

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE**



ANNEE 2009

THESE N° 3138 / 1

**RECHERCHE DE L'HERPES CHEZ LES DONNEURS DE
CORNEE PAR PCR TEMPS - REEL SUR PRELEVEMENT
SCLERAL**

**T H E S E
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Présentée et soutenue publiquement le : 9 Octobre 2009

PAR

Stéphanie PETITPAS

Née le 21 Avril 1978 à Auchel



EXAMINATEURS DE LA THESE

Mr le Professeur Adenis

- Président

Mme le Professeur Alain

- Juge

Mr le Professeur Labrousse

- Juge

Mr le Professeur Robert

- Juge

Mme Baclet

- Membre invité

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE**

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur LASKAR Marc
Monsieur le Professeur VALLEIX Denis
Monsieur le Professeur PREUX Pierre-Marie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

* C.S = Chef de Service

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BEDANE Christophe (C.S)	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe (C.S)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (C.S)	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
COGNE Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (Sur 31/08/2011)	PEDIATRIE
DENIS François (Sur 31/08/2011)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DUDOGNON Pierre (Sur 31/08/2009)	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DUMAS Jean-Philippe (C.S)	UROLOGIE
DUMONT Daniel (C.S)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
FEUILLARD Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
GAINANT Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION
GASTINNE Hervé (C.S)	REANIMATION MEDICALE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

MATHONNET Muriel
MAUBON Antoine (C.S)
MELLONI Boris
MERLE Louis (C.S)
MONTEIL Jacques
MOREAU Jean-Jacques (C.S)
MOULIES Dominique (C.S)
MOUNAYER Charbel
NATHAN-DENIZOT Nathalie
PARAF François
PLOY Marie-Cécile
PREUX Pierre-Marie
RIGAUD Michel (Surnombre 31/08/2010)
ROBERT Pierre-Yves
SALLE Jean-Yves (C.S)
SAUTEREAU Denis (C.S)
SAUVAGE Jean-Pierre (Sur 31/08/2011)
STURTZ Franck
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre
TREVES Richard
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
VALLAT Jean-Michel (C.S)
VALLEIX Denis
VANDROUX Jean-Claude (Sur 31/08/2011)
VERGNENEGRE Alain (C.S)
VIDAL Elisabeth (C.S)
VIGNON Philippe
VIROT Patrice (C.S)
WEINBRECK Pierre (C.S)
YARDIN Catherine (C.S)

CHIRURGIE DIGESTIVE
 RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
 PNEUMOLOGIE
 PHARMACOLOGIE CLINIQUE
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
 NEUROCHIRURGIE
 CHIRURGIE INFANTILE
 RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
 ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
 ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
 BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
 EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 OPHTALMOLOGIE
 MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
 GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE
 OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
 RHUMATOLOGIE
 CANCEROLOGIE
 NEUROLOGIE
 ANATOMIE – CHIRURGIE GENERALE
 BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
 EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE-PREVENTION
 MEDECINE INTERNE
 REANIMATION MEDICALE
 CARDIOLOGIE
 MALADIES INFECTIEUSES
 CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel	Parasitologie et Mycologie
ANTONINI Marie-Thérèse (CS)	Physiologie
BOURTHOMIEU Sylvie	Cytologie et Histologie
BOUTEILLE Bernard	Parasitologie - Mycologie
CHABLE Hélène	Biochimie et Biologie Moléculaire
DRUET-CABANAC Michel	Médecine et Santé au Travail
DURAND-FONTANIER Sylvaine	Anatomie – Chirurgie Digestive
ESCLAIRE Françoise	Biologie Cellulaire
FUNALOT Benoît	Biochimie et Biologie Moléculaire
JULIA Annie (Départ le 01/01/2009)	Hématologie
LE GUYADER Alexandre	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
MOUNIER Marcelle	Bactériologie – Virologie – Hygiène Hospitalière
PICARD Nicolas	Pharmacologie Fondamentale
QUELVEN-BERTIN Isabelle	Biophysique et Médecine Nucléaire
TERRO Faraj	Biologie Cellulaire
VERGNE-SALLE Pascale	Thérapeutique
VINCENT François	Physiologie

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

CAIRE François	Physiologie
-----------------------	-------------

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	Anglais
-----------------------	---------

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

BUCHON Daniel	Médecine générale
BUISSON Jean-Gabriel	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

DUMOITIER Nathalie	Médecine Générale
PREVOST Martine	Médecine Générale

A Monsieur le Professeur Jean-Paul ADENIS

Professeur des Universités d'Ophtalmologie
Ophtalmologiste des Hôpitaux
Chef de service

Nous vous remercions de présider ce jury.

Merci de nous avoir accueillie dans votre service et de nous avoir transmis votre passion pour l'ophtalmologie. Votre renommée internationale, vos compétences chirurgicales et votre savoir en ophtalmologie sont pour nous un modèle.

Nous espérons rester digne de la confiance que vous nous faites dans votre service.

Par cette thèse nous renouvelons notre profond respect.

A Madame le Professeur Sophie ALAIN

Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie
Biologiste des hôpitaux

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger et d'encadrer notre travail. Vous nous avez transmis vos connaissances et votre enthousiasme pour la virologie et nous vous en sommes reconnaissante. Votre rigueur a été pour nous un exemple.
Puisse ce travail être à la hauteur de vos espérances.

A Monsieur le Professeur François LABROUSSE

Professeur des Universités en Anatomie Pathologique
Praticien Hospitalier
Chef de service

Notre passage dans votre service aura été une expérience très enrichissante et nous en garderons un excellent souvenir. Nous vous remercions de nous avoir permis de réaliser une partie de notre travail dans votre service.

Soyez assuré de notre gratitude et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Pierre-Yves ROBERT

Professeur des Universités en Ophtalmologie
Ophtalmologiste des Hôpitaux
Praticien Hospitalier

Je te remercie d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail et suis honorée que cette thèse soit la première que tu juges en tant que professeur.
Tes connaissances, ta disponibilité, ton enseignement tant clinique que chirurgical et tes encouragements constants me sont très précieux.
Sois assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame Marie-Claire BACLET

Ingénieur Hospitalier
Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène
CHU Limoges

Je te remercie de m'avoir enseigné avec patience les rudiments et les finesses de la biologie moléculaire. Merci également pour tes formations « word, excel et power point » !!
Je n'aurais pu réaliser ce travail sans ton aide et je t'exprime toute ma reconnaissance.
Merci pour tout ce temps que tu m'as consacré.

A Gaël, pour ton soutien de chaque instant.

A mes parents et mes frères Cédric et Aurélien, merci de croire en moi comme vous le faites.
A Caroline, ma petite sœur, j'aurais aimé que tu puisses être encore là.

A mes beaux-parents et ma belle-sœur Géraldine.

A Karine Durand-Faucher, merci de tes conseils et de ta disponibilité.

Aux infirmières de la coordination des greffes : Martine Allegraud-Brie, Monique Girardot, Annie Mallet et Claude Pihan. Merci d'avoir participé à cette étude.

A Elodie Gay, merci de m'avoir aidée pour les manip'.

A Amélie, merci de m'avoir prise sous ton aile dès mes premiers pas en ophtalmologie et de le faire encore maintenant.

A mes co-internes en ophtalmologie : Laetitia, Amélie, Guillaume, Yohann, Emilie, Juliette et Germain, sans oublier les « visiteurs » : Magalie, Céline, Corinne et Julien et les Toulousains.

A mes co-internes non ophtalmologues : Anne Fred, Vincent, Julien, Angélique et Marianne.

A mes chefs de clinique et mes PH : Thierry, Rémi, Laetitia, Fabien, Amélie, Guillaume ; Vincent et Pierre à Toulouse, et Christine, Hani et Nicolas. Merci.

A mes amis d'ici : Anne Fred, ma coupine ; Mumu, Alex et Thomas ; Amélie, Eric et Ethan ; Hélène et Julien ; Laetitia, Julien et Théo ; Virginie, Eddy et Elisa ; Pierre Sylvain et Sophie ; Angélique et David.

A mes amis de là-bas : Corinne, of course, Aude, Sandrine et Rodrigue, Nathalie et Thierry, Jessica, Anne et Gérald.

Aux services d'ophtalmologie de Limoges, de Brive et de Toulouse Purpan : merci de votre accueil.

Aux services d'anatomopathologie et de virologie de Limoges : merci de m'avoir guidée dans les dédales de vos services et de vos spécialités...

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

I. INTRODUCTION

II. GENERALITES

1. Rappels d'anatomie
2. La greffe de cornée
3. Le prélèvement
4. Généralités sur les Herpesviridae
5. HSV
6. VZV
7. La PCR

III. NOTRE ETUDE

1. Introduction- Buts de l'étude
2. Matériels et méthodes
3. Résultats
4. Discussion

IV. CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

SERMENT D'HIPPOCRATE

ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

CHU : Centre Hospitalier et Universitaire

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert

HSV : Herpès Simplex Virus

PCR : Polymerase Chain Reaction

VZV : Virus de la Varicelle et du Zona

I. INTRODUCTION

Plus de 4000 greffes de cornée sont réalisées chaque année en France. La sécurité de la greffe est assurée par de nombreux moyens : exclusion des donneurs à risque, décontamination du globe oculaire avant prélèvement, conservation des cornées en organoculture avec contrôles bactériologiques et mycologiques. Pour autant, certains risques ne peuvent être supprimés, comme le risque de transmission du donneur au receveur par le virus de l'herpès. Le dépistage d'un donneur contaminé ne peut à ce jour se faire sans entraîner la destruction du greffon. Il a pourtant été établi que la transmission du virus de l'herpès via une greffe de cornée pouvait conduire à un échec primaire de la greffe.

Notre étude a donc pour but d'évaluer la faisabilité d'un dépistage des donneurs en essayant de trouver un moyen d'identifier le virus de l'herpès en périphérie du greffon cornéen, dans la sclère. Dans un but comparatif, nous avons également recherché le virus de la varicelle et du zona.

Notre objectif principal est de savoir si l'on peut retrouver ces virus dans la sclère à l'aide d'une PCR quantitative (*Polymerase Chain Reaction*). L'objectif secondaire étant de déterminer si à partir de cela, un dépistage systématique des donneurs de cornée est envisageable.

II. GENERALITES

1. Rappels d'anatomie :

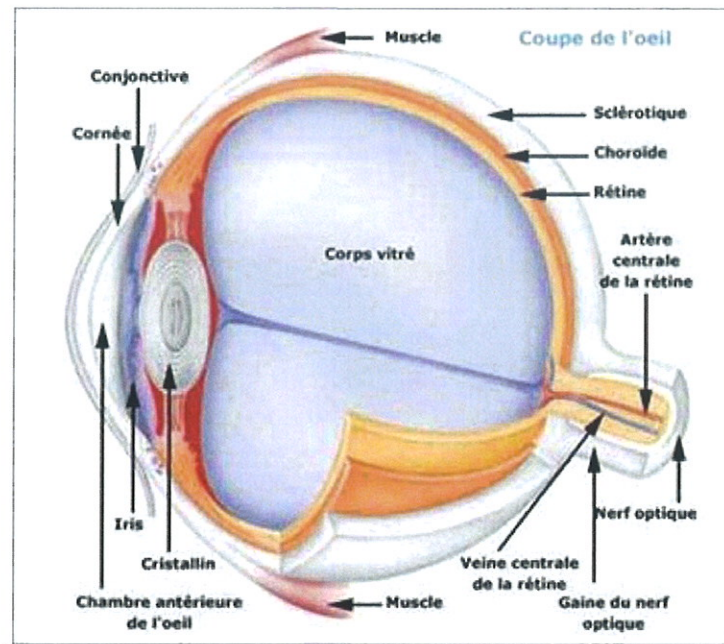


Figure 1 : Vue générale du globe oculaire, coupe sagittale

a. Anatomie de la cornée¹ :

Prolongement antérieur de la tunique externe oculaire représentée par la sclérotique, la cornée assure une fonction de protection des milieux endoculaires d'autant qu'elle constitue une zone d'échange avec le monde extérieur. La cornée participe, avec la conjonctive et la zone de transition limbique, au concept de surface oculaire. En dehors de son rôle protecteur, la cornée a avant tout un rôle réfractif puisqu'elle assure les deux tiers du pouvoir réfractif de l'œil grâce à sa transparence. La cornée est avasculaire.

La cornée est ovoïde, à grand axe horizontal à sa face antérieure, circulaire à sa face postérieure. Son diamètre moyen est de 11,5 mm. L'épaisseur cornéenne est de 1 mm en périphérie et 0,55 mm au centre. Elle représente 7% de la surface du globe oculaire.

La cornée est composée de cinq couches, de l'extérieur vers l'intérieur : l'épithélium cornéen, en relation étroite avec le film lacrymal, la couche de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium.

La cornée est innervée principalement par la branche ophtalmique afférente du ganglion trigéminal par l'intermédiaire des nerfs ciliaires longs pour son innervation sensitive et du ganglion cervical supérieur pour son innervation sympathique. La branche nasociliaire, issue de la branche ophtalmique, se divise en deux ou trois nerfs ciliaires longs qui pénètrent la sclère au niveau du pôle postérieur du globe environ 5 mm en avant du nerf optique et

constituent un riche réseau dans l'espace suprachoroïdien. Durant leur passage dans l'espace suprachoroïdien, se forment des anastomoses entre les axones des nerfs ciliaires longs et des nerfs ciliaires courts. Ces branches vont alors atteindre le limbe cornéoscléral sous la forme de 12 à 16 troncs nerveux qui vont pénétrer le stroma cornéen. Des branches récurrentes vont innervier la conjonctive péri limbique et l'épithélium cornéen limbique. Il existe également d'autres rameaux provenant de la même origine mais en nombre plus restreint qui pénètrent dans la cornée plus superficiellement juste sous l'épithélium, et sont destinés à l'innervation périphérique épithéliale. Parmi toutes ces fibres nerveuses intra cornéennes, seule une minorité possède une gaine myélinique qui disparaît complètement à 2 ou 3 mm du limbe. Initialement groupées en faisceaux, ces fibres en cours de progression vers le centre se séparent et se divisent selon un mode dichotomique. Toutes ces fibres collatérales horizontales et verticales constituent le plexus nerveux sous-épithélial. L'épithélium reçoit une riche innervation sous la forme de branches terminales issues du plexus sous-épithélial stromal antérieur qui se ramifient en branches horizontales dites en brides et en réseau dense de branches verticales se dirigeant perpendiculairement vers la surface cornéenne. Ces fibres perdent leurs cellules de Schwann dès leur passage dans l'épithélium et s'insinuent entre les cellules épithéliales, se distribuent à toutes les couches cellulaires épithéliales et se terminent sous forme de terminaisons libres, renflées. Ces terminaisons nerveuses prédominent au niveau de l'assise cellulaire intermédiaire mais sont également retrouvées en nombre plus restreint au niveau des assises basales et superficielles. Le méridien horizontal possède davantage de terminaisons que le méridien vertical et l'hémi cornée temporale plus que la partie nasale. Le champ récepteur de ces fibres est étendu avec une intrication avec les territoires avoisinants.

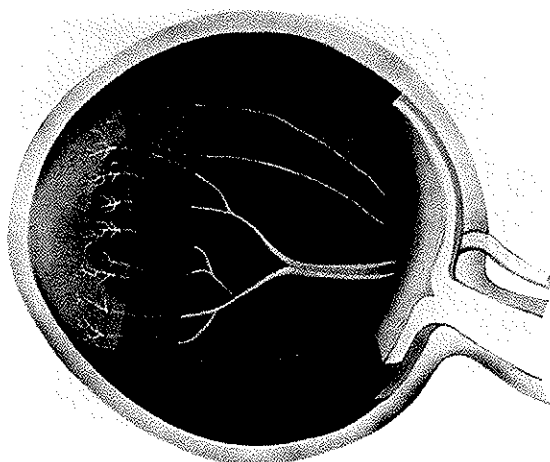


Figure 2 : Schématisation de l'innervation du globe par les nerfs ciliaires longs².

b. Anatomie de la sclère³ :

La sclère est la tunique la plus externe du globe oculaire, très solide et très résistante, elle est formée de collagène et de fibres élastiques. Elle entoure les quatre cinquièmes du globe oculaire dont elle assure la protection. Elle se continue en avant par la cornée. Fibreuse et inextensible, elle permet de maintenir le volume, la forme et le tonus du globe. Elle donne insertion aux muscles oculomoteurs.

La sclère est de couleur blanc nacré, plus bleuâtre à la naissance car mince et translucide, elle prend une couleur plus jaunâtre chez la personne âgée par calcification et hyalinisation. Son diamètre est de 23 à 24 mm. Son épaisseur est variable selon la localisation : 0,6 à 0,8 mm au limbe, 0,5 mm à l'équateur, 0,3 mm en arrière de l'insertion des tendons des muscles oculomoteurs et 0,1 mm au voisinage du nerf optique. Elle est en moyenne plus mince chez l'enfant et en cas de myopie. La totalité de la sclère pèse 1,2 g.

La face externe de la sclère est recouverte par la conjonctive bulbaire, puis la capsule de Tenon et enfin l'épiscière. C'est sur cette face externe que s'insèrent les muscles oculomoteurs : les quatre muscles droits et les deux muscles obliques.

La face interne de la sclère entre en rapport avec la couche la plus externe de la choroïde.

La sclère rejoint la cornée au niveau de la jonction cornéosclérale ou foramen antérieur scléral qui constitue le limbe cornéoscléral. Le limbe correspond à la zone de transition entre la cornée et la sclère.

Le bord postérieur de la sclérotique limite l'orifice de sortie du nerf optique.

La sclère est pauvre en vaisseaux mais permet le passage des éléments vasculo-nerveux à destination des structures intraoculaires. Elle permet la traversée des artères et des veines ciliaires antérieures en avant, des quatre veines vortiqueuses à l'équateur et des vaisseaux et nerfs ciliaires courts au pôle postérieur. Au niveau postérieur, les vaisseaux et nerfs ciliaires postérieurs perforent la sclère au niveau de l'area cribrosa en un plexus qui comprend : les artères ciliaires postérieures, les artères ciliaires longues postérieures et les nerfs ciliaires postérieurs courts et longs nerfs qui donnent naissance aux rameaux innervant la cornée.

D'un point de vue histologique, la cornée est essentiellement constituée de fibrilles de collagène et de fibres élastiques. La sclère est donc un tissu pauvre en cellules, on y trouve principalement des fibroblastes et des fibrocytes qui sont des cellules conjonctives, ainsi que des chromatophores ou mélanocytes (cellules pigmentaires) surtout retrouvées autour des orifices de pénétration vasculaire. Le collagène, protéine fibreuse de la matrice extracellulaire,

représente 75% du poids sec de la sclère. Les fibres élastiques constituent moins de 25% du poids sec de la sclère.

La sclère est un tissu peu vascularisé, elle est nourrie par imbibition à partir des couches voisines.

L'innervation est assurée par les nerfs ciliaires courts, après leur pénétration dans la sclère, pendant leur trajet dans l'espace suprachoroïdien. A leur terminaison, les nerfs ciliaires courts forment un riche plexus à la face externe du corps ciliaire. De ce plexus naissent des rameaux récurrents destinés à l'orbiculus ciliaris, des rameaux internes destinés à l'iris et au corps ciliaire et des rameaux externes destinés à la cornée.

