL de prémix d'amplification et les déposer dans les puits.

NB : Bien respecter l'ordre d'ajout des échantillons/réactifs.

- Ajouter 10 µL de chaque échantillon extrait dans 1 tube contenant le prémix d'amplification correspondant au virus recherché.

- Ajouter 10 µL de contrôle de sensibilité (SC) dans le tube dédié (cf. paragraphe « Les contrôles »).

- Ajouter 10 µL de chaque standard (du **QS4** au **QS1**) par tube contenant le prémix d'amplification correspondant au virus recherché (cf. paragraphe « Les contrôles »).

- Ajouter 10 µL de **IC2+W0** extrait dans le tube dédié. Ce tube constitue le contrôle **IC2W0** (cf. paragraphe « Les contrôles »).

- Centrifuger les tubes dans l'appareil approprié puis les transférer dans le thermocycleur.

8.3.4.1 Vérification et lancement du programme HSV-1 HSV-2 VZV R-gene®.

Lancer le programme d'amplification décrit en chapitre « Programme ».

- Désigner les échantillons et les contrôles.

- Pour la quantification de HSV-1 et/ou HSV-2 et/ou VZV entrer les valeurs de standard suivantes en copies/ml:

	Quantification
	Extraction 200uL Elution dans 50uL(copies/ml)
QS1	500 000
QS2	50 000
QS3 (Qualitatif)	5 000
QS4	500

8.3.5 Analyse et Interprétation des résultats

Note: 530 nm = « FAM » ou « Green »

560 nm = « VIC » ou « Hex ».

8.3.5.1 Analyse sur Light Cycler 480 (système III)

- Activer la compensation automatique FAM - HEX du LC480 (System II)
- L'analyse de la cible virale est effectuée en mode Absolute Quantification à **530 nm** (FAM).
- L'analyse du contrôle d'extraction + inhibition est effectuée en mode Absolute Quantification à **560 nm** (HEX).
- Pour chaque échantillon positif, un Crossing Point (CP) est calculé à **530 nm**.
- L'analyse des contrôles d'extraction + inhibition est effectuée en comparant le CP calculé pour chaque contrôle d'extraction + inhibition (**IC2sample**) au CP obtenu avec le contrôle d'extraction + inhibition de référence (**IC2W0**) à **560 nm** (HEX).

8.3.6 Validation et interprétations des résultats

8.3.6.1 Validation du test

NB : Pour valider l'expérience, toutes les conditions énumérées ci-dessous doivent être impérativement remplies.

Dans le cas contraire, l'ensemble de l'expérience avec échantillons, contrôles et standard(s), doit être réitéré.

Note : CT = Crossing Threshold pour la plupart des plateformes de PCR temps réel ou CP (Crossing Point) pour les appareils de la gamme Light Cycler. Par souci de simplification de la notice, seul le terme CT est utilisé.

1ère CONDITION : IC2W0 ne doit donner aucun signal (CT) à **530 nm**.

2ème CONDITION : IC2W0 doit donner un signal (CT) inférieur ou égal à **32 cycles** à **560 nm**.

3ème CONDITION :

- Interprétation quantitative : La valeur de CT du QS3, ainsi que la pente ou l'efficacité requise pour la gamme standard doivent être comprises entre les valeurs listées dans le tableau ci-dessous.

Interprétation qualitative : la valeur de CT du QS3, qui sert de contrôle positif, doit être comprise entre **31** et **35** cycles à **530 nm**.

8.3.6.2 Interprétation des résultats

- Chaque résultat d'échantillon est analysé individuellement.
- Un CT s'affiche pour tous les échantillons positifs.
- L'absence de CT correspond à un échantillon négatif ou inhibé et/ou mal extrait.

Contrôled'extraction+Inhibition (IC2sample)	CT [IC2sample] ≤ CT [IC2W0] + 3 cycles		CT [IC2sample] > CT [IC2W0] + 3 cycles	
	Echantillon NON INHIBÉ et correctement extrait		Echantillon INHIBÉ et/ou mal extrait	
ECHANTILLON	CT calculé	CT non calculé	CT calculé	CT non calculé
Interprétation Quantitative HSV-1, HSV-2, VZV	Pathogène détecté Quantification validée	Pathogène non détecté	Pathogène détecté Quantification à refaire	Résultat invalide
Interprétation Qualitative HSV-1, HSV-2, VZV	Pathogène détecté	Pathogène non détecté	Pathogène détecté	Résultat invalide

FICHE SIGNALYTIQUE

Nom : Diarra

Prénom : Barnabas

Adresse E-mail : diarra.barnabas@yahoo.fr

Année universitaire : 2018-2019

Pays : Bamako/ Mali

Titre de la thèse : Prévalence des virus de la famille des *Herpesviridae* détectés par PCR en temps réel dans les uvéites chez les patients reçus au CHU-IOTA.