2. La greffe de cornée⁴ :

La greffe de cornée ou kératoplastie, consiste à remplacer un disque cornéen central soit de pleine épaisseur (kératoplastie transfixiante), soit d'une partie de son épaisseur seulement (kératoplastie lamellaire).

a. Quelques chiffres :

En 2007, selon les données de l'agence de la biomédecine, 8 303 cornées ont été réceptionnées par les banques et 4 252 ont été greffées, ce qui correspond à environ 52% de cornées greffées. Les besoins de la population sont estimés à environ 6 000 greffes par an ce qui explique l'existence de listes d'attente. La greffe de cornée est pourtant une intervention relativement simple, peu coûteuse comparée aux transplantations d'organes et dont le prélèvement peut se faire sur donneur décédé. En effet, la greffe de cornée fait partie des greffes de tissus. Les résultats en terme de survie du greffon sont bons mais variables en fonction des indications.

b. Indications :

Les indications de greffe sont nombreuses. Les principales sont représentées par les kératopathies bulleuses, décompensations endothéliales secondaires à une chirurgie du segment antérieur, le plus souvent la cataracte ; le kératocône, pathologie structurale de la cornée ; les dystrophies endothéliales primitives largement représentées par la dystrophie endothéliale de Fuchs ; les séquelles de kératites et les séquelles de traumatisme. D'autres indications sont plus rares et représentées dans le tableau 1 selon les données de l'agence de la Biomédecine.

Indication	2004	2005	2006	2007	2008	
Kératocône	1 094	1 002	908	881	855	
%	23,0 %	21,8 %	20,5 %	21,2 %	19,8 %	
Décompensation endothéliale primitive						
Dystrophie de Fuchs	447	405	434	437	518	
%	9,4 %	8,8 %	9,8 %	10,5 %	12,0 %	
Autres dystrophies	72	74	61	60	53	
%	1,5 %	1,6 %	1,4 %	1,4 %	1,2 %	
Décompensation endothéliale secondaire						
Pseudophaque	1 100	1 034	954	866	939	
%	23,1 %	22,5 %	21,5 %	20,9 %	21,7 %	
Aphaque	111	91	109	93	114	
%	2,3 %	2,0 %	2,5 %	2,2 %	2,6 %	
Chirurgie réfractive	9	7	7	9	9	
%	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%	
Suite à une chirurgie du	131	119	108	135	106	
%	2,7 %	2,6 %	2,4 %	3,3 %	2,5 %	
Séquelle de kératite						
Infections virales	196	196	227	177	171	
%	4,1 %	4,3 %	5,1 %	4,3 %	4,0 %	
Infections bactériennes	145	96	134	109	117	
%	3,0 %	2,1 %	3,0 %	2,6 %	2,7 %	
Autres infections	21	33	49	34	41	
%	0,4 %	0,7 %	1,1 %	0,8 %	0,9 %	
Inflammatoire	35	36	40	24	22	
%	0,7 %	0,8 %	0,9 %	0,6 %	0,5 %	
Autres étiologies	172	139	129	126	121	
%	3,6 %	3,0 %	2,9 %	3,0 %	2,8 %	
Dystrophie stromale	168	187	141	125	135	
%	3,5 %	4,1 %	3,2 %	3,0 %	3,1 %	
Séquelle de traumatisme						
Chimique	47	35	41	23	31	
%	1,0 %	0,8 %	0,9 %	0,6 %	0,7 %	
Autres origines	142	187	141	143	130	
%	3,0 %	4,1 %	3,2 %	3,4 %	3,0 %	
Autres						
Anomalies congénitales		61	67	60	54	50
%		1,3 %	1,5 %	1,4 %	1,3 %	1,2 %
Tumeurs		6	2	5	11	6

Tableau 1 : Evolution des indications de greffe de cornée.

c. Technique opératoire :

Le chirurgien est tenu, avant l'intervention, de vérifier la fiche du greffon, l'identification de celui-ci et doit également s'assurer que tous les contrôles sur le donneur et sur le greffon ont bien été effectués. Le chirurgien contrôle macroscopiquement le greffon.

L'intervention se déroule sous anesthésie générale la plupart du temps mais peut aussi se réaliser sous anesthésie locorégionale. La préparation du patient est assurée comme pour tout bloc opératoire avec désinfection cutanée et des culs de sac conjonctivaux à la povidone iodée à 5% et mise en place de champs stériles. On commence par la trépanation sur chambre antérieure artificielle dont la technique diffère selon le type de kératoplastie réalisée (transfixiante, lamellaire antérieure, endothéliale). Dans un deuxième temps, on réalise, sur le patient, la trépanation de la cornée pathologique. Enfin, le greffon cornéen est suturé sur l'œil du receveur. Il est possible de réaliser des interventions combinées avec chirurgie de la cataracte ou du glaucome associés.

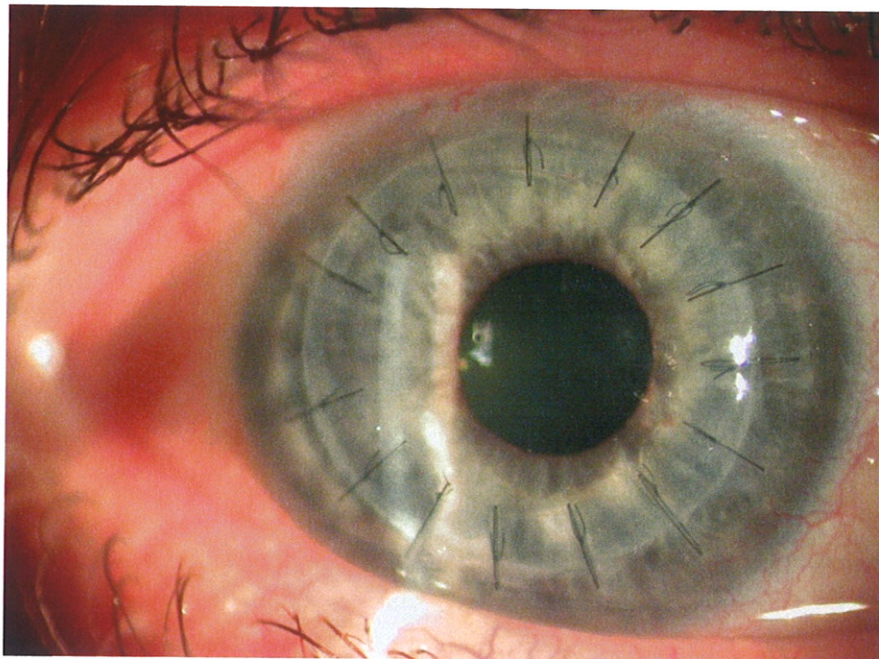


Figure 3 : Kératoplastie

d. Traitement postopératoire :

Le traitement postopératoire consiste en une corticothérapie topique pendant plusieurs mois. Un collyre à la ciclosporine est parfois associé chez les patients à haut risque de rejet. Il n'y a pas de traitement général en première intention, un traitement antiherpétique est prescrit chez les patients aux antécédents de kératite herpétique. Les corticoïdes par voie générale sont utilisés lors des rejets de greffe.

e. Complications :

La complication peropératoire la plus grave reste l'hémorragie expulsive. Elle survient entre 0,5% et 2%^{4,5}. Son pronostic est catastrophique. Les autres complications que l'on peut rencontrer en cours d'intervention sont une plaie de l'iris ou du cristallin lors de la trépanation, celles-ci seront corrigées si besoin par une suture de l'iris ou une extraction du cristallin avec mise en place d'un implant de chambre postérieure dans le sac capsulaire. On peut aussi observer une issue de vitré surtout chez les patients aphakes ou pseudophakes pour laquelle on réalisera une vitrectomie.

Les complications postopératoires sont avant tout représentées par le rejet de greffe. Le rejet primaire ou échec primaire, qui se traduit par une absence d'éclaircissement de la cornée après la greffe, surviendrait dans 0 à 10% des cas selon les études^{6,7}. Les causes principales sont une mauvaise qualité endothéliale du greffon et les infections herpétiques. Il est pourtant aujourd'hui encore difficile de déterminer si l'infection herpétique est due à une réactivation chez le receveur, à une transmission via le donneur⁷⁻¹¹ ou à une infection de novo.

Les rejets d'allogreffe de cornée sont la principale cause d'échec des kératoplasties. On distingue quatre formes cliniques de rejet : épithélial, sous-épithélial, stromal et endothélial. Ces formes peuvent être isolées ou associées.

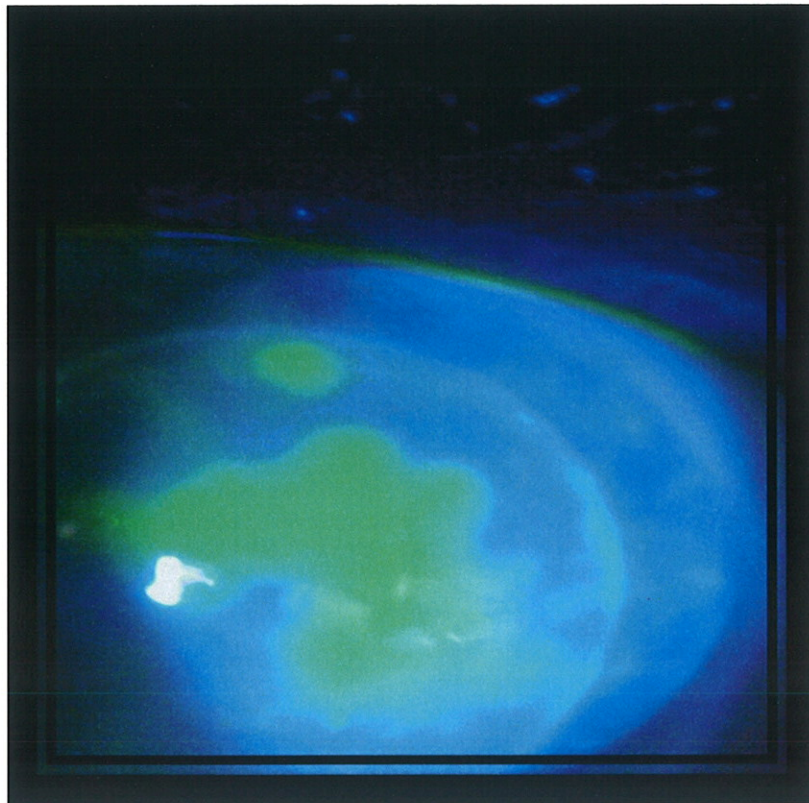


Figure 4 : récurrence d'un herpès sur une greffe de cornée.

3. Le prélèvement de cornée ¹² :

a. Cadre législatif des dons de cornées :

Le don de tissus et donc de la cornée est réalisé sur des personnes décédées de mort encéphalique avec conservation des fonctions hémodynamiques par assistance cardio ventilatoire ou non.

L'infirmière coordinatrice du don d'organes et de tissus est chargée de recueillir les antécédents du patient, de vérifier que le patient ne figure pas sur le Registre National des Refus (RNR) et de s'informer auprès des proches du patient des souhaits du défunt en ce qui concerne les dons.

Le prélèvement doit être réalisé dans les 48 heures suivant le décès si le corps de la personne décédée a été réfrigéré dans les 4 heures suivant le décès ; dans les 12 heures suivant le décès si la réfrigération du corps a été faite après 4 heures.

b. Sélection des donneurs :

La sélection clinique du donneur est sous la responsabilité du médecin.

Il n'y a pas d'âge limite au don de cornée.

Des contre indications existent : affection neurologique potentiellement transmissible (rage, maladie de Creutzfeld Jacob, traitement par hormones de croissance d'origine humaine, intervention chirurgicale comportant l'utilisation de dure-mère d'origine humaine, intervention neurochirurgicale non documentée sur ce point, sclérose en plaque, sclérose latérale amyotrophique, maladie d'Alzheimer et autres démences, encéphalite sclérosante subaiguë, rubéole congénitale, syndrome de Reye et encéphalite virale ou d'origine inconnue), patient porteur d'une maladie virale transmissible (VIH, Hépatites B et C), pathologies actives oculaires (cancer, infection), antécédents connus de maladies oculaires transmissibles comme l'herpès ou le zona.

Des sérologies sont réalisées sur le sang du patient donneur : HIV1 et 2, HTLV1 et 2 (virus du lymphome humain T), hépatites B et C et syphilis. Si une de ces sérologies revient positive ou douteuse, la greffe est interdite et le greffon détruit.

c. Prélèvement du greffon :

Le greffon cornéen est réalisé dans des conditions d'asepsie rigoureuses : désinfection du site de prélèvement par de la Bétadine à 5% (polyvidone iodée), mise en place d'un champ opératoire stérile, utilisation de gants stériles par le médecin préleveur, utilisation de matériel stérile à usage unique ou restérilisable.

Le prélèvement est généralement réalisé par excision *in situ*, c'est la technique que nous utilisons au CHU de Limoges, la cornée est découpée avec une collerette sclérale de 2 à 3 mm soit par trépanation, soit par incision au bistouri et découpage aux ciseaux. Le médecin préleveur s'attache à ne pas effondrer la chambre antérieure lors de la trépanation afin de ne pas léser l'endothélium. La cornée est directement placée dans son milieu de transport.

Après une hémostase soignée, la restauration du globe oculaire est réalisée avec mise en place, soit d'un conformateur, soit d'une prothèse. Les paupières sont maintenues fermées en s'aidant plus ou moins de colle cyanoacrylate ou de la réalisation d'une suture à nœuds enfouis.

Le prélèvement peut également être réalisé par énucléation. Les mêmes règles d'asepsie sont mises en œuvre et le prélèvement relève d'une technique d'enucléation standard. C'est le globe entier qui est placé dans le milieu de transport. La restauration tégumentaire est soignée après vérification de l'hémostase. Cette technique n'est pas utilisée en France.

Le prélèvement du greffon cornéen s'accompagne d'une ponction de sang réalisée par voie sous-clavière ou intracardiaque afin de réaliser les sérologies de dépistage (VIH 1 et 2, HTLV 1 et 2, hépatites B et C et syphilis).

d. Transport et préparation des greffons cornéens en vue d'une conservation :

Ces différents aspects sont assurés par les banques de cornées autorisées qui prennent en charge la conservation, le contrôle de la qualité et de la stérilité, et gèrent la réalisation des contrôles biologiques du donneur.

- Transport des prélèvements vers la banque de cornée : lors des prélèvements par excision *in situ*, la cornée est placée dans un milieu de transport à +4°C et transporté dans un sac réfrigéré à +4°C ou dans un flacon d'organoculture et transporté à température ambiante. Pour les prélèvements par énucléation, le globe est transporté dans une chambre humide réfrigérée, cornée dirigée vers le haut. Les prélèvements et les tubes de sang sont correctement étiquetés et accompagnés de la fiche de prélèvement remplie par le médecin.

- Préparation des greffons prélevés par excision *in situ* en vue de la conservation : la préparation du greffon se fait dans une salle propre (salle blanche) sous une hotte à flux laminaire. De manière stérile, un fil de suture est passé dans le bouchon du flacon de conservation ainsi que dans la collerette sclérale du greffon. Le greffon est placé dans le flacon de conservation préalablement rempli du milieu de conservation, puis le flacon est rebouché hermétiquement. Celui-ci est ensuite placé dans la zone de conservation (en étuve à +31°C pour les conservations en organoculture, réfrigérateur à +4°C pour les conservations en hypothermie).

- Préparation des greffons prélevés par énucléation : le globe oculaire après décès du donneur est un prélèvement hautement contaminé. Les globes oculaires, après rinçage à l'eau courante filtrée, subissent un bain à la polyvidone iodée à 1% pendant deux minutes suivi d'un bain dans le thiosulfate pendant 30 secondes puis d'un rinçage dans du sérum physiologique. Les cornées sont ensuite disséquées au couteau à 45° avec une collerette sclérale de 2 à 3 mm. Toutes ces manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire.

- Contrôle de la qualité du greffon : pour les greffons prélevés par énucléation, la qualité de la transparence cornéenne est effectuée à la lampe à fente. Pour les greffons prélevés par excision *in situ*, la qualité du greffon est estimée macroscopiquement, à la recherche de taies cornéennes par exemple.

Le contrôle de qualité endothéliale est réalisé sur la cornée disséquée à l'aide d'une coloration vitale au bleu trypan pendant 1 minute puis d'une dilatation des espaces intercellulaires par un bain de sérum physiologique pendant 4 minutes. La cornée est examinée au microscope optique dans une boîte de Pétri stérile. Le bleu trypan colore en bleu le noyau des cellules mortes. La densité cellulaire endothéliale est calculée à l'aide d'une grille calibrée placée dans un des objectifs du microscope et d'un système d'analyse d'image. D'autres techniques peuvent être utilisées pour le contrôle endothélial : microscopie spéculaire, dilatation des espaces intercellulaires par une solution de sucrose 1,8 %.

Les critères de qualité requis pour accepter une cornée en vue d'une greffe sont ceux décrits par Peels^{13, 14} : densité supérieure à 2 000 cellules/mm², mosaïque cellulaire continue, absence de cellules mortes après conservation, perte cellulaire au cours de la conservation inférieure à 20 %, polymorphisme modéré. Il faut y ajouter l'absence de gouttes groupées ou nombreuses et un coefficient de variation de la surface cellulaire endothéliale normal ou modérément augmenté. La densité endothéliale et le coefficient de variation de la surface cellulaire endothéliale en fin de conservation ont une influence sur l'évolution de la greffe à long terme.

e. Méthodes de conservation du greffon :

Différentes méthodes de conservation du greffon cornéen sont utilisées : conservation du globe entier en chambre humide à +4°C, conservation du greffon en milieu liquide à +4°C et conservation du greffon cornéen en organoculture à +31°C.

La conservation du globe entier au réfrigérateur ne permet une conservation du globe et donc de la cornée pendant 24 à 48 heures et n'est plus réalisée en France.

La cornée peut être préservée à court terme en milieu liquide à +4°C. Le milieu utilisé permet de maintenir une activité métabolique minimum qui permet la survie cellulaire. Il contient des substances nutritives, des substances osmotiques visant à diminuer l'œdème, un tampon, des antioxydants, des antibiotiques. La durée de conservation théorique est de 12 à 14 jours mais après 6 à 7 jours, la qualité du greffon diminue grandement avec altérations cellulaires importantes. La stérilité du greffon est obtenue dans moins de 85% des cas¹⁴.

La conservation à moyen terme en organoculture à +31°C est celle qui permet une durée de conservation la plus importante tout en préservant l'endothélium cornéen le plus longtemps possible. Elle permet de stimuler l'activité métabolique des cellules. La cornée est placée en suspension à l'aide d'un fil passé dans la collerette sclérale puis dans le bouchon du flacon qui contient 50 à 100 ml de milieu et est hermétiquement clos. Plusieurs contrôles sont effectués : la cornée et le milieu sont observés quotidiennement et la cornée est éliminée si le milieu devient trouble ou change de couleur et des prélèvements microbiologiques sont effectués. Si ceux-ci s'avèrent positifs, la cornée est également éliminée. Les milieux contiennent un milieu nutritif, du sérum de veau fœtal, des tampons, des antibiotiques, des antifongiques, des antioxydants et un indicateur de pH coloré. Les milieux sont renouvelés tous les 10 à 14 jours. La conservation théorique est de 4 à 5 semaines mais il est souhaitable d'utiliser le greffon le plus rapidement possible. La cornée n'est toutefois pas délivrée avant deux semaines de conservations, période de quarantaine qui permet de réduire le risque microbiologique dû à la greffe. C'est avec cette technique de conservation que le risque infectieux est le plus faible. La stérilité du greffon est obtenue dans plus de 95% des cas^{5, 14}. Avant la greffe, il est nécessaire de réaliser une phase de déturgescence de 24 à 48 heures dans le même milieu additionné d'un agent osmotique afin de réduire l'œdème stromal induit par la conservation.

Il existe également une technique de conservation du greffon cornéen à long terme par cryoconservation et vitrification. Cette technique est peu utilisée. La cornée est placée dans une solution contenant un cryoprotecteur puis congelée dans l'azote liquide à -196°C. La descente en température se fait progressivement. Cette technique permet de conserver des

greffons sur un très longue durée mais engendre des pertes cellulaires importantes et cette technique ne peut être retenue que pour permettre d'avoir toujours à disposition des greffons utilisables en urgence pour des indications architecturales. Elle n'est réalisée en pratique que dans de rares centres.

f. Contrôle de stérilité du greffon :

Pour les cornées conservées en organoculture, des cultures sont réalisées tout au long de la conservation du greffon et le milieu de conservation est examiné macroscopiquement chaque jour. Pour les greffons conservés à +4°C, la durée de conservation est trop courte pour permettre ces contrôles.

g. Cession du greffon en vue de la greffe :

Seules les banques de cornées sont habilitées à conserver et délivrer les cornées. Une cornée pourra être donnée en vue d'une greffe en l'absence de contre indication chez le donneur, après vérification de ces sérologies et en ayant subi les tests de stérilité. Pour un greffe lamellaire antérieure, on ne s'attardera pas sur les critères de qualité de l'endothélium, ils sont par contre très importants pour une greffe transfixiante ou lamellaire postérieure. Le greffon est adressé au chirurgien accompagné d'une fiche suiveuse qui doit être remplie par le médecin greffeur et retournée à la banque de cornée afin de permettre une traçabilité du greffon. Le médecin greffeur est tenu de vérifier les informations consignées sur cette fiche afin de vérifier l'absence de contre indication à la greffe.

4. Généralités sur les *Herpesviridae*¹⁵ :

La famille des *Herpesviridae* compte plus de cent espèces réparties chez les vertébrés et les invertébrés. Ces virus ont une étroite communauté de structure, portant sur quatre éléments : un génome à ADN double brin, linéaire ; une capsidie icosaédrique d'environ 100 nm de diamètre, à 162 capsomères ; une enveloppe dérivée de la membrane nucléaire et portant des glycoprotéines virales de surface ; le tégument, structure protéique fibrillaire entre enveloppe et capsidie.

On distingue trois sous familles : les *alpha*-, *beta*- et *gammaherpesvirinae*. Neuf de ces virus sont pathogènes pour l'homme. Dans la sous famille des *alphaherpesvirinae*, les virus herpes simplex 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) et le virus varicelle-zona (VZV) caractérisés par leur latence dans les ganglions sensitifs ; dans la sous famille des *betaherpesvirinae* on trouve le Cytomégalovirus (CMV) et le Roseolovirus ou HHV-6 (herpes humain virus) avec latence

dans le sang, les tissus lymphoïdes et réticuloendothélial, les glandes sécrétoires et le rein ; enfin dans la sous famille des *gammaherpesvirinae*, les genres Lymphocryptovirus (EBV) et Rhadinovirus (HHV-8) avec une latence dans les lymphocytes et certaines cellules épithéliales et endothéliales.

a. Réplication des *Herpesviridae* :

Après attachement de l'enveloppe par des glycoprotéines virales sur des récepteurs, présents à la surface de la cellule cible sur la membrane cytoplasmique, et fusion-lyse de l'enveloppe virale avec la membrane cytoplasmique, la nucléocapside ainsi libérée traverse le cytoplasme et entre par un pore de la membrane nucléaire dans le noyau. L'ARN polymérase II transcrit l'ADN viral en trois étapes régulées : des protéines du tégument induisent l'expression de gènes très précoces α ou IE (*Immediate Early*) dont les protéines ainsi synthétisées induisent l'expression des gènes précoces β ou E (*Early*) qui codent pour des protéines principalement utilisées pour la réplication du génome viral notamment l'ADN polymérase virale, cible actuelle des antiviraux utilisés contre les *Herpesviridae*. La réplication se fait par circularisation grâce aux séquences répétées terminales. Enfin, l'expression des gènes tardifs, γ ou L (*Late*) induit surtout la synthèse des protéines structurales du virus. La réplication et l'encapsidation se font dans le noyau. L'enveloppe est formée par un processus complexe qui inclut le bourgeonnement de la lamelle interne de la membrane nucléaire et/ou la membrane d'une vésicule intra cytoplasmique, avec insertion de glycoprotéines virales.

De par sa nature lipidique d'origine cellulaire, l'enveloppe virale en fait un virus fragile, sensible aux détergents, aux désinfectants et aux solvants des lipides, aux pH extrêmes, à la chaleur et à la dessiccation.

b. Latence :

Après la primo-infection, le virus est capable de rester à l'état latent dans l'organisme. Des réactivations de l'infection sont capables de réaliser des réinfections endogènes qui donnent des excrétions intermittentes du virus, symptomatiques ou non.

Lors de la latence, le génome n'est pas intégré au génome cellulaire mais présent dans le noyau, généralement sous forme d'épisome. L'expression du génome viral est limitée à quelques gènes de latence. L'ADN viral ne se répliquant pas, l'infection latente échappe aux antiviraux qui sont des inhibiteurs de l'ADN polymérase virale.

c. Expression clinique des infections à *Herpesviridae* :

Elle est variable en fonction du virus, mais aussi du stade de l'infection : la primo-infection comporte généralement une réplication virale plus intense et une expression clinique plus riche que les réinfections qui sont souvent asymptomatiques. L'âge du patient est également déterminant ainsi que l'état de ses défenses immunitaires ; les plus jeunes et les personnes immunodéprimées sont plus sévèrement atteints que les adultes immunocompétents, sauf exceptions.

d. Equilibre hôte-virus :

Malgré une fragilité importante du virus notamment de part la nature lipidique de son enveloppe, celui-ci, grâce à des ajustements développés par le virus lui-même, résiste à nos systèmes de défenses innés ou acquis pour cohabiter chez son hôte.

La réplication des génomes viraux à ADN par l'ADN polymérase est d'une grande précision, contrairement à la réplication des virus à ARN.

Les *Herpesviridae* se camouflent passivement, grâce à leurs gènes de latence. Par exemple, les LAT (pour *Latency Transcripts*) des HSV-1 et -2 bloquent dans les neurones l'expression des autres gènes IE.

De plus, les *Herpesviridae* contrecarrent activement le système immunitaire à différents niveaux, grâce à la synthèse de protéines ayant une action sur l'environnement cellulaire hostile : inhibition de la virolyse par le complément, de la phagocytose, de la présentation des antigènes par le CMH-1, de la cytolyse par les CTL CD8+, de la cytolyse par les cellules NK et de l'apoptose.

L'équilibre entre réplication virale et défenses antivirales, permettent à l'hôte et au virus d'échapper à la destruction mutuelle qui, en terme d'évolution, n'est pas une option viable.

5. HSV¹⁶⁻¹⁸ :

Les deux Herpes simplex virus, de type 1 (HSV-1) et de type 2 (HSV-2) font partie de la famille des *Herpesviridae* tout comme le cytomégalovirus, le virus d'Epstein Barr et les herpes virus humains de type 6,7 et 8.

HSV-1 et HSV-2 appartiennent à la sous famille des *alphaherpesvirinae*, genre simplex caractérisés par leur cycle de réplication court, leur capacité à détruire les cellules infectées (effet cytopathogène rapide et franc) et leur état de latence dans les ganglions sensitifs, avec possibilité de réactivation endogène. Ils sont strictement humains dans les conditions

naturelles mais expérimentalement, ils ont un large spectre d'hôtes et de nombreux modèles animaux expérimentaux sont utilisés.

a. Structure :

Chaque virion mesure 120 à 200 nm et est constitué de quatre éléments.

Le génome est constitué d'un ADN double brin d'environ 152 kpb codant pour 84 protéines. Il comporte deux segments long et court reliés par une liaison covalente. Chaque segment comporte une séquence unique et des séquences répétitives inversées. L'orientation des différents segments est variable. Quatre populations de molécules existent donc pour un même virus. Les deux brins d'ADN s'enroulent autour d'une protéine basique pour constituer le core. Entre les virus de type 1 et 2, il existe une homologie de séquence nucléotidique d'environ 50%.

La capsid, qui correspond à l'enveloppe du noyau, est icosaédrique, à 162 capsomères, avec un penton par sommet et 150 hexons.

L'enveloppe virale est d'origine mixte, bicouche lipidique dérivée par bourgeonnement de la lamelle interne de la membrane nucléaire et des membranes cytosoliques de la cellule infectée. À la surface, on trouve, sous forme de spicules, des glycoprotéines virales et des protéines non glycosylées.

Enfin, entre la capsid et l'enveloppe, se trouve le tégument de structure fibrillaire, composé d'une douzaine de protéines.

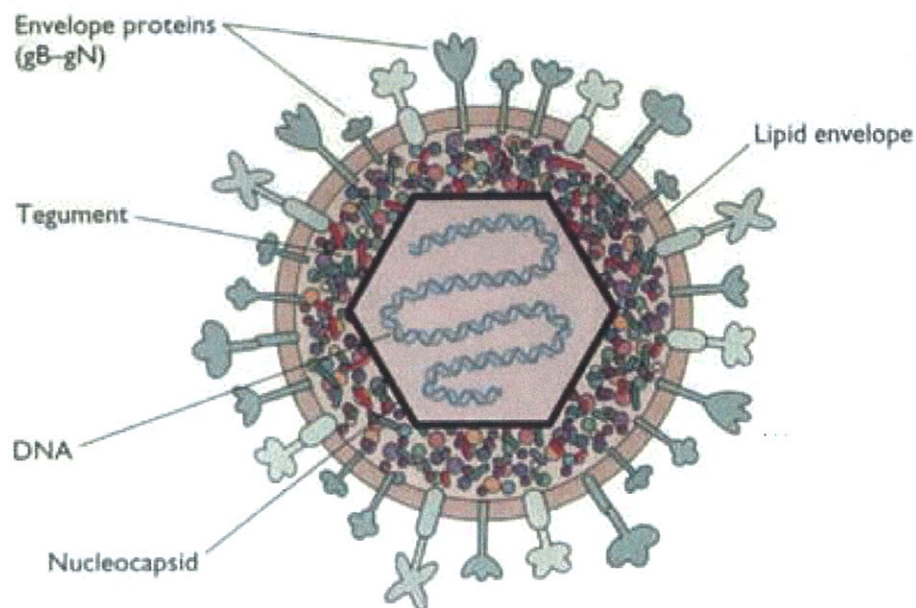


Figure 5 : Schématisation du virus HSV

b. Multiplication du virus :

L'attachement du virus à la cellule hôte fait intervenir les glycoprotéines d'enveloppe. La fusion nécessite d'autres glycoprotéines. Lors de celle-ci, nucléocapside et protéines tégmentaires sont libérées dans le cytoplasme. La protéine VHS dégrade les ARN messagers cellulaires, stoppant ainsi les synthèses protéiques de la cellule infectée. Les protéines VP16 ou α -TIF migre dans le noyau. La nucléocapside est transportée par le cytosquelette jusqu'à un pore de la membrane nucléaire où elle délivre l'ADN viral au noyau.

L'ADN viral se circularise et est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire. Transcription et traduction se font en trois phases successives : α , β et γ régulées en cascade. La transcription des gènes α ou très précoces (IE pour *Immediate Early*) est induite par l' α -TIF tégmentaire du virion et les protéines α produites ont surtout un rôle pour la suite des synthèses virales. Elles induisent l'expression des gènes β ou précoces (E pour *Early*) qui produisent des enzymes virales impliquées dans la synthèse de l'ADN viral. Au maximum de leur production, à 6 heures d'infection, se réalise la synthèse de l'ADN viral. L'expression des gènes γ ou tardifs (L pour *Late*), induite par les protéines β , aboutit à la production de protéines structurales de la nucléocapside et glycoprotéines d'enveloppe.

Les capsides s'auto-assemblent dans le noyau et s'y accumulent, elles sont ensuite enveloppées par bourgeonnement à travers la membrane interne. La sortie des virions hors de la cellule se fait par exocytose.

Sur les 87 gènes du virus, 37 servent directement à la réplication du virus. Les autres sont utiles au virus pour modifier, en sa faveur, un environnement cellulaire hostile. Les fonctions de ces protéines d'adaptation ne sont pas toutes entièrement connues.

c. Infection latente :

Elle constitue un moyen très efficace pour le virus d'échapper aux défenses immunitaires ainsi qu'aux antiviraux.

Au niveau des sites de primo-infection, le virus envahit les terminaisons nerveuses et gagne, par voie centripète le corps cellulaire du neurone sensitif où il persiste à vie sous forme d'ADN épisomal.

Lors des réactivations de cette infection latente dans le ganglion sensitif, le virus regagne par voie neuronale centrifuge la périphérie où il donne, sur le site de la primo-infection, une réinfection endogène symptomatique (récurrence) ou asymptomatique (simple excrétion salivaire ou génitale du virus). Durant l'infection latente, il n'y a ni réplication ni expression

de protéines virales, mais transcription d'ARN viraux particuliers : les LATs (pour *Latency Associated Transcripts*).

d. Epidémiologie :

Ces virus enveloppés sont de transmission interhumaine par contacts interpersonnels rapprochés, intimes. La prévalence d'anticorps spécifiques, et donc d'infection latente, varie en fonction de l'âge, des mœurs, du pays et du type d'HSV.

Pour HSV-1, l'infection survient plus tôt chez les populations pauvres et la prévalence à l'âge adulte varie de 70 à 80%, voire 95% selon les pays. Elle serait un peu moindre dans les populations aisées avec un taux de 40 à 60% à l'âge adulte.

Pour HSV-2, la prévalence est celle d'une maladie sexuellement transmissible et très variable : de nulle pour les couples exclusifs à 90% en cas de multi partenariat.

e. Pouvoir pathogène^{18, 19} :

Les manifestations cliniques de l'infection herpétique sont très variables. On note l'infection herpétique orale, l'herpès génital, l'herpès néonatal, l'encéphalite herpétique, l'infection herpétique survenant chez les personnes immunodéprimées et enfin l'herpès oculaire que nous allons détailler.

Les manifestations ophtalmologiques de l'infection herpétique sont multiples et dues dans la majorité des cas à HSV-1, même si des cas de kératites herpétiques à HSV-2 ont été décrits.

Les kératites herpétiques sont le plus souvent unilatérales. Elles s'accompagnent de symptômes d'irritation cornéenne (douleur, photophobie, larmoiement, blépharospasme) et comportent une baisse de vision de profondeur variable. Toutes les couches de la cornée peuvent être atteintes.

Les kératites épithéliales peuvent résulter de deux mécanismes : soit par réactivation virale, soit par atteinte de l'innervation cornéenne. Dans le premier cas, l'atteinte la plus typique et la plus fréquente (72%) est la kératite dendritique, l'ulcère géographique est également fréquent. Toutefois elle peut avoir des aspects plus trompeurs comme : un ulcère marginal, des vésicules cornéennes, une kératite ponctuée superficielle diffuse et lâche, des lésions épithéliales étoilées ou encore des petites bulles intra épithéliales. Chez un patient opéré de greffe de cornée ou de chirurgie réfractive, l'atteinte herpétique peut se manifester par un ulcère épithélial chronique. Dans le cas d'une atteinte par lésion de l'innervation cornéenne, la kératite peut être neurotrophique avec une atteinte à la fois épithéliale et stromale.

Les kératites stromales sont présentes dans 20 à 48% des herpès cornéens, plus ou moins concomitantes d'une atteinte épithéliale. Lors des atteintes immunitaires avec réplication virale, on observe une kératite nécrosante ou infiltrante au pronostic fonctionnel réservé. Lors des atteintes immunitaires sans réplication virale, la kératite peut être interstitielle ou disciforme ; des infiltrats sous épithéliaux peuvent aussi se rencontrer.

Enfin, l'endothélium cornéen peut également être atteint d'endothélite localisée, diffuse ou linéaire. Ces endothélites s'accompagnent de précipités rétro cornéens et parfois d'une réaction inflammatoire en chambre antérieure.

Chez les patients opérés de kératoplastie, l'infection herpétique peut être due soit à une primo-infection, soit à une réactivation d'un virus latent chez le receveur, ou encore à une transmission du donneur au receveur^{8, 9, 11, 20}.

En dehors de la cornée, le virus de l'herpès peut atteindre toutes les structures de l'œil et on peut observer :

- une blépharite vésiculaire,
- une conjonctivite folliculaire ou papillaire,
- une sclérite ou une épisclérite,
- une uvéite antérieure ou kérato-uvéite,
- une atteinte rétinienne avec notamment les nécroses rétiniennes aiguës ou ARN (*Acute Retinal Necrosis*).

On peut noter aussi la possibilité de survenue d'atteintes neuro-ophtalmologiques parmi lesquelles une neuropathie optique, des paralysies oculomotrices et des paralysies faciales avec exposition cornéenne.

Enfin, à citer également les complications qui peuvent survenir en cas d'évolution chronique de l'atteinte herpétique avec l'apparition d'une cataracte sous capsulaire postérieure par uvéite chronique et corticothérapie prolongée ou encore d'un glaucome chronique.

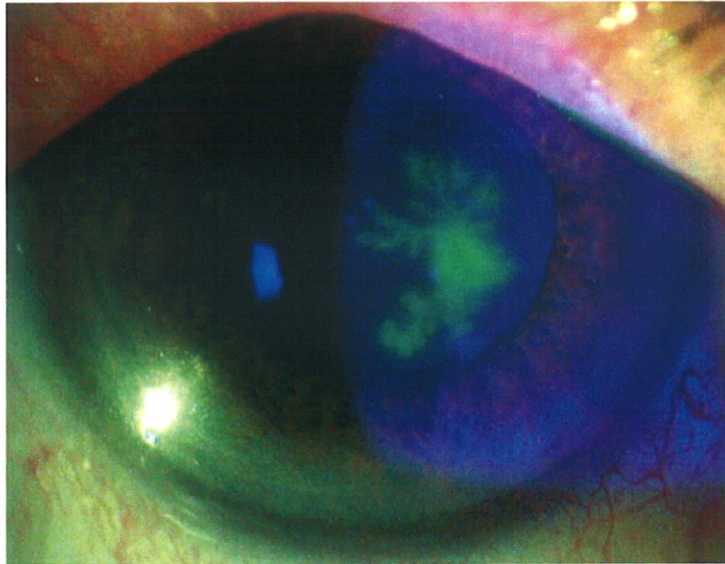


Figure 6 : Kératite herpétique

f. Diagnostic biologique^{17,18}:

L'indication du diagnostic virologique de l'herpès se fait en dehors d'une atteinte typique pour laquelle la mise en route du traitement sera débutée sans confirmation biologique (kératite dendritique, récurrence chez un patient dont le diagnostic virologique a déjà été fait). Devant un tableau un peu plus atypique ou sur un terrain particulier comme sur un patient greffé, un patient immunodéprimé, des prélèvements systématiques seront réalisés même si le traitement sera mis en route avant les résultats de ces prélèvements.

Diagnostic direct :

- immunocytodiagnostic sur frottis par immunofluorescence ou immunoperoxydase à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques.

- isolement du virus par inoculation à des cellules en culture in vitro avec visualisation rapide de l'effet cytopathogène du virus et plus ou moins sensibilisation par visualisation des antigènes viraux par immunomarquage spécifique anti HSV-1 ou anti HSV-2. L'isolement du virus, obtenu en 1 à 5 jours, selon la quantité de virus présent dans le prélèvement permet le cas échéant la mesure de l'efficacité des antiviraux par l'antivirogramme. Le rendement de l'isolement est faible dans les kératites.

- détection de l'ADN viral par PCR : cette technique est plus sensible et s'applique à tous les types de prélèvement, mais elle ne permet pas de dire si le prélèvement contient du virus infectieux ou non. Par contre elle permet le diagnostic sur de toutes petites quantités de virus. C'est la technique à privilégier pour l'étude des prélèvements oculaires.

- microscopie électronique sur le liquide des vésicules : technique aspécifique qui confirme seulement la présence d'*Herpesviridae* dans le prélèvement et qui n'est plus utilisée en pratique.

Diagnostic indirect :

- titrage des anticorps ou sérologie : pratiquement toujours réalisé par des techniques immunoenzymatiques pour rechercher IgG et IgM. La détection des IgG détermine le statut sérologique avant greffe par exemple. La discrimination entre HSV-1 et HSV-2 a essentiellement un intérêt dans les études épidémiologiques. La détection d'IgM accompagne les primo-infections mais également les récurrences dans un cas sur deux.

6. VZV^{17, 21, 22} :

Tout comme HSV, le VZV ou herpès virus humain de type 3 (HHV3) appartient à la famille des *Herpesviridae* et à la sous famille des *alphaherpesvirinae* et au genre varicellovirus. Virus strictement humain dont la culture *in vitro* est difficile et contrairement à l'HSV, il présente une grande spécificité d'espèce et donc un spectre d'hôte limité expérimentalement. Il réalise lui aussi une infection latente dans les ganglions sensitifs avec possibilité de réactivation endogène. La primo-infection réalise la varicelle alors que les réactivations sont responsables du zona qui correspond à une forme localisée selon le dermatome concerné.

a. Structure :

Le génome viral est constitué d'un ADN viral double brin d'environ 125 kpb. Il présente une séquence unique longue bordée de séquences répétitives internes ou terminales, ainsi qu'une séquence unique courte également bordée de séquences répétitives inversées.

La nucléocapside icosaédrique, d'un diamètre de 100 à 110 nm, est composée de 162 capsomères.

Le tégument entourant la nucléocapside est une structure amorphe et fibreuse faite de protéines.

L'enveloppe est composée d'une bicouche lipidique où sont ancrées les glycoprotéines qui jouent un rôle primordial dans l'interaction du virus avec des récepteurs cellulaires pour la pénétration du virus dans les cellules cibles. Le mécanisme d'acquisition de l'enveloppe est encore controversé.

b. Multiplication du virus :

De part la difficulté à obtenir des modèles expérimentaux de VZV, la physiopathologie du virus est un peu moins connue et extrapolée aux données venant d'HSV. Le cycle de réplication du virus est divisé en trois phases.

L'adsorption du virus se fait via l'interaction entre glycoprotéines de l'enveloppe virale et récepteurs cellulaires, suivie de la pénétration de la nucléocapside et de protéine du tégument dans la cellule cible, par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

L'expression des protéines virales se fait en trois phases successives (précoce immédiate, précoce et tardive) et la réplication du génome du virus est réalisée après expression des protéines immédiates et avant celle des protéines tardives.

Enfin, se produisent l'assemblage des nucléocapsides nouvellement formées, l'acquisition de l'enveloppe virale définitive et la production de particules virales infectieuses.

c. Latence :

Comme pour les autres alphaherpesvirus, la primo-infection par VZV est suivie d'une période de latence plus ou moins longue durant laquelle les composants viraux ne sont détectés que dans les ganglions sensoriels. Cependant, bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement et le maintien de la latence ne soient pas élucidés, il apparaît que le VZV se différencie des autres alphaherpesvirus.

La latence des alphaherpesvirus se caractérise par l'absence de synthèse de protéines virales et surtout par l'accumulation de transcrits anti-sens (LAT). Or, il n'existe pas d'homologue de LAT chez le VZV et la latence du VZV se traduit par l'accumulation de certaines protéines précoces immédiates et précoces (contrastant avec l'absence totale de protéines tardives). Ces protéines, également exprimées pendant le cycle de réplication, ont pendant la phase de latence une disposition cellulaire particulière, s'accumulant surtout dans le cytoplasme. Elles semblent donc jouer un rôle important, à définir pour concevoir des thérapies visant à empêcher l'établissement de la latence du virus, ou à en contrôler la réactivation.

d. Epidémiologie :

Le VZV est un virus très contagieux. L'homme est le seul réservoir du virus. Le virus se transmet, d'une part à partir des vésicules cutanées de varicelle ou de zona, directement ou par aérosol, et d'autre part par inhalation de gouttelettes respiratoires projetées par le sujet atteint de varicelle, un à deux jours avant le début de l'éruption.

La transmission du VZV au fœtus à travers le placenta est possible tout au long de la grossesse.

La prévalence du VZV atteint 98% des adultes en France.

e. Pouvoir pathogène²² :

La primo-infection réalise la varicelle pour laquelle l'atteinte des muqueuses est rare et ne donne pas d'atteinte ophtalmologique.

La récurrence définit le zona qui correspond à une infection localisée. L'éruption est unilatérale, limitée à un métamère, territoire innervé par un ganglion sensitif rachidien ou crânien. Pour ce qui est du zona ophtalmique l'éruption est localisée au niveau du territoire de la première branche du nerf trijumeau à la suite d'une réactivation du VZV dans le ganglion de Gasser. Le zona ophtalmique représente 10 à 25% de tous les cas de zona.

Le zona débute avec des prodromes associant fièvre, céphalées, malaise général, photophobie, douleurs cutanées variables dans le territoire du dermatome atteint. Celles-ci peuvent être absentes dans 10% des cas. Trois jours après environ apparaissent les lésions cutanées typiques : éruption vésiculeuse, douloureuse, unilatérale localisée le plus souvent au niveau du territoire de la branche frontale du nerf ophtalmique, première branche de division du nerf trijumeau. L'atteinte du nerf nasociliaire se caractérise par des lésions de l'aile et du bout du nez (signe de Hutchinson) et s'accompagne plus fréquemment d'atteintes oculaires (76% contre 34% en l'absence d'atteinte de ce nerf). Les vésicules se transforment en croûtes qui laissent le plus souvent une cicatrice dépigmentée.

Au niveau ophtalmologique, l'atteinte la plus fréquente du zona est celle de la cornée. Les kératites peuvent atteindre toutes les couches de la cornée et ont comme pour les kératites herpétiques une symptomatologie variée. On distingue les kératites précoces qui surviennent dans le mois qui suit l'infection aiguë, des kératites tardives qui surviennent entre 3 à 4 mois et plusieurs années d'évolution.

En dehors de l'atteinte cornéenne, le virus VZV peut être responsable de nombreuses autres manifestations oculaires :

- une blépharite vésiculeuse,
- une conjonctivite aiguë folliculaire,
- une sécheresse oculaire,
- une épisclérite, une sclérite, une sclérokératite ou une scléromalacie,
- une vascularite limbique,
- une uvéite ou kérato-uvéite,

- une ischémie du segment antérieur,
- une hypotonie et phtyse du globe,
- des atteintes rétiniennes comme une occlusion de l'artère centrale de la rétine, une rétinite ischémique, une chorioretinite multifocale ou serpiginieuse, une nécrose rétinienne aiguë ou ARN (*Acute Retinal Necrosis*) ou progressive : PORN (*Progressive Outer Retinal Necrosis*),
- des atteintes neuro-ophtalmologiques.

La chronicisation et le traitement peuvent également être à l'origine d'atteintes comme une cataracte sous capsulaire postérieure ou un glaucome.

Ce qui caractérise le zona, est la persistance de douleurs dans le territoire concerné surtout si un retard de mise en route du traitement s'est produit.

f. Diagnostic biologique^{17, 22} :

Diagnostic direct :

- immunocytodiagnostic, effectué directement sur le prélèvement à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-VZV conjugué à la fluorescéine ou à la peroxydase permet un diagnostic spécifique. Cette technique nécessite une certaine richesse du prélèvement.

- isolement du virus en culture de cellules in vitro (fibroblastes embryonnaires) avec visualisation de l'ECP en 3 à 7 jours. L'isolement est délicat en raison de la fragilité du virus. Des antigènes précoces de VZV sont détectables dès 48 heures à l'aide d'anticorps monoclonaux après inoculation.

- détection des acides nucléiques par PCR, surtout utile dans le diagnostic des formes compliquées et donc oculaires. En situation épidémique, la caractérisation des acides nucléiques par polymorphisme de restriction et l'analyse du nombre de séquences répétées permet de distinguer les souches sauvages de la souche vaccinale.

- microscopie électronique sur liquide de vésicule permet un diagnostic d'infection à *Herpesviridae* mais ne différencie pas HSV et VZV.

Diagnostic indirect :

- techniques de détections des anticorps spécifiques : immuno-enzymatique, FAMA (*Fluorescent Antibody to VZV-induced Membrane Antigen*). La présence d'IgG anti-VZV signe une infection ancienne et définit le statut sérologique avant greffe par exemple. La présence d'IgM n'affirme pas la primo-infection car les IgM peuvent être présentes lors des réactivations.

7. La PCR :

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique de biologie moléculaire mise au point il y a plus de 20 ans²³. Ses applications sont nombreuses dans la recherche comme dans le domaine médical pour l'aide au diagnostic dans différents domaines comme l'infectiologie, l'hématologie ou encore la biochimie.

a. PCR classique en point final :

Son principe est basé sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser un brin d'ADN complémentaire d'une séquence d'ADN servant de matrice. De courts fragments d'ADN, les amorces ou *primers* de 20 bases environ, sont utilisés pour cibler de façon spécifique la séquence d'intérêt à amplifier et pour initier le processus. A partir de ces amorces, l'ADN polymérase incorpore les bases élémentaires présentes dans le mélange réactionnel et assure la synthèse du brin complémentaire de la matrice afin de synthétiser un ADN double brin.

La réaction de PCR consiste en la répétition de trois étapes de température, de manière cyclique, à l'aide d'un thermocycleur pendant 25 à 50 cycles.

Premièrement, on réalise une dénaturation thermique de l'ADN à amplifier à 95°C, qui permet, grâce à la rupture des liaisons hydrogènes, la séparation des deux brins de l'ADN.

Ensuite peut avoir lieu l'hybridation des amorces. Celles-ci sont présentes dans le milieu réactionnel et au nombre de deux, chacune complémentaire d'un des deux brins de l'ADN. La température d'hybridation des amorces est variable et dépend du T_m de chaque amorce. Elle est inférieure à celui-ci. Le T_m correspond au point de fusion des amorces, valeur de température pour laquelle 50% du couple ADN cible/amorce est sous forme double brin.

Troisièmement, l'élongation du brin d'ADN néoformé est réalisée par l'ADN polymérase qui incorpore les désoxyribonucléotides complémentaires du brin matrice. Les désoxyribonucléotides sont également apportés au mélange réactionnel. La synthèse s'effectue toujours dans le sens 5'-3'. La température optimale pour la plupart des enzymes est de 72°C. Chaque étape d'un cycle dure entre 30 secondes et 1 minute environ, soit une durée totale de la réaction de 2 à 3 heures.

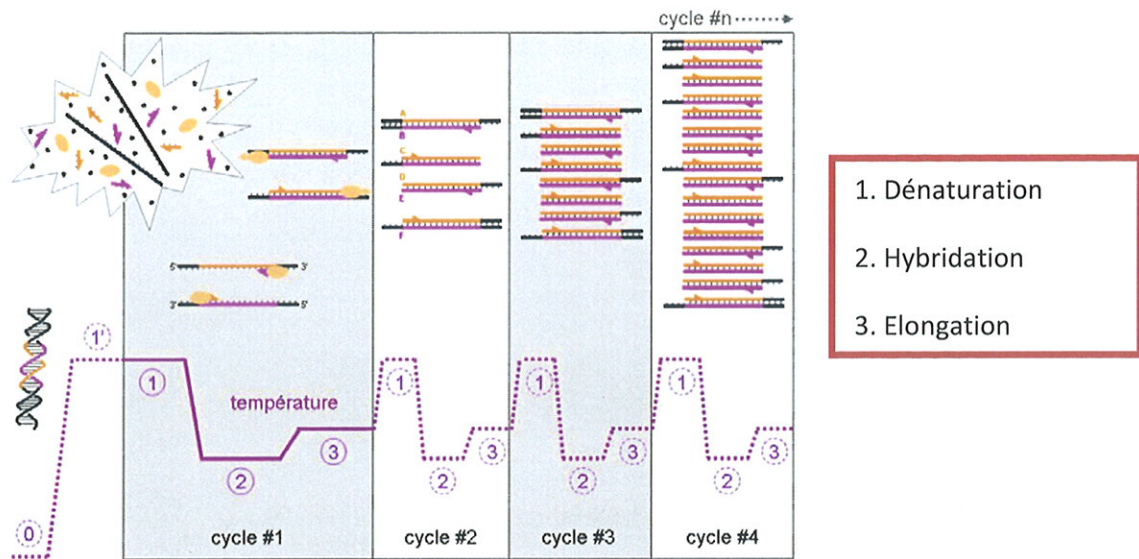


Figure 7 : Principe de l'amplification lors de la réaction de PCR

A chaque cycle, la quantité d'ADN est doublée, on observe donc une croissance exponentielle des produits amplifiés. En théorie, pour n cycles, on obtient 2^n copies d'ADN. Cependant, cette relation entre la quantité d'ADN amplifié et le nombre de cycles effectués n'est valable que pendant la phase dite exponentielle de la réaction. En effet, au bout d'un certain nombre de cycles, la réaction perd de son efficacité et on observe une phase dite de plateau.

Dans le cas d'une PCR classique, dite « en point final », la détection des produits amplifiés, le plus souvent réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose, est une étape supplémentaire indispensable qui doit être effectuée à la fin de la réaction de la PCR, c'est-à-dire lorsque les différents produits amplifiés ont atteint la phase de plateau. Dans le cas de la PCR en point final, les données de la phase exponentielle ne sont pas accessibles, il n'est donc pas possible de quantifier une cible au sein d'un échantillon : cette technique se limite à des données qualitatives.

b. PCR en temps réel :

La PCR en temps réel a été mise au point dans les années 90²⁴, elle combine la réaction de PCR classique à la détection en temps réel des produits amplifiés. Le principe de la PCR en temps réel est fondé sur la détection des produits amplifiés par un signal fluorescent émis par un fluorophore. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés. Il devient donc possible, pendant la phase exponentielle, de quantifier l'ADN cible initialement présent.

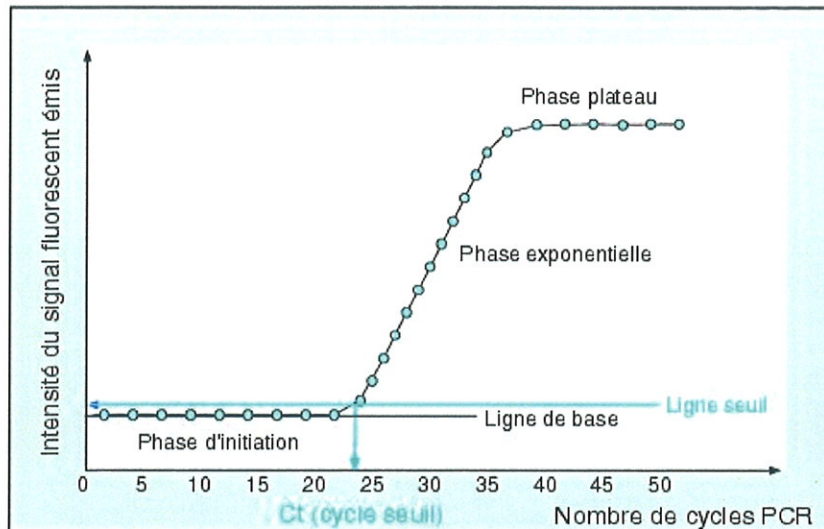


Figure 8 : Suivi en temps réel d'une réaction de PCR

Il existe différents types de fluorophores rassemblés en deux grands groupes : les agents intercalants et les sondes fluorogéniques.

Un agent intercalant est capable, grâce à sa structure, de s'insérer de manière spécifique dans la double hélice d'une molécule d'ADN double brin. L'agent intercalant utilisé en PCR est le SYBR Green. A chaque étape d'hybridation et d'élongation, il s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin. Excité par des rayonnements lumineux, il émet alors un signal de fluorescence. La mesure de ce signal, à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi, cycle par cycle, de la réaction de PCR.

Les sondes fluorogéniques sont des séquences nucléotidiques simple brin, spécifiques du fragment cible amplifié. Elles sont marquées à l'une ou l'autre de leur extrémité par un fluorophore. La spécificité est donc meilleure qu'avec les agents intercalants. Plusieurs chimies existent : le système TaqMan constitué d'une seule sonde et le système FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*) qui requiert l'utilisation de deux sondes marquées espacées de quelques bases.

Les sondes d'hydrolyse, ou sondes TaqMan, ou sondes doublement marquées, sont les sondes les plus utilisées en PCR temps réel. Cette sonde est un oligonucléotide simple brin, linéaire, marqué à ses deux extrémités 5' et 3' par deux fluorophores. Le fluorophore greffé en 5' est appelé émetteur ou *reporter* et celui en 3' est appelé extincteur ou *quencher*. Lorsque la sonde est hybridée sur l'ADN cible, la fluorescence du premier excite le second qui réémet dans une autre longueur d'onde. Ainsi, la fluorescence du premier est éteinte par le second, elle n'est pas détectable. Il en est de même lorsque la sonde est libre dans le milieu réactionnel. Par contre, au moment de l'élongation, quand l'ADN polymérase synthétise le

brin complémentaire de l'ADN cible, elle utilise son activité 5'-3' exonucléasique pour couper la sonde, séparant ainsi le *reporter* du *quencher* et permettant au *reporter* d'émettre sa fluorescence qui n'est plus réabsorbée par le *quencher*. La lecture de la fluorescence s'effectue donc en fin d'élongation lorsque toutes les sondes hybridées ont été hydrolysées. Le signal est proportionnel à la quantité de sonde hybridée et donc à la quantité d'ADN synthétisé depuis le début de la PCR.

Le système FRET est également basé sur le principe du couple *reporter/quencher* légèrement différent. On utilise deux sondes d'hybridation courtes qui portent chacune un fluorophore. Elles s'hybrident à la séquence cible de manière à être proches l'une de l'autre. Une sonde porte un fluorophore *reporter* en 3', l'autre un fluorophore *quencher* en 5'. Soit le spectre d'émission du *reporter* chevauche celui du *quencher* et un signal de fluorescence sera mesuré (FRET classique), soit la fluorescence émise par le *reporter* est absorbée par le *quencher* et c'est la perte de fluorescence qui est mesurée (*quenched* FRET). Dans les deux cas, la mesure est effectuée lors de l'étape d'hybridation.

Un autre système utilise les balises moléculaires : la sonde possède deux séquences complémentaires qui lui donnent la forme d'une épingle à cheveu rapprochant le *reporter* du *quencher*. La zone d'hybridation à l'ADN cible est comprise entre les deux séquences complémentaires formant la boucle de l'épingle. A l'état stable, aucune fluorescence n'est émise car *reporter* et *quencher* sont proches l'un de l'autre. A la température d'hybridation des sondes, la molécule « s'ouvre » permettant à la partie complémentaire de l'ADN cible de s'hybrider. *Reporter* et *quencher* sont alors éloignés et une émission de fluorescence s'effectue.

c. Principes de la quantification :

L'application de la PCR en temps réel est de déterminer la quantité initiale Q_0 d'un ADN cible présent dans un échantillon. Théoriquement, durant la phase exponentielle, après chaque cycle de PCR la quantité d'ADN synthétisé est doublée. La relation entre la quantité d'ADN initiale et la quantité mesurée à la fin du cycle n (Q_n) est la suivante :

$$Q_n = Q_0 \times 2^n$$

Cette équation ne reflète la réalité que si la réaction de PCR est efficace à 100% et qu'à chaque cycle, la quantité d'ADN est effectivement doublée. En réalité, l'efficacité d'une PCR est rarement de 100% et il faut intégrer dans l'équation le coefficient d'efficacité de la PCR. L'efficacité (E) est définie comme le rapport entre la quantité d'ADN synthétisée à la fin d'un cycle et la quantité de molécules présentes au début de ce cycle. Si on intègre Q_0 , on obtient :

$Q_n = Q_0 \times (1+E)^n$, cette équation n'est valable que durant la phase exponentielle.

La valeur de Q_n n'est pas directement accessible, puisqu'on mesure une quantité de fluorescence. Il est nécessaire d'utiliser une gamme étalon comprenant des quantités connues d'ADN cible pour établir la relation entre quantité d'ADN et quantité de fluorescence.

Dans les premiers cycles de PCR, le signal fluorescent est trop faible pour être détecté par l'appareil. Au bout d'un certain nombre de cycles, fonction de la quantité d'ADN initialement présente, une augmentation significative du signal fluorescent apparaît. Ce signal déterminé par le logiciel ou par l'opérateur, est appelé seuil ou *threshold* (T). Il est fixé de façon à pouvoir différencier du bruit de fond un signal fluorescent lié à une amplification des produits de PCR. Ce seuil se situe dans la phase exponentielle de la réaction. Son intersection avec la courbe d'acquisition de la fluorescence (intensité de fluorescence = f(cycles)) permet de déterminer le C_t , nombre de cycles nécessaire pour atteindre le seuil de fluorescence. Plus les échantillons sont fortement concentrés en ADN, plus les C_t sont précoces et inversement. Le C_t est lié à la quantité d'ADN cible initiale par la relation linéaire suivante :

$$C_t = (T/\log(1+E) - \log(Q_0))/(\log(1+E)).$$

Grâce à l'analyse d'une gamme témoin de l'ADN recherché à des concentrations connues, il est possible d'établir une droite exprimant les C_t en fonction des différentes concentrations d'ADN. Avec l'équation de cette droite, la quantité initiale inconnue Q_0 d'un échantillon peut être déterminée.

La pente de la droite (a) donne accès à l'efficacité de la réaction. Quand $E=1$ soit une efficacité de 100%, la pente de la droite est de -3,32.

L'ordonnée à l'origine (b) donne le C_t qui correspond à la détection d'une copie de l'ADN cible.

Au total, l'équation de la droite permet de connaître la quantité d'ADN présente dans un échantillon inconnu. Il suffit de reporter sa valeur de C_t sur la courbe $C_t = f(\log Q_0)$ et de déterminer Q_0 .

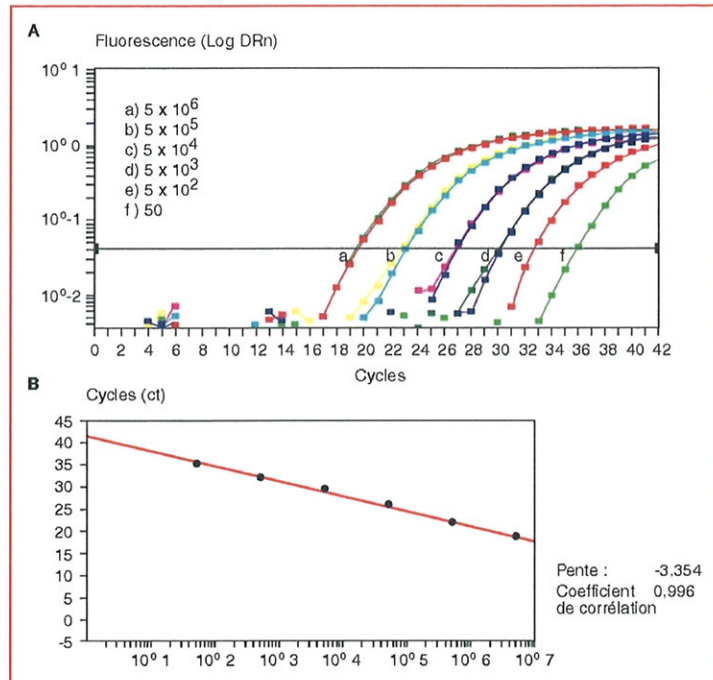


Figure 9 : Exemple de résultat obtenu à l'issue d'une expérimentation de PCR en temps réel

d. Appareils utilisés en PCR en temps réel :

Les appareils de PCR en temps réel combinent un thermocycleur et un fluorimètre. Les principales différences d'un appareil à l'autre résident dans leur capacité d'échantillonnage et dans leur système optique d'émission (laser, diode électroluminescente ou lampe halogène).

L'appareil utilisé dans notre étude est le Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, Australie). Il permet de faire passer 36 échantillons en une séance ou *run*. Les échantillons sont chauffés et refroidis dans une faible masse d'air. Le chauffage est obtenu grâce à un élément nickel-chrome situé dans le couvercle. La chambre est refroidie par air pulsé en éjectant l'air chaud par le dessus de la chambre. Les échantillons tournent continuellement à 400 rpm. Le système optique quant à lui est constitué de six sources d'excitations et six filtres de détection combinés avec un trajet optique fixe, qui permettent le multiplexage. Les échantillons sont excités à la base de la chambre par une diode. L'énergie est transmise à travers les fines parois de la base du tube. La fluorescence émise passe à travers un filtre d'émission sur le côté de la chambre et est ensuite collectée par un photomultiplicateur. Le système optique fixe assure une excitation constante de tous les échantillons car ils tournent en permanence dans la chambre. Chaque fluorophore est excité et détecté dans des longueurs d'onde déterminées.



Figure 10 : Rotor Gene

III. NOTRE ETUDE

1. Introduction - Buts de l'étude:

Nous savons que le virus de l'herpès peut être retrouvé dans la cornée de patient longtemps après un épisode infectieux^{25, 26} et que la transmission du virus HSV d'un donneur vers un receveur est possible via la greffe de cornée^{11, 27, 28} sans toutefois pouvoir dépister les cornées à risque sans destruction de celles-ci.

Nous savons également que le virus est présent à l'état latent au niveau du ganglion de Gasser pour ce qui est de la région oculaire.

Notre étude a pour but d'étudier la faisabilité d'un dépistage systématique des donneurs cornéens pour les virus HSV-1, HSV-2 et VZV.

L'hypothèse émise est donc de rechercher au niveau des nerfs qui innervent la cornée, présents dans la sclère en périphérie du greffon cornéen, la présence du virus soit lors de sa migration éventuelle le long des nerfs vers la cornée, soit à l'état latent.

Afin de rechercher une infection virale oculaire concomitante non encore symptomatique lors du décès, nous recherchons également le virus au niveau de l'humeur aqueuse et au niveau du vitré.

2. Matériels et méthodes :

Notre étude a été réalisée après dépôt du dossier à l'Agence de la Biomédecine et conformément au décret n° 2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain et modifiant le code de la santé publique (dispositions réglementaires).

a. Patients inclus :

Ont été inclus dans notre étude tous les patients candidats au don de cornée, pour les prélèvements réalisés de novembre 2007 à novembre 2008.

54 patients ont été prélevés durant cette période.

b. Déroulement du prélèvement :

Les prélèvements sont réalisés de manière stérile, conforme au prélèvement de cornée en vue d'un don et sont de trois natures : tout d'abord une ponction de chambre antérieure est réalisée (H), suivie du prélèvement du bouton cornéen acheminé ensuite à la banque de tissus, puis nous réalisons une ponction de vitré (V) ainsi que le prélèvement scléral constitué d'un anneau de 2 mm de large, en périphérie du greffon cornéen, anneau scléral orienté et découpé en 6 fragments (A,B,C,D,E,F). Les prélèvements de l'œil droit sont étiquetés à l'aide de numéros (07 à 60) et une « * » est ajoutée pour différencier l'œil gauche (07* à 60*).

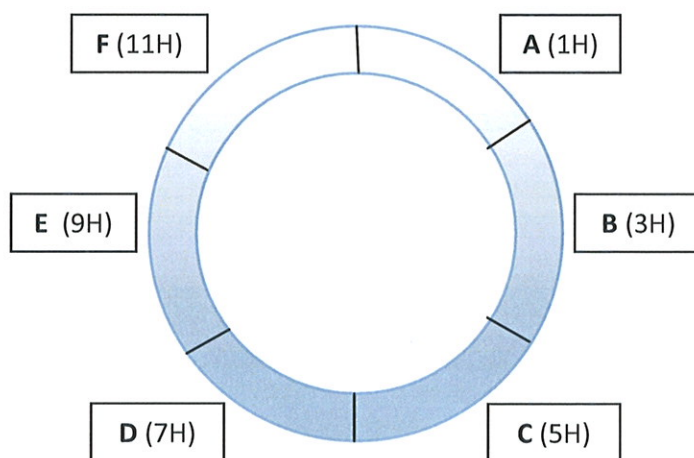


Figure 11 : Schéma de la découpe sclérale en 6 fragments

Les échantillons sont immédiatement congelés à -80°C et conservés à la tumorothèque du service d'anatomopathologie.

A noter que 6 patients ont initialement été prélevés pour la sclère seule (patients 01 à 06), dont 14 échantillons qui ont été utilisés lors de la mise au point des techniques de broyage et d'extraction.

c. Patients exclus :

Aucun donneur n'a été exclu de l'étude. Toutefois, certains échantillons n'ont pu être analysés pour raisons techniques. Pour ces patients, les données sont donc incomplètes.

d. Suivi des patients greffés :

Afin de connaître la survenue ou non d'un rejet de greffe chez les patients ayant reçu les cornées testées, un suivi à un 1 mois, 6 mois et 1 an a été effectué.

Pour les patients greffés au CHU de Limoges, un contrôle rétrospectif sur dossier a été réalisé. Pour les patients greffés dans d'autres centres (Clinique Chénieux à Limoges, CHU de Rouen, Fondation Rotschild à Paris, CHU de Bordeaux, CHU de Besançon, Clinique de la Sourdille à Nantes), le suivi a été effectué par appel téléphonique aux différents médecins greffeurs.

e. Extraction de l'ADN des différents prélèvements :

Extraction à partir de la sclère :

Comme nous l'avons vu, la sclère est un tissu très fibreux, constitué de nombreuses fibres de collagène intriquées. La difficulté rencontrée est de réussir à broyer correctement le tissu et d'en obtenir une lyse optimale afin de réaliser une extraction la plus complète possible, le nombre de cellules étant relativement faible dans ce tissu.

Chaque échantillon pèse entre 15 et 20 mg (Balance de précision Sartorius Mechatronics TE64, Palaiseau, France)

Plusieurs techniques de broyage ont été testées :

- (1) l'échantillon est incubé directement dans 180 μ L de tampon ATL (Qiagen, Courtaboeuf, France) sans traitement ni manipulation préalables

- (2) l'échantillon est découpé à l'aide d'un scalpel stérile puis broyé mécaniquement (Broyeur Precellys, Bertin Technologies) dans 540 μ L de tampon ATL soit avec les billes en céramique CK14, soit avec les billes en métal MK28 selon le protocole suivant : agitation à 6800 rpm deux fois 30 secondes avec une pause de 30 secondes entre les deux.

- (2bis) Alternativement, l'échantillon découpé au scalpel est broyé mécaniquement dans un broyeur FastPrep (MP Biomedicals) dans 540 μ L de tampon ATL avec des billes de

céramiques (lysing matrix D, MP Biomedicals) selon le protocole suivant recommandé par le fabricant: agitation à 6,5 m/s deux fois 40 secondes.

- (3) l'échantillon est découpé à l'aide d'un scalpel stérile puis broyé manuellement dans un potter dans 180 μ L de tampon ATL

- (4) l'échantillon est découpé à l'aide d'un scalpel stérile, placé dans un tube avec des billes en céramique (Qiagen) puis broyé (Broyeur Tissue Lyser, Qiagen) selon le protocole suivant : les portoirs sont placés dans l'azote liquide avant de recevoir les tubes et l'ensemble est fixé dans le broyeur puis homogénéisé deux fois 30 secondes.

- (5) l'échantillon est découpé à l'aide d'un scalpel stérile puis lyophilisé par évaporation de la solution dans un évaporateur rotatif (Speed Vac Concentrator, Eppendorf) pendant 25 minutes à température ambiante ; l'échantillon est ensuite broyé avec le Tissue Lyser selon le protocole décrit ci-dessus (4)

Quelle que soit la technique de broyage utilisée, chaque échantillon est ensuite lysé à 56°C pendant environ 18 heures par incubation avec la protéinase K selon les quantités suivantes : lorsque l'échantillon ne subit aucune manipulation avant l'incubation avec le tampon (1) ou qu'il bénéficie d'un broyage manuel (3), la lyse s'effectue en présence de 20 μ L de protéinase K. Lorsque l'échantillon bénéficie d'un broyage à l'aide du Précellys (2) ou du Fastprep (2bis) 60 μ L de protéinase K sont ajoutés. En cas de broyage à sec de l'échantillon (4 et 5), un volume de 180 μ L de tampon ATL est ajouté dans le tube, puis complété avec 20 μ L de protéinase K.

L'extraction est ensuite réalisée avec le kit QIAGEN Mini kit, Protocole « Tissue » :

Les échantillons lysés sont transvasés dans des tubes propres afin d'éliminer les billes puis centrifugés brièvement avant de recevoir 200 μ L (techniques (1), (3), (4) et (5)) ou 600 μ L (techniques (2) et (2bis)) de tampon AL. L'ensemble est agité vigoureusement à l'aide d'un vortex, puis incubé à 70°C pendant 10 minutes. 200 μ L (techniques (1), (3), (4) et (5)) ou 600 μ L (techniques (2) et (2bis)) d'éthanol absolu sont ajoutés aux échantillons. Le mélange est agité puis déposé sur une colonne contenant une membrane de silice et centrifugé à 8 000 rpm pendant 1 minute. Cette étape est renouvelée jusqu'à ce que la totalité du mélange soit centrifugé. A l'issue de la centrifugation, l'éluat contenant les débris cellulaires et les protéines est écarté et la membrane de silice comportant les acides nucléiques est lavée successivement par 500 μ L de tampon AW1, centrifugation à 8 000 rpm 1 minute, puis 500 μ L de tampon AW2, centrifugation à 14 000 rpm 3 minutes. Une autre centrifugation de la colonne à sec pendant 1 minute à 14 000 rpm permet d'éliminer l'alcool résiduel. Un volume de 200 μ L de tampon AE (acétate EDTA, fourni dans le kit) est déposé sur la membrane de

silice et incubé pendant 1 minute. Une dernière centrifugation d' 1 minute à 8 000 rpm permet d'éluer l'ADN purifié qui est ensuite conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Afin de déterminer la meilleure technique de broyage de la sclère, l'ADN génomique (ADNg) extrait par les différentes méthodes est quantifié par mesure de la densité optique au spectrophotomètre puis utilisé pour réaliser l'amplification du gène de l'albumine. En effet, la quantification au spectrophotomètre permet de connaître la pureté de l'ADNg (rapport A260nm/A280nm compris entre 1,8 et 2) et d'évaluer la concentration d'acides nucléiques présents dans la solution finale (tableau 3, p53).

Cependant, la solution finale d'ADNg peut contenir des ARN résiduels et de l'ADN partiellement dégradé, qui absorbent à 260 nm et sont ainsi quantifiés sans pour autant être des cibles pour la PCR du gène d'intérêt.

C'est pour cette raison qu'une amplification du gène de l'albumine est systématiquement réalisée avec 5 µL de solution d'ADNg (tableau 4, p54). Dans chaque échantillon, la quantité d'albumine amplifiée, par comparaison avec des ADN d'albumine standard amplifiés simultanément et de concentrations connues, reflète la quantité d'ADNg exploitable pour les PCR des gènes d'intérêt. La quantité d'albumine amplifiée permet également d'appréhender la présence d'inhibiteurs de la PCR. En comparant la quantité d'albumine après les différentes méthodes d'extraction, nous pouvons déterminer quelle méthode est la plus efficace (tableau 4, p54).

Extraction à partir de l'humeur aqueuse :

De par sa nature liquide et du fait du petit nombre de cellules présentes dans l'échantillon, il n'est pas nécessaire de réaliser un broyage préalable et l'échantillon d'humeur aqueuse est traité directement.

L'extraction est réalisée avec le kit QIAGEN Micro Kit, Protocole « Small volume of blood ».

Un volume de 200 µL d'humeur aqueuse est complété avec 200 µL de tampon ATL (Qiagen, Courtaboeuf, France), 20 µL de Protéinase K et 1 µL d'ADN carrier à 5 µg/µL dans chaque tube. En effet, en présence d'un tissu dans lequel le nombre de cellules est faible, il est préférable de potentialiser l'extraction en ajoutant une molécule qui s'accroche à l'ADN afin de le rendre plus volumineux et donc plus accessible. Après une brève centrifugation des tubes, 200 µL de tampon AL sont ajoutés. L'ensemble est agité vigoureusement à l'aide d'un vortex, puis incubé à 56°C pendant 10 minutes. Les tubes sont centrifugés avant de recevoir 50 µL d'éthanol absolu qui est mélangé brièvement à l'aide d'un vortex. Les tubes sont ainsi

incubés 3 min à température ambiante. Le mélange est agité puis déposé sur une colonne contenant une membrane de silice et centrifugé à 8 000 rpm pendant 1 minute. A l'issue de la centrifugation, l'éluat contenant les débris cellulaires et les protéines est écarté et la membrane de silice comportant les acides nucléiques est lavée successivement par 500 µL de tampon AW1, centrifugation à 8 000 rpm 1 minute, puis 500 µL de tampon AW2, centrifugation à 14 000 rpm 3 minutes. Une autre centrifugation de la colonne à sec pendant 3 minutes à 14 000 rpm permet d'éliminer l'alcool résiduel. Un volume de 50 µL de tampon AE (acétate EDTA, fourni dans le kit) est déposé sur la membrane de silice et incubé pendant 1 minute. Une dernière centrifugation d' 1 minute à 8 000 rpm permet d'éluer l'ADN purifié qui est ensuite conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Afin de vérifier la qualité de l'extraction de l'ADNg à partir de nos échantillons et d'estimer la quantité, une mesure de l'absorbance est réalisée au spectrophotomètre (NanoDrop ND-1000, Wilmington, USA).

Extraction à partir du corps vitré :

Le vitré est un tissu très visqueux, difficile à prélever en l'état à l'aide d'une micropipette. Il est donc nécessaire de réaliser un broyage préalable à la lyse et à l'extraction.

Le vitré est placé dans un tube contenant des billes en céramique CK14 puis broyé mécaniquement (Broyeur Précellys, Bertin Technologies) selon le protocole suivant : agitation à 6 800 rpm deux fois 30 secondes avec une pause de 30 secondes entre les deux.

La suite de l'extraction est réalisée avec le kit QIAGEN Micro Kit, Protocole « Small volume of blood », de manière identique à celle effectuée pour l'humeur aqueuse.

f. PCR réalisées sur les ADN extraits :

Pour chaque échantillon testé nous avons réalisé une PCR en temps réel quantitative utilisant le système TaqMan. Pour chaque donneur, nous avons réalisé une PCR à la recherche du virus HSV, une PCR à la recherche du virus VZV et une PCR Albumine, comme nous l'avons vu plus haut, afin d'attester d'une extraction correcte de l'échantillon. 24 PCR ont donc été effectuées pour chaque donneur : 2 prélèvements de sclère (n° B et E, correspondant aux segments 3H-9H), un prélèvement d'humeur aqueuse et un prélèvement de vitré sur chaque œil (4 prélèvements x 2 yeux x 3 recherches différentes).

Pour les patients positifs pour un de ces prélèvements, nous avons réalisé des PCR complémentaires sur les fragments A et D, correspondant aux segments 1H et 7H.

PCR HSV-1 et HSV-2 ²⁹ :

Pour une réaction, nous avons préparé le mix suivant : 3 mM de MgCl₂, 0,5 µM de chaque amorce, 0,2 µM de sonde, 2 µL de LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche, Indianapolis, USA) reconstitués selon les recommandations du fabricant, 5 µL d'ADN et de l'eau distillée QSP 20 µL.

La gamme utilisée a été réalisée à partir de virus de concentration connue avec des dilutions de 10 à 10⁸. Six points de gamme sont testés lors de la réaction de PCR (10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ et 10⁶).

La sonde utilisée est HSV 116 (déterminée à l'aide du logiciel primer3 et synthétisée par Operon) : FAM- ATCGGCGTCATCTACGGGGGTAAGA-TAMRA.

Les amorces utilisées sont les suivantes :

- HSVpol80F : GAGTGC GAAAA (G/A) ACGTTCAC
- et HSVpol220R : CCTGGAGGTGCGGTTG.

L'appareil utilisé est le thermocycleur Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, Australie) avec comme programme : une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 minutes, puis 50 cycles comprenant : une phase de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, suivie d'une phase d'hybridation-élongation à 60°C pendant une minute. La mesure se fait à la fin de l'étape d'élongation. Le fluorophore FAM est excité à une longueur d'onde de 479 nm et détecté à 510 nm dans le canal vert. Le fluorophore TAMRA est excité à une longueur d'onde de 530 nm et détecté à 555 nm dans le canal jaune.

PCR VZV ³⁰ :

Pour une réaction, nous avons préparé le mix suivant : 3 mM de MgCl₂, 0,5 µM de chaque amorce, 0,2 µM de sonde, 2 µL de LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Roche, Indianapolis, USA) reconstitué selon les recommandations du fabricant, 5 µL d'ADN et de l'eau distillée QSP 20 µL.

La gamme utilisée a été réalisée à partir de virus de concentration connue avec des dilutions de 10 à 10⁸. Six points de gamme sont testés lors de la réaction de PCR (10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ et 10⁶).

Les sondes utilisées sont MGB (Minor Groove Binder Probe): Applied Biosystems

- VZV-wild: VIC-ATCCCTGGGCCACC
- VZV-oka: FAM-ATCCCCGGGCCACC

Les amorces utilisées (Operon) sont les suivantes:

- VZV-F CGTACACGTGATACTGAGACAAAGC

- VZV-R GCCGGTTGCTGGTGTG

L'appareil utilisé est le thermocycleur Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, Australie) avec comme programme : une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 minutes, puis 50 cycles comprenant : une phase de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, suivie d'une phase d'hybridation-élongation à 60°C pendant une minute. La mesure se fait à la fin de l'étape d'élongation. Le fluorophore FAM est excité à une longueur d'onde de 479 nm et détecté à 510 nm dans le canal vert. Le fluorophore VIC est excité à une longueur d'onde de 530 nm et détecté à 555 nm dans le canal jaune.

PCR Albumine:

La PCR albumine nous sert comme témoin d'extraction et pour démontrer l'absence d'inhibiteur de PCR dans nos échantillons extraits.

Pour une réaction, nous avons préparé le mix suivant : 3 mM de MgCl₂, 1 μM de chaque amorce, 0,2 μM de sonde, 2 μL de LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Roche, Indianapolis, USA) reconstitué selon les recommandations du fabricant, 5 μL d'ADN et de l'eau distillée QSP 20 μL.

La gamme utilisée a été réalisée à partir de molécules d'albumine de concentration connue avec des dilutions de 10 à 10⁸. Six points de gamme sont testés lors de la réaction de PCR (10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ et 10⁶).

La sonde utilisée est : FAM-CCTGTCATGCCCCACACAAATCTCTCC-TAMRA

Les amorces utilisées sont les suivantes :

- AlbF : GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT

- AlbR : AAATCATGGGAGCTGCTGGTT

L'appareil utilisé est le thermocycleur Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, Australie) avec comme programme : une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 minutes, puis 50 cycles comprenant : une phase de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, suivie d'une phase d'hybridation-élongation à 60°C pendant une minute. La mesure se fait à la fin de l'étape d'élongation. Le fluorophore FAM est excité à une longueur d'onde de 479 nm et détecté à 510 nm dans le canal vert. Le fluorophore TAMRA est excité à une longueur d'onde de 530 nm et détecté à 555 nm dans le canal jaune.

Virus	Amorce ou sonde	Séquence 5'-3'
HSV	Amorce aller : HSVpol80F	GAGTGC GAAAA (G/A) ACGTTCAC
	Amorce retour : HSVpol220R	CCTGGAGGTGCGGTTG
	Sonde	FAM- ATCGGCGTCATCTACGGGGTAAGA-TAMRA
VZV	Amorce aller	CGTACACGTGATACTGAGACAAAGC
	Amorce retour	GCCGGTTGCTGGTGTTG
	Sonde VZV-Wild	VIC-ATCCCTGGGCCACC
	Sonde VZV-Oka	FAM-ATCCCCGGGCCACC
Albumine	Amorce aller	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT
	Amorce retour	AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT
	Sonde	FAM-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-TAMRA

Tableau 2 : Sondes et amorces utilisées pour les PCR

3. Résultats :

a. Population étudiée :

Nos prélèvements ont concerné 54 donneurs soient 108 cornées. 38 cornées seulement ont été greffées (35%) et donc 70 n'ont pas été greffées (65%). Sur les 38 cornées greffées, 22 l'ont été au CHU de Limoges, les 16 autres ont été greffées dans d'autres centres (Clinique Chénieux à Limoges, CHU de Rouen, Fondation Rotschild à Paris, CHU de Bordeaux, CHU de Besançon, Clinique de la Sourdille à Nantes).

Les causes de non greffe sont : une mauvaise qualité endothéliale du greffon dans 37 cas sur 70 (53%), des sérologies virales du donneur ininterprétables dans 16 cas (23%), des sérologies virales positives chez le donneur dans 10 cas (14%), une bactériologie positive du liquide de conservation du greffon dans 4 cas (5,5%), un greffon périmé dans 2 cas (3%) et un greffon refusé par le chirurgien dans 1 cas (1,5%) pour mauvais aspect macroscopique du greffon.

L'âge des donneurs est compris entre 23 et 95 ans avec une moyenne de 74,3 ans.

Les sérologies HSV étaient positives chez 40 des donneurs (74%), négatives chez 12 d'entre eux (22%) et non déterminées pour 2 patients (2%) (Sérologie ininterprétable).

La sérologie VZV était positive chez 51 donneurs (94%), négative pour un donneur (2%) et indéterminée pour 2 patients (4%).

Certains échantillons n'ont pu être analysés pour raisons techniques. Pour certains patients, les données sont donc incomplètes. Il s'agit des patients 9, 10 et 15 pour les prélèvements

d'humeur aqueuse et de vitré, du patient 37 pour lequel les prélèvements de vitré n'ont pas été réalisés et du patient 41 pour lequel seul l'œil droit a été prélevé.

b. Extractions de l'ADN à partir de la sclère :

Afin de connaître la technique d'extraction la plus appropriée au tissu scléral, nous avons testé plusieurs méthodes.

Le tableau 3 reprend les techniques d'extraction détaillées dans le chapitre matériels et méthodes avec les résultats du dosage spectrophotométrique.

Nom de l'échantillon	Technique utilisée ^a	Concentration d'ADNg (ng/ μ L) ^b	Quantité totale d'ADNg (ng) ^c	Pureté (A_{260}/A_{280}) ^e	Rendement (ng d'ADNg /mg de tissu initial) ^d
01AE	(1)	8,06	1612	1,77	107,47
02ACK	(2) CK14	5,57	1114	4,12	74,27
04ACK	(2) CK14	3,65	730	37,74	63,48
05ACK	(2) CK14	4,28	856	1,24	77,82
06ACK	(2) CK14	4,25	850	1,81	77,27
02MK	(2) MK28	15,89	3178	1,48	211,87
03MK	(2) MK28	10,07	2014	1,18	134,27
04MK	(2) MK28	7,7	1540	1,59	99,35
05AFP	(2bis)	3,94	788	1,36	63,04
06AFP	(2bis)	4,02	804	1,25	80,40
01AC	(3)	3	600	2,02	40
03QB	(4)	3,71	742	2,06	49,47
03QVB	(5)	1,75	350	0,68	23,33
04QVB	(5)	3,73	746	3,29	59,68

Tableau 3 : Résultats de la quantification par spectrophotométrie de l'ADNg extrait à partir de la sclère par différentes méthodes

^a les techniques utilisées sont celles décrites dans le texte

^b la concentration de l'ADNg est exprimée en ng/ μ L. Elle est calculée en fonction de la densité optique de la solution à 260 nm

^c quantité totale d'ADNg dans les 200 μ L de tampon AE

^d le rendement est calculé en divisant la quantité totale d'ADNg extrait par le poids de tissu utilisé pour l'extraction

^e Un ADNg est considéré comme pur lorsque le rapport A_{260}/A_{280} est compris entre 1,8 et 2. Un rapport inférieur à 1,8 indique la présence éventuelle de protéines ou de phénol. Un rapport supérieur à 2 peut refléter la présence d'ARN résiduels dans la solution.

Le tableau 4 résume les résultats obtenus par PCR Albumine.

Nom de l'échantillon	Technique ^a	Nb de copies/5 μ L ^b	Nb de copies total ^c	Nb de copies/poids de tissu initial (mg) ^d	Qté d'ADNg (ng)/ poids initial (mg) ^e
01AE	(1)	42600	1704000	113600	399
02ACK	(2) CK14	46400	1856000	123733	434
04ACK	(2) CK14	70890	2835600	246574	865
05ACK	(2) CK14	38300	1532000	139273	489
06ACK	(2) CK14	67115	2684600	244055	856
02MK	(2) MK28	6238	249520	16635	58
03MK	(2) MK28	2471	98840	6589	23
04MK	(2) MK28	66995	2679800	172890	607
05AFP	(2bis)	34055	1362200	108976	382
06AFP	(2bis)	8902	356080	35608	125
01AC	(3)	4625	185000	12333	43
03QB	(4)	39935	1597400	106493	374
03QVB	(5)	6370	254800	16987	60
04QVB	(5)	56585	2263400	181072	635

Tableau 4 : Résultats de la quantification du gène de l'albumine dans l'ADNg extrait à partir de la sclère par différentes méthodes

^a les techniques utilisées sont celles décrites dans le texte

^b Le nombre de copies du gène de l'albumine présent dans l'ADNg est quantifié par PCR quantitative en temps réel, par amplification en parallèle d'une gamme étalon dont le nombre de copies est connu. Le volume de solution d'ADNg utilisé pour la PCR est 5 μ L quelle que soit la méthode d'extraction.

^c Le nombre total de copies du gène de l'albumine contenu dans chaque solution d'ADNg (200 μ L) est obtenu en multipliant par 40 le nombre de copies contenu dans 5 μ L

^d le rendement est calculé en divisant le nombre total de copies du gène de l'albumine par la quantité de tissu de départ

^e 285 copies du gène de l'albumine correspondant approximativement à 1 ng d'ADNg humain, il est possible de calculer la quantité d'ADNg exploitable par mg de tissu initial. Les meilleurs rendements sont en gras.

Les meilleurs résultats sont ceux obtenus avec le broyeur Précellys et les billes en céramique CK14. Le rendement calculé à partir du dosage de l'ADNg au spectrophotomètre montre des résultats très différents de celui calculé à partir de la quantification du gène de l'albumine pour un même échantillon d'ADNg. La quantification par le spectrophotomètre prend en compte l'ADNg mais également les ARN résiduels et les acides nucléiques dégradés, qui faussent donc la quantité de matrice de départ utilisée pour une PCR.

L'avantage de l'amplification du gène de l'albumine est d'être représentative du génome des cellules, et donc d'un ADN réellement amplifiable. Sur la base des résultats de cette dernière méthode (dernière colonne, tableau 2), quatre des six meilleurs rendements sont ceux obtenus par la méthode de broyage avec 540 µL de tampon ATL et les billes céramiques CK14, dans le broyeur Precellys. Cette méthode, simple à réaliser, présente les avantages d'être reproductible et efficace pour le broyage de la sclère et est celle choisie pour la suite des manipulations.

c. Résultats des PCR :

Huit prélèvements ont été effectués sur chaque donneur : deux prélèvements de sclère, un d'humeur aqueuse et un de vitré et cela pour chacun des deux yeux.

406 échantillons ont ainsi été analysés par 3 PCR différentes.

- PCR quantitative Albumine :

Mesurer la quantité du gène de l'albumine revient à déterminer le nombre de cellules contenues dans l'échantillon puisqu'une cellule possède deux gènes d'albumine.

Dans l'humeur aqueuse, nous avons trouvé de 3 à 32 000 copies d'albumine par réaction avec une moyenne de 510 copies par réaction.

Dans le vitré, nous avons trouvé de 22 à 744 000 copies d'albumine par réaction avec une moyenne de 178 000 copies.

Dans la sclère, nous avons trouvé de 10 000 à 1 935 000 copies d'albumine avec une moyenne de 226 000 copies.

- PCR quantitative VZV :

Elles se sont révélées négatives pour la totalité des échantillons étudiés. Les résultats de la PCR albumine permettent d'éliminer la présence d'inhibiteurs.

- PCR quantitative HSV :

18 échantillons au total contenaient du virus HSV. Les PCR ont été réalisées deux fois afin de confirmer la positivité de ces résultats.

Les PCR HSV se sont révélées positives sur 12 yeux prélevés qui correspondent à 8 de nos patients (patients 7, 8, 11, 12, 13, 14, 18 et 19). En effet les donneurs 11, 12, 18 et 19 ont au moins un prélèvement positif sur chaque œil.

L'âge moyen des donneurs positifs est de 66,8 ans (de 23 à 86 ans). 3 patients sont décédés dans le service de réanimation, les autres dans des services différents. Les causes de décès étaient une défaillance multiviscérale chez 3 patients dont 2 dans les suites d'une valvuloplastie, une pneumopathie, une embolie pulmonaire, un traumatisme crânien, un choc septique sur occlusion digestive et une détresse respiratoire aigue.

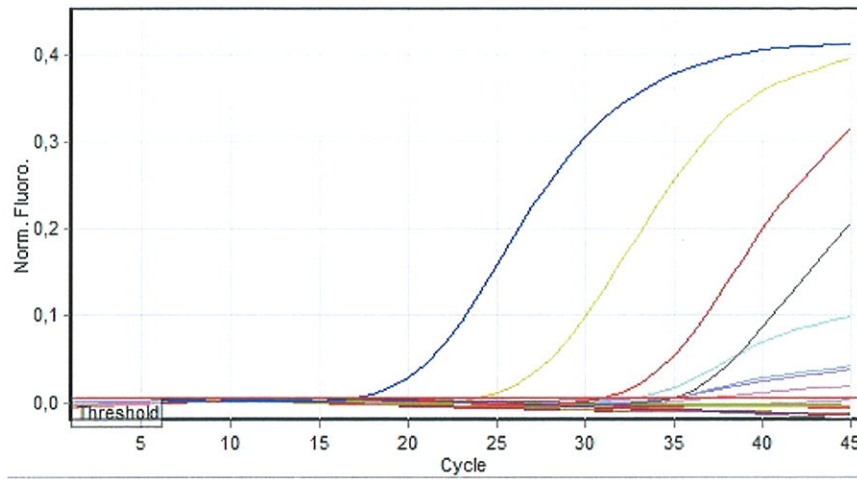
Les prélèvements sont positifs dans la sclère pour 4 patients (7, 8, 11 et 18) dont un est positif pour les deux yeux (11). Cela représente 10 échantillons de sclère sur les 213 qui ont été analysés (4,7%).

Les prélèvements sont positifs pour l'humeur aqueuse chez trois patients (12, 18 et 19) et représentent 3% des échantillons d'humeur aqueuse étudiés (3 sur 100).

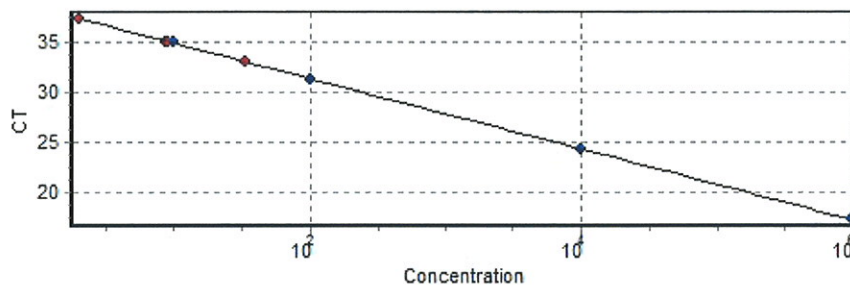
Les prélèvements sont positifs pour le vitré chez 6 patients (11, 12, 13, 14, 18 et 19) dont un est positif pour les deux yeux (18). Cela représente 7 des 93 échantillons de vitré analysés (7,5%).

Quatre donneurs ont donc un seul prélèvement positif (7, 8, 13 et 14), deux patients ont deux prélèvements positifs avec un positif sur chaque œil (12 et 19), le donneur 11 a 5 prélèvements positifs (les deux prélèvements de sclère sur chaque œil et le prélèvement de vitré dans l'œil droit) et le donneur 18 a également 5 prélèvements positifs (humeur aqueuse de l'œil droit, les deux prélèvements scléreaux de l'œil droit et les prélèvements de vitré sur les deux yeux).

Quantitation data for Cycling A.Green



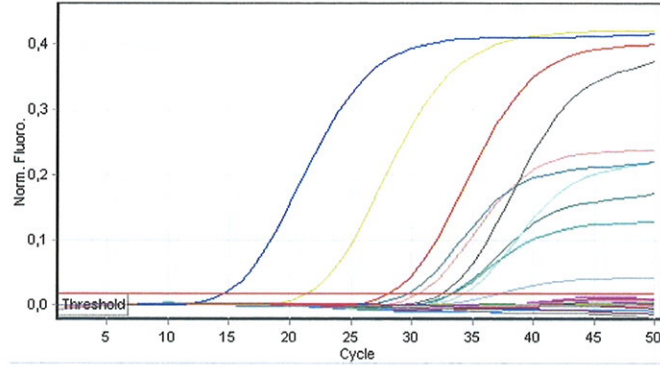
Standard Curve



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1	Red	HSV 14B*	Unknown				
2	Yellow	HSV 14E*	Unknown				
15	Cyan	HSV 18B	Unknown	33,04		3,38E+01	
16	Blue	HSV 18E	Unknown	35,08		8,96E+00	
17	Purple	HSV 18B*	Unknown	35,10		8,89E+00	
18	Green	HSV 18E*	Unknown				
19	Pink	HSV 19B	Unknown	37,36		2,03E+00	
20	Brown	HSV 19E	Unknown				
21	Orange	HSV 19B*	Unknown				
22	Light Green	HSV 19E*	Unknown				
31	Grey	HSV neg echantillons	Unknown				
32	Black	HSV 10e1	Standard	35,09	1,00E+01	8,92E+00	10,8%
33	Red	HSV 10e2	Standard	31,19	1,00E+02	1,13E+02	13,0%
34	Yellow	HSV 10e4	Standard	24,23	1,00E+04	1,04E+04	4,4%
35	Blue	HSV 10e6	Standard	17,30	1,00E+06	9,51E+05	4,9%
36	Purple	HSV neg mix	Unknown				

Tableau 5 : Exemples de résultats des PCR HSV sur les fragments 3H-9H

Quantitation data for Cycling A.Green



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1	Red	19D	Unknown				
2	Yellow	19D*	Unknown				
3	Blue	7A	Unknown				
4	Purple	7A*	Unknown				
5	Pink	8A	Unknown				
6	Cyan	8A*	Unknown				
7	Teal	11A	Unknown	33,34		4,64E+00	
8	Red	11A*	Unknown	30,67		2,64E+01	
9	Green	12A	Unknown				
10	Purple	12A*	Unknown				
11	Black	13A	Unknown				
12	Cyan	13A*	Unknown				
13	Olive	14A	Unknown				
14	Green	14A*	Unknown				
15	Teal	18A	Unknown	34,43		2,28E+00	
16	Blue	18A*	Unknown	37,29		3,54E-01	
17	Purple	19A	Unknown				
18	Pink	19A*	Unknown				
19	Pink	7D	Unknown				
20	Red	7D*	Unknown				
21	Brown	8D	Unknown				
22	Green	8D*	Unknown				
23	Teal	11D	Unknown	33,41		4,44E+00	
24	Blue	11D*	Unknown	29,71		4,96E+01	
25	Dark Blue	12D	Unknown				
26	Purple	12D*	Unknown				
27	Pink	13D	Unknown				
28	Grey	13D*	Unknown				
29	Grey	14D	Unknown				
30	Grey	14D*	Unknown				
31	Grey	neg	Unknown				
32	Black	gamme 10e1	Standard	32,52	1,00E+01	7,92E+00	20,8%
33	Red	gamme 10e2	Standard	28,26	1,00E+02	1,27E+02	27,1%
34	Yellow	gamme 10e4	Standard	21,41	1,00E+04	1,11E+04	11,0%
35	Blue	gamme 10e6	Standard	14,68	1,00E+06	8,95E+05	10,5%
36	Purple	neg mix	Unknown				

Tableau 6 : Résultats des PCR sur les fragments 1H-7H

Type de prélèvement	Nom de l'échantillon	Patient 7		Patient 8		Patient 11		Patient 12		Patient 13		Patient 14		Patient 18		Patient 19		
		Droit	Gauche	Droit	Gauche	Droit	Gauche	Droit	Gauche	Droit	Gauche	Droit	Gauche	Droit	Gauche	Droit	Gauche	
Humeur aqueuse	H	-	-	-	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	0,1	-	1,1	-
	H*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sclère	B	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-
	E	-	-	-	-	310	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
	B*	-	-	-	-	-	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitré	E*	-	10	-	-	-	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	-	-	44	-	-	-	-	-	1,4	-	-	2,2	-	-	-
	V*	-	-	-	-	-	-	-	7,1	-	1,8	-	-	-	-	75	-	4,4

Tableau 7 : Récapitulatif des prélèvements positifs pour HSV (nombre de copies par mg de tissu ou par µL de liquide)

d. Suivi des patients greffés :

Sur les 38 cornées greffées, aucun échec primaire de la greffe n'est survenu. Le rejet primaire de greffe de cornée surviendrait dans 0 à 10% des cas ^{6 7}. Dans la littérature, on retrouve des échecs primaires de greffe dus à l'herpès dans 3 cas sur 586 greffes chez Borderie *et al* ³¹, et l'herpès a été mis en cause 7 fois sur 21 rejets de greffe primaire chez Cockerham *et al* ¹⁰. D'autres études ont mis en cause l'herpès comme cause de rejet primaire⁹.

Deux rejets secondaires ont été observés chez les patients receveurs, régressifs sous traitement par corticoïdes topiques et systémiques à forte dose, sans traitement antiviral associé. Les cornées reçues par ces patients étaient les cornées des donneurs n° 14* et 16. Pour ces cornées, nous n'avons pas retrouvé d'ADN viral dans nos prélèvements.

Parmi les cornées pour lesquelles nous avons retrouvé la présence d'HSV dans un ou plusieurs des prélèvements, seules les cornées n° 8, 11, 11*,13*, 14, 19 et 19* ont été greffées. Les patients receveurs pour ces cornées n'ont pas présenté de complication particulière dans les suites de la greffe.

4. Discussion :

Justification de l'étude :

Le but de notre étude était de prouver la faisabilité d'un dépistage du virus HSV principalement, et du virus VZV dans la sclère en périphérie du greffon cornéen en vue d'une greffe de cornée. Notre avons démontré la présence d'ADN viral herpétique dans la sclère pour 4 de nos patients et donc confirmé la possibilité de détecter de l'ADN viral dans la sclère.

L'objectif secondaire était de déterminer si un dépistage systématique pouvait être mis en place. L'effectif insuffisant et les questions en suspens ne nous ont pas permis de répondre exactement sur ce point.

Cette étude s'intègre dans la lignée des différentes études menées dans le service. Robert *et al* ont démontré la présence d'ADN viral herpétique dans les larmes chez des patients présentant une infection active mais aussi chez des patients avec un passé de kératite herpétique et qui présentaient une cicatrice cornéenne de l'infection ancienne mais qui étaient asymptomatiques lors du prélèvement ³². Ce qui suppose une excrétion du virus même en dehors de toute infection active.

Dans une autre étude ³³, Robert et al ont montré la présence de particules virales dans l'épithélium et dans le stroma cornéen, chez des patients avec ou sans antécédents de pathologie herpétique oculaire et en l'absence d'infection active. Ils ont également confirmé l'atteinte endothéliale avec nécrose de l'endothélium en cas de contamination par un virus qui se réplique^{33,34}.

Les mêmes auteurs ont également étudié la concentration en Anticorps anti HSV dans l'humeur aqueuse dans le cadre des kérato-uvéites herpétiques ³⁵, et ont montré une corrélation entre inflammation et présence d'Anticorps anti-HSV dans l'humeur aqueuse. Cette étude a montré un intérêt dans le diagnostic préopératoire de patients greffés pour lesquels le diagnostic n'avait pas été confirmé biologiquement, permettant ainsi la mise en route d'un traitement prophylactique antiherpétique ³⁶.

Aspects techniques :

Un des problèmes rencontrés dans notre étude a été de réussir à obtenir une extraction correcte d'ADN à partir de la sclère. Afin d'augmenter le rendement d'extraction, nous avons opté pour un broyage préalable. La sclère est un tissu difficile à broyer et plusieurs mises au point ont été nécessaires. Nous avons finalement opté pour un broyage mécanique suivi d'une lyse prolongée des tissus par la protéinase K afin d'optimiser l'extraction et par la suite augmenter la sensibilité de détection de l'ADN viral présent. Une seule étude de 2007 portant sur 35 sclères de donneurs et ayant retrouvé 3 sclères faiblement positives à 10 copies par mg de tissu pour l'ADN de l'HSV utilise une extraction directe sans broyage et ne donne pas de détail ni sur la technique utilisée ni sur le site de prélèvement³⁷.

En ce qui concerne le site de prélèvement choisi, nous sommes partis de l'anatomie de l'innervation de la cornée. En effet, la cornée est innervée en grande partie par les nerfs ciliaires longs, nerfs qui pénètrent dans la sclère au niveau du pôle postérieur de l'œil pour cheminer de façon radiaire vers le segment antérieur et la cornée. Ces nerfs se retrouvent en plus grande quantité au niveau des segments 3H-9H ². C'est pourquoi notre choix s'est porté sur un prélèvement scléral en périphérie du greffon cornéen le long des segments 3H-9H (prélèvements B et E).

Nos résultats semblent aller dans ce sens. En effet, la PCR pour l'herpès s'est révélée positive pour la sclère chez 4 de nos patients (7, 8, 11 et 18) sur ces mêmes fragments. Nous avons ensuite, chez ces patients positifs, réalisé 3 PCR sur les fragments 1H-7H. Ces

nouvelles PCR ont montré du virus herpétique chez 2 des patients (11 et 18). Chez ces deux patients, nous avons retrouvé de l'herpès dans les sclères des deux yeux pour le patient 11 et dans la sclère d'un œil et le segment postérieur de l'œil controlatéral pour le patient 18 et ce, avec un nombre de copies supérieur, comparé aux autres patients positifs. Nous pouvons donc penser que lorsque le virus est présent en quantité « importante », quel que soit le cadran prélevé, il sera positif. Par contre, si le virus est en faible quantité (patients 7 et 8), l'intérêt de prélever au niveau des cadrans 3H-9H semble apparaître. Bien sûr, ce ne sont que des hypothèses qui seraient à valider avec des effectifs bien plus importants.

Les techniques de PCR utilisées ont été choisies parce qu'elles ont fait preuve de leur efficacité^{29,30}. Elles ont été réalisées en suivant un circuit codifié afin de limiter au maximum les risques de contamination : réalisation du mix dans une « pièce propre », ajout des échantillons à tester dans une salle dédiée et enfin, ajout de la gamme en « salle de PCR ». Des témoins négatifs sont ajoutés en « pièce propre » et en salle d'ajout des échantillons. Une seule série de PCR est réalisée par jour afin de ne pas contaminer la salle « propre » de préparation du mix.

Interprétation des résultats :

A propos de la positivité de la PCR HSV dans la sclère :

Nous avons trouvé du génome viral HSV dans la sclère de 4 de nos patients (5 yeux sur 108 soit 4,6%, ou 7,4% des patients). Pour autant, les cornées prélevées chez ces donneurs n'ont pas entraîné d'échec primaire de la greffe comme il est coutume d'observer lors d'une transmission du virus HSV d'un donneur vers un receveur.

Dans une étude similaire à la notre³⁷, Shimomura *et al* ont trouvé 3 sclères positives sur 35 prélevées (8,6%) avec un nombre moyen de 10 copies par mg de tissu. Le nombre de patients n'est pas précisé dans l'étude et on ne sait pas si les 35 prélèvements appartiennent à des patients différents. Nous ne savons pas non plus sur quel segment scléral les PCR ont été réalisées. Dans cette étude, il n'est pas indiqué si les cornées correspondant aux sclères positives pour l'herpès ont bien été greffées et si les patients receveurs ont présenté des complications post opératoires.

Nous retrouvons à peu près les mêmes chiffres avec 4,6% de nos prélèvements positifs. Le nombre de copies retrouvé est de 4 à 1 000 copies par mg de tissu avec une moyenne de 174

copies/mg pour les segments 3H-9H. Pour les PCR réalisées sur les segments 1H et 7H, le nombre moyen de copies n'est que de 11 par mg de tissu (de 1 à 49 copies).

Il nous est impossible de connaître la localisation du virus : dans les terminaisons nerveuses, dans les capillaires ou vaisseaux péri-scléaux ou dans le tissu scléral lui-même. La microscopie électronique pourrait peut être apporter des éléments de réponse quant à la localisation de cet ADN. Nous ne savons pas non plus quel type d'ADN viral (épisomal ou ADN viral linéaire), a été mis en évidence dans nos prélèvements initiaux. Il peut s'agir de particules virales infectieuses ou non, en phase de latence ou potentiellement infectieuses.

Notre étude montre donc la possibilité de présence du virus dans la sclère, sans atteinte cornéenne ni antécédents connus d'herpès, sans qu'il y ait pour autant de transmission au receveur. Il est donc possible que le virus soit en fait en phase de latence dans la sclère, alors que la latence du virus est normalement sensée se passer uniquement au niveau des ganglions sensitifs.

Afin de savoir si le virus présent dans nos échantillons scléaux correspond à une forme latente du virus, une RT-PCR pourrait être réalisée. Celle-ci nous permettrait de retrouver des ARN messagers. En fonction des ARNm amplifiés (transcrits associés à la latence ou LAT), il serait alors possible de savoir si l'on a affaire à une forme latente du virus.

Notre étude ne précise pas s'il s'agit de virus HSV-1 ou HSV-2. Un séquençage des produits d'amplification pourrait nous préciser s'il s'agit d'ADN du virus HSV-1 ou HSV-2.

A propos de la positivité de la PCR HSV dans le vitré :

On trouve un grand nombre de copies d'albumine dans le vitré ce qui correspondrait à un nombre important de cellules. Or le vitré est presque acellulaire. L'explication est probablement due au fait qu'il est difficile de faire un prélèvement de vitré sans emporter également des fragments de rétine ainsi que des éléments sanguins. Le grand nombre de cellules s'explique donc probablement par une « contamination » du vitré par les éléments de voisinage à savoir rétine et vaisseaux choroïdiens. Il est donc très difficile d'affirmer que les prélèvements positifs pour l'HSV relèvent bien d'une localisation dans le vitré. Le virus pouvait aussi bien se trouver dans le sang ou dans la rétine. Cela indique toutefois la présence d'ADN viral herpétique dans le segment postérieur de l'œil pour 6 de nos patients.

A propos de la positivité de la PCR HSV dans l'humeur aqueuse :

Nos prélèvements se sont révélés positifs dans 3% des prélèvements avec un faible nombre de copies (de 0,1 à 3,3 par μL). Parmi les prélèvements positifs, 3 sur 3 correspondent à des patients également positifs pour le vitré. Un seul correspond à un patient positif sur la sclère. On peut donc s'interroger sur l'intérêt de prélever à chaque fois l'humeur aqueuse et le vitré. D'autant plus qu'une contamination des différents milieux reste possible pendant le prélèvement de cornée.

Il faut noter que l'humeur aqueuse est normalement acellulaire. Les PCR albumine ont montré dans les prélèvements HSV positifs un grand nombre de copies d'albumine. Les PCR herpès pour l'humeur aqueuse se sont donc révélées positives uniquement dans les prélèvements comportant un grand nombre de cellules. Ceci peut s'expliquer par une inflammation dans le segment antérieur de l'œil. Cette inflammation pourrait être le reflet d'un relargage de cellules en péri-mortem et post-mortem par rupture de la barrière hémato-aqueuse. Ce phénomène a en effet déjà été décrit par Robert *et al*³⁸

Intérêt de la combinaison des prélèvements :

Quand on analyse les résultats de nos patients positifs pour HSV, on se rend compte que tous les patients positifs sont dépistés avec les deux seuls sites de prélèvement que sont la sclère et le vitré. En effet, les patients positifs pour l'humeur aqueuse sont dépistés soit par le prélèvement de sclère, soit par celui de vitré, soit par les deux. De plus, le nombre de copies retrouvé dans l'humeur aqueuse est très faible. On peut donc penser que le prélèvement scléral couplé à celui du vitré suffit à dépister tous les patients positifs pour l'HSV.

On précisera une fois de plus l'intérêt probable de prélever la sclère au niveau des segments 3H-9H puisque parmi les 4 patients positifs dans la sclère sur ces segments, les tests réalisés sur d'autres segments (1H-7H) ne sont révélés positifs que chez 2 patients.

Patient	Humeur aqueuse	Vitré	Sclère 3H: B	Sclère 9H: E	Sclère 1H: A	Sclère 7H: D
7	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	+	-	-
11	-	+	+	+	-	-
12	+	+	-	-	-	-
13	-	+	-	-	-	-
14	-	+	-	-	-	-
18	+	+	+	+		
19	+	+	-	-	-	

Tableau 8 : Positivité pour l'herpès en fonction du site de prélèvement

A propos du virus VZV dans nos prélèvements :

Nous n'avons retrouvé aucune trace du génome viral du VZV dans nos prélèvements ; il en est de même dans l'étude de Shimomura *et al.* Il semble donc que l'on ne retrouve pas de génome appartenant au VZV en péri-cornéen. Pourtant, le virus VZV appartient à la même famille que l'HSV et possède la même physiopathologie générale. Cette différence de localisation oculaire est intéressante à noter et peut s'expliquer par le fait que les réactivations herpétiques sont fréquentes au cours d'une vie alors que le zona est plus rare et ne survient qu'une seule fois pour un patient donné.

Perspectives :

Qu'en est-il de l'intérêt d'un dépistage systématique ?

Notre étude visait également à estimer la faisabilité d'un dépistage systématique des sclères des donneurs afin d'éviter la transmission donneur-receveur du virus de l'HSV. Dans notre étude, même quand nous avons trouvé du virus chez le donneur, il n'a pas été retrouvé, pour les cornées qui ont été greffées, d'infection herpétique chez le receveur.

Pour les 8 patients chez qui nous avons trouvé des échantillons positifs pour HSV, seuls 5 ont eu leurs cornées greffées (donneurs 8, 11, 13, 14 et 19). Et, sur ces cinq patients, seuls deux avaient un prélèvement de sclère positif (patients 8 et 11).

Nous sommes donc face à deux patients positifs dans la sclère, dont les cornées ont été greffées avec absence d'échec primaire ou de rejet secondaire de greffe chez les receveurs. Pour ces deux donneurs, le nombre de copies du virus variait de 4 à 1 000 par mg de sclère prélevée. Il est possible que ces quantités, détectées au niveau scléral, soient insuffisantes pour entraîner une transmission via la cornée chez le receveur. Il a également déjà été évoqué que le virus HSV peut avoir un pouvoir pathogène plus ou moins important selon la souche³⁹,⁴⁰. Une variante peu « agressive » du virus pourrait être en cause chez nos patients. Il est possible que le virus soit en phase de latence au niveau de la sclère et qu'il n'ait pas entraîné de transmission au niveau cornéen.

Deux autres donneurs étaient positifs pour la sclère (7 et 18), mais leurs cornées n'ont pas été greffées. Il serait intéressant à l'avenir, de conserver les cornées non greffées afin de rechercher une concordance entre la positivité des tissus péri-cornéens et la cornée.

Afin de déterminer si un dépistage est réalisable et utile, il faudrait réaliser les prélèvements sur un grand nombre de sclères et dépister la survenue des échecs primaires chez les receveurs.

En effet dans notre étude, le nombre de prélèvements positifs est insuffisant pour se rendre compte du risque de transmission. Une étude plus large nous permettrait de connaître la prévalence des prélèvements scléreaux porteurs du virus HSV. Il serait également intéressant de coupler ces résultats avec une étude du milieu de conservation des cornées et également d'étudier les cornées qui ne seraient pas retenues pour une greffe.

IV.CONCLUSION

Notre étude a donc montré qu'il est possible de retrouver du génome viral appartenant à l'HSV dans la sclère. Le problème principal est de savoir si ce génome viral est potentiellement infectieux ou non.

Le virus VZV, quant à lui, ne semble pas pouvoir se rencontrer au niveau scléral, et donc cornéen, en dehors d'une infection active.

Notre étude possède un nombre de cas trop faible pour savoir si les receveurs de cornées positives pour l'herpès dans la sclère peuvent entraîner une contamination directe du donneur au receveur. Une étude plus large et si possible multicentrique, pourrait nous aider à définir une éventuelle corrélation entre positivité du génome viral dans la sclère et survenue d'une transmission du virus. Cela confirmerait la possibilité de latence du virus en dehors des ganglions sensitifs.

Une étude future consisterait donc à prélever chaque donneur au niveau scléral, mais aussi au niveau vitréen (le prélèvement d'humeur aqueuse ne semble pas augmenter la sensibilité du dépistage). Il serait également intéressant de tester les cornées non greffées pour mettre en relation les donneurs positifs en péri-cornéen et une atteinte éventuelle de la cornée (perte endothéliale, recherche de particules virales en microscopie électronique...) et bien sûr d'assurer un suivi des patients greffés pour traquer les échecs primaires de greffe.

ANNEXE

Tableaux récapitulatifs des prélèvements effectués sur les donneurs, des résultats des PCR et du suivi des patients greffés. p 69 à 71

Légende :

Alb-HA : Résultats de la PCR Albumine dans l'humeur aqueuse

Alb-V : Résultats de la PCR Albumine dans le vitré

Alb-S : Résultats de la PCR Albumine dans le vitré

Bactério + : prélèvement bactériologique positif sur le liquide de conservation

Bloc : cas d'un greffon refusé par le chirurgien pour aspect macroscopique non satisfaisant juste avant le bloc

Cause : cause de non greffe s'il y a lieu

Greffé : indique si le greffon a été greffé ou non

HSV-HA : Résultats de la PCR HSV dans l'humeur aqueuse

HSV-V : Résultats PCR HSV dans le vitré

HSV-S : Résultats de la PCR VZV dans le vitré

MQE : mauvaise qualité endothéliale

ND : Non déterminé

NT : Non testé

N : Non

O : Oui

Périmé : greffon non utilisé pour durée de conservation dépassé

Rejet : indique l'existence d'un rejet de greffe pour les cornées greffées

Séro ? : sérologie indéterminée

Séro + : sérologie positive pour un des virus testés (HIV, Hépatites)

Séro HSV : Résultats de la sérologie HSV du donneur

Séro VZV : Résultats de la sérologie VZV du donneur

VZV-HA : Résultats de la PCR VZV dans l'humeur aqueuse

VZV-V : Résultats de la PCR VZV dans le vitré

VZV-S : Résultats de la PCR VZV dans la sclère

Patient	Age	Séro HSV	Séro VZV	VZV-HA	VZV-V	VZV-S	HSV-HA	HSV-V	HSV-S	Alb-HA	Alb-V	Alb-S	Greffé	Cause	Rejet
7	50	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro?	-
7*				-	-	-	-	-	+	+	+	+	N	Séro?	-
8	56	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	O	-	N
8*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
9	77	+	+	NT	NT	-	NT	NT	-	NT	NT	+	N	Bloc	-
9*				NT	NT	-	NT	NT	-	NT	NT	+	O	-	N
10	63	+	+	NT	NT	-	NT	NT	-	NT	NT	+	N	Séro+	-
10*				NT	NT	-	NT	NT	-	NT	NT	+	N	Séro+	-
11	75	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	O	-	N
11*				-	-	-	-	-	+	-	+	+	O	-	N
12	86	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	N	Séro+	-
12*				-	-	-	-	+	-	+	+	+	N	Séro+	-
13	23	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
13*				-	-	-	-	+	-	+	+	+	O	-	N
14	83	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	O	-	N
14*				-	-	-	-	+	-	+	+	+	O	-	N
15	60	+	+	NT	NT	-	NT	NT	-	NT	NT	+	N	Séro?	-
15*				NT	NT	-	NT	NT	-	NT	NT	+	N	Séro?	-
16	91	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	O
16*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
17	80	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
17*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
18	77	ND	ND	-	-	-	+	+	+	+	+	+	N	Séro?	-
18*				-	-	-	-	+	-	+	+	+	N	Séro?	-
19	85	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	O	-	N
19*				-	-	-	-	+	-	+	+	+	O	-	N
20	88	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
20*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
21	85	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
21*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
22	89	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
22*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
23	83	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro?	-
23*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro?	-
24	85	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro+	-
24*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro+	-
25	69	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
25*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Bactério+	-

Patient	Age	Séro HSV	Séro VZV	VZV-HA	VZV-V	VZV-S	HSV-HA	HSV-V	HSV-S	Alb-HA	Alb-V	Alb-S	Greffé	Cause	Rejet
26	59	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro+	-
26*													N	Séro+	-
27	95	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
27*													N	MQE	-
28	94	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
28*													N	MQE	-
29	85	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
29*													N	MQE	-
30	49	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro?	-
30*													N	Séro?	-
31	57	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
31*													N	MQE	-
32	87	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
32*													N	MQE	-
33	79	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
33*													N	MQE	-
34	79	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
34*													O	-	N
35	79	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
35*													N	MQE	-
36	85	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
36*													N	MQE	-
37	58	+	+	-	NT	-	-	NT	-	+	NT	+	N	Séro?	-
37*													N	Séro?	-
38	83	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
38*													N	MQE	-
39	70	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
39*													O	-	N
40	89	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
40*													N	MQE	-
41	85	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
41*													O	-	N
42	78	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro+	-
42*													N	Séro+	-
43	64	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro?	-
43*													N	Séro?	-
44	88	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
44*													N	MQE	-

Patient	Age	Séro HSV	Séro VZV	VZV-HA	VZV-V	VZV-S	HSV-HA	HSV-V	HSV-S	Alb-HA	Alb-V	Alb-S	Greffé	Cause	Rejet
45	80	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Périmé	-
45*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Périmé	-
46	62	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
46*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
4è	62	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
47*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Bactério+	-
48	85	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
48*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
49	47	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
49*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
50	66	ND	ND	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro?	-
50*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Séro?	-
51	26	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
51*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
52	71	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
52*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
53	83	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
53*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
54	95	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
54*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
55	81	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
55*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
56	56	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
56*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
57	92	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
57*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-
58	90	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
58*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
59	63	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
59*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	O	-	N
60	85	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	Mycob+	-
60*				-	-	-	-	-	-	+	+	+	N	MQE	-

TABLE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Tableau 1 : Evolution des indications de greffe de cornée.	19
Tableau 2 : Sondes et amorces utilisées pour les PCR.....	52
Tableau 3 : Résultats de la quantification par spectrophotométrie de l'ADNg extrait à partir de la sclère par différentes méthodes	53
Tableau 4 : Résultats de la quantification du gène de l'albumine dans l'ADNg extrait à partir de la sclère par différentes méthodes.....	54
Tableau 5 : Exemples de résultats des PCR HSV sur les fragments 3H-9H.....	57
Tableau 6 : Résultats des PCR sur les fragments 1H-7H.....	58
Tableau 7 : Récapitulatif des prélèvements positifs pour HSV (nombre de copies par mg de tissu ou par µL de liquide)	59
Tableau 8 : Positivité pour l'herpès en fonction du site de prélèvement.....	64
Figure 1 : Vue générale du globe oculaire, coupe sagittale	15
Figure 2 : Schématisation de l'innervation du globe par les nerfs ciliaires longs ²	16
Figure 3 : Kératoplastie	20
Figure 4 : récurrence d'un herpès sur une greffe de cornée.	21
Figure 5 : Schématisation du virus HSV.....	29
Figure 6 : Kératite herpétique	33
Figure 7 : Principe de l'amplification lors de la réaction de PCR	39
Figure 8 : Suivi en temps réel d'une réaction de PCR.....	40
Figure 9 : Exemple de résultat obtenu à l'issue d'une expérimentation de PCR en temps réel.....	43
Figure 10 : Rotor Gene	44
Figure 11 : Schéma de la découpe sclérale en 6 fragments	45

BIBLIOGRAPHIE

1. Renard G, Dighiero P, Ellies P, Trong TT. Anatomie de la cornée. La cornée. Paris: Elsevier, 2001.
2. Klyce, Beuerman. Structure and function of the cornea. In: H.E.Kaufman, B.A.Barron, M.B.McDonald, S.R.Waltman, eds. The Cornea.
3. Hullo A. Anatomie de la sclérotique. Encyclopédie Médico-chirurgicale 2001;21-003-A-30:36p.
4. Borderie V, Laroche L, Delbosc B, Montard M. Kératoplastie transfixiante. Encyclopédie Médico-chirurgicale 1999;21-206-A-10.
5. Borderie VM, Laroche L. Microbiologic study of organ-cultured donor corneas. Transplantation 1998;66(1):120-3.
6. Wilhelmus KR, Stulting RD, Sugar J, Khan MM. Primary corneal graft failure. A national reporting system. Medical Advisory Board of the Eye Bank Association of America. Arch Ophthalmol 1995;113(12):1497-502.
7. Cockerham GC, Krafft AE, McLean IW. Herpes simplex virus in primary graft failure. Arch Ophthalmol 1997;115(5):586-9.
8. Biswas S, Suresh P, Bonshek RE, et al. Graft failure in human donor corneas due to transmission of herpes simplex virus. Br J Ophthalmol 2000;84(7):701-5.
9. De Kesel RJ, Koppen C, Ieven M, Zeyen T. Primary graft failure caused by herpes simplex virus type 1. Cornea 2001;20(2):187-90.
10. Cockerham GC, Bijwaard K, Sheng ZM, et al. Primary graft failure : a clinicopathologic and molecular analysis. Ophthalmology 2000;107(11):2083-90;discussion 90-1.
11. Remeijer L, Maertzdorf J, Doornenbal P, et al. Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation. Lancet 2001;357(9254):442.
12. Borderie V, Delbosc B, Fialaire-Legendre A, Ophtalmologie LLL. Prélèvement et conservation des greffons cornéens. Encyclopédie Médico-chirurgicale 2007.
13. Pels E, Nuyts RM, Breebaart AC, Hartmann C. Rapid quantitative assays for corneal endothelial cell viability in vitro. Cornea 1993;12(4):289-94.
14. Pels E, Schuchard Y. Organ culture in the Netherlands. Corneal surgery. Theory, technique and tissue. St Louis: CV Mosby: Brightbill FS, 1993.
15. Huraux JM. Généralités sur les Herpesviridae. In: Huraux JM, Nicolas JC, Agut H, Peigue-Lafeuille H, eds. Virologie médicale. Paris: Estem, 2003.
16. Huraux JM, Rozenberg F. Herpes simplex virus. In: Huraux JM, Nicolas JC, Agut H, Peigue-Lafeuille H, eds. Virologie médicale. Paris: Estem, 2003.

17. Laboratoire PC. Herpes simplex virus et varicelle zona. In: Guide des analyses spécialisées, 5ème édition: Elsevier, 2007.
18. Bourcier T. Herpès cornéen. Infections cornéennes: Elsevier, 2004.
19. Tullo A. Pathogenesis and management of herpes simplex virus keratitis. *Eye* 2003;17(8):919-22.
20. Cockerham G. Primary graft failure caused by herpes simplex virus type 1. *Cornea* 2001;20(7):774-5.
21. Fillet AM, Sadzot-Delvaux C, Rentier B. Virus varicelle zona. In: Huraux JM, Nicolas JC, Agut H, Peigue-Lafeuille H, eds. *Virologie médicale*. Paris: Estem, 2003.
22. Bourcier T. Zona ophtalmique. Infections cornéennes: Elsevier, 2004.
23. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
24. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11(9):1026-30.
25. Cleator GM, Klapper PE, Dennett C, et al. Corneal donor infection by herpes simplex virus: herpes simplex virus DNA in donor corneas. *Cornea* 1994;13(4):294-304.
26. Tullo AB, Easty DL, Shimeld C, et al. Isolation of herpes simplex virus from corneal discs of patients with chronic stromal keratitis. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1985;104 (Pt 2):159-65.
27. Zheng X, Marquart ME, Loustch JM, et al. HSV-1 migration in latently infected and naive rabbits after penetrating keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(11):2490-7.
28. Robert PY, Adenis JP, Denis F, et al. Herpes simplex virus DNA in corneal transplants: prospective study of 38 recipients. *J Med Virol* 2003;71(1):69-74.
29. Weidmann M, Meyer-Konig U, Hufert FT. Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1565-8.
30. Parker SP, Quinlivan M, Taha Y, Breuer J. Genotyping of varicella-zoster virus and the discrimination of Oka vaccine strains by TaqMan real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2006;44(11):3911-4.
31. Borderie VM, Meritet JF, Chaumeil C, et al. Culture-proven herpetic keratitis after penetrating keratoplasty in patients with no previous history of herpes disease. *Cornea* 2004;23(2):118-24.
32. Robert PY, Traccard I, Adenis JP, et al. Multiplex detection of herpesviruses in tear fluid using the "stair primers" PCR method: prospective study of 93 patients. *J Med Virol* 2002;66(4):506-11.
33. Robert PY, Liekfeld A, Adenis JP, et al. Patterns of herpes simplex virus distribution within corneal tissue.
34. Robert PY, Denis F, Adenis JP, Ranger-Rogez S. Localisation du virus après infection de cornées *in vitro* par HSV1 ou HSV2. *Virologie* 2003;7(n°2):141-2.

35. Robert PY, Liekfeld A, Metzner S, et al. Specific antibody production in herpes keratitis: intraocular inflammation and corneal neovascularisation as predicting factors. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244(2):210-5.
36. Robert PY, Liekfeld A, Ranger-Rogez S, et al. [Antiviral therapy adjustment in corneal recipients using antibody testing in the aqueous humor]. *J Fr Ophtalmol* 2003;26(4):350-4.
37. Shimomura Y, Deai T, Fukuda M, et al. Corneal buttons obtained from patients with HSK harbor high copy numbers of the HSV genome. *Cornea* 2007;26(2):190-3.
38. Robert PY, Camezind P, Drouet M, et al. Internal and external contamination of donor corneas before in situ excision: bacterial risk factors in 93 donors. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;240(4):265-70.
39. Tullo AB, Coupes D, Klapper P, et al. Analysis of glycoproteins expressed by isolates of herpes simplex virus causing different forms of keratitis in man. *Curr Eye Res* 1987;6(1):33-8.
40. Zheng X, Silverman RH, Zhou A, et al. Increased severity of HSV-1 keratitis and mortality in mice lacking the 2-5A-dependent RNase L gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(1):120-6.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	13
I. INTRODUCTION	14
II. GENERALITES	15
1. Rappels d'anatomie :.....	15
a. Anatomie de la cornée:.....	15
b. Anatomie de la sclère:.....	17
2. La greffe de cornée :.....	18
a. Quelques chiffres:.....	18
b. Indications:.....	18
c. Technique opératoire:.....	20
d. Traitement post-opératoire:.....	20
e. Complications:.....	21
3. Le prélèvement de cornée	22
a. Cadre législatif des dons de cornée.....	22
b. Sélection des donneurs:.....	22
c. Prélèvement des greffons:.....	23
d. Transport et préparation des greffons cornéens en vue d'une conservation.....	23
e. Méthodes de conservation des greffons cornéens:.....	25
f. Contrôles de stérilité du greffon.....	26
g. Cession du greffon en vue d'une greffe:.....	26
4. Généralités sur les <i>Herpesviridae</i> :.....	26
a. Réplication des <i>Herpesviridae</i> :.....	27
b. Latence:.....	27
c. Expression clinique des infections à <i>Herpesviridae</i> :.....	28
d. Equilibre Hôte-Virus:.....	28

5. HSV :	28
a. Structure:	29
b. Multiplication du virus:	30
c. Infection latente:	30
d. Epidémiologie:	31
e. Pouvoir pathogène:	31
f. Diagnostic biologique:	33
6. VZV	34
a. Structure:	34
b. Multiplication du virus:	35
c. Latence:	35
d. Epidémiologie:	35
e. Pouvoir pathogène:	36
f. Diagnostic biologique:	37
7. La PCR	38
a. PCR classique en point final:	38
b. PCR en temps réel:	39
c. Principes de quantification:	41
d. Appareils utilisés en PCR Temps-réel:	43
III. NOTRE ETUDE	44
1. Introduction - Buts de l'étude:	44
2. Matériels et méthodes :	45
a. Patients inclus:	45
b. Déroulement du prélèvement:	45
c. Patients exclus:	46
d. Suivi des patients greffés:	46
e. Extraction de l'ADN à partir des différents prélèvements:	46
f. PCR réalisées sur les ADN extraits:	49

3. Résultats :	52
a. Population étudiée:	52
b. Extraction de l'ADN à partir de la sclère:	54
c. Résultats des PCR:	55
d. Suivi des patients greffés:	60
4. Discussion :	60
IV. CONCLUSION	67
ANNEXE	68
TABLE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	72
BIBLIOGRAPHIE	73
TABLE DES MATIERES	76
SERMENT D'HIPPOCRATE	79

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 3138

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

**TITRE : RECHERCHE DE L'HERPES CHEZ LES DONNEURS DE CORNEE PAR
PCR TEMPS-REEL SUR PRELEVEMENT SCLERAL**

RESUME :

Nous savons que le virus de l'herpès peut être retrouvé dans la cornée de patient longtemps après un épisode infectieux et que la transmission du virus HSV d'un donneur vers un receveur est possible via la greffe de cornée sans toutefois pouvoir dépister les cornées à risque sans destruction de celles-ci. Nous savons également que le virus est présent à l'état latent au niveau du ganglion de Gasser pour ce qui est de la région oculaire. Notre étude a pour but d'étudier la faisabilité d'un dépistage systématique des donneurs cornéens pour les virus HSV-1, HSV-2 et VZV. Notre étude a démontré la présence d'ADN HSV dans la sclère pour 4,7% des donneurs dont les cornées ont été utilisées pour la greffe dans la moitié des cas. Ces cornées greffées n'ont pas entraîné de rejet primaire chez le receveur. Un dépistage systématique est donc possible mais notre étude présente un nombre insuffisant de cas pour en définir les intérêts et les modalités exactes.

**TITLE: DETECTION OF HSV BY REAL TIME PCR ON SCLERAL'S CORNEAL
DONNOR**

SUMMARY:

In order to secure corneal