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et de Pharmacie (FAPH), BP.1805 Bamako.

Résumé :

Introduction

Les uvéites représentent une cause non négligeable de cécité dans le monde avec une incidence variable de 60 à 700/ 100 000 habitants. Les virus de la famille des *Herpesviridae* constituent une des étiologies les plus fréquentes. Leur diagnostic demeure très difficile dans notre contexte en raison de l'accès limitée aux plateaux technique adéquats en l'occurrence la PCR.

Cette étude a pour but d'évaluer la prévalence des *Herpesviridae* dans les uvéites en milieu hospitalier au CHU-IOTA.

Méthodologie

Il s'agit d'une étude prospective descriptive qui s'est déroulée de Janvier à Août 2018 et a porté sur 55 échantillons d'humeur aqueuses prélevés chez 52 patients.

Les ADN cibles contenus dans les échantillons et dans le contrôle d'extraction + inhibition (IC2) ont été extrait à l'aide du kit d'extraction QIAamp DNA Blood Mini Kit puis amplifiés au moyen de la technique des sondes d'hydrolyse 5' nucléase TaqMan® grâce aux kits : HSV1 HSV2 VZV R-gene® ; CMV HHV6,7,8 R-gene® ; EBV R-gene®. L'automate utilisé pour la circonstance était le Ligth Cycler 480®.

Résultats

Lors de notre étude, nous avons trouvé un sexe ratio de 1,1 avec un âge médian de 34ans avec les extrêmes de 13ans et 80ans. Le taux de positivité total était de 38% (21/55). Parmi les

échantillons positifs, les *Herpesviridae* retrouvés étaient l'HSV-1, l'HSV-2, le VZV, le CMV, et l'EBV avec des pourcentages respectifs de 9,1 ; 10,9 ; 1,8 ; 5,5 et 10,9. Chez les ménagères, les virus EBV et HSV-1 étaient les plus en cause (37,5%). Le virus le plus retrouvé dans les uvéites antérieures était le HSV-2 (41,7%). Dans les formes aiguës le virus HSV-1 (33,3%) était le plus incriminé.

Conclusion :

Nos résultats confirment que les *Herpesviridae* constituent une cause d'uvéites dans notre contexte. Les uvéites de type antérieure et de forme aiguë étaient les plus fréquentes. Les virus HSV-2 et EBV étaient les plus retrouvés. La PCR est une précieuse technique d'analyse qui doit être vulgarisée pour un diagnostic poussé devant les cas d'uvéites.

Mots clefs : Uvéites ; *Herpesviridae* ; PCR ; HSV ; EBV.

Prevalence of viruses of the family *Herpesviridae* detected by real time PCR in uveitis in patients received at CHU-IOTA.

Abstract

Introduction

Uveitis is a significant cause of blindness worldwide with a variable incidence of 60 to 700 / 100,000 inhabitants. Viruses of the *Herpesviridae* family are one of the most common etiologies. Their diagnosis remains very difficult in our context because of the limited access to the appropriate technical platforms in this case the PCR.

The aim of this study is to evaluate the prevalence of Herpesviridae in uveitis in hospitals at CHU-IOTA.

Methodology

This is a prospective descriptive study that ran from January to August 2018 and included 55 aqueous humor samples taken from 52 patients.

The target DNAs contained in the samples and in the extraction + inhibition control (IC2) were extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit and then amplified using the TaqMan® 5' nuclease hydrolysis probe technique with kits: HSV1 HSV2 VZV R-gene®; CMV HHV6,7,8 R-gene®; EBV R-gene®. The automat used for the circumstance was the Light Cycler 480®.

Results

In our study, we found a sex ratio of 1.1 with a median age of 34 years with extremes of 13 years and 80 years. The total positivity rate was 38% (21/55). Among the positive samples, the Herpesviridae found were HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, and EBV with respective percentages of 9.1; 10.9; 1.8; 5.5 and 10.9. Among housewives, EBV and HSV-1 were the most involved (37.5%). The most common virus found in anterior uveitis was HSV-2 (41.7%). In the acute forms HSV-1 virus (33.3%) was the most incriminated.

Conclusion

Our results confirm that Herpesviridae are a cause of uveitis in our context. Uveitis of the anterior type and acute form were the most frequent. The HSV-2 and EBV viruses were the most recovered. PCR is a valuable analytical technique that must be popularized for advanced diagnosis in cases of uveitis.

Keywords: Uveitis; Herpesviridae; PCR; HSV; EBV.

SERMENT DE GALIEN

- **J**e jure en présence des maîtres de cette Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes chers condisciples.
- **D**'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;
- **D**'exercer dans l'intérêt de la santé publique ma profession, avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- **D**e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine. En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.
- **Q**ue les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
- **Q**ue je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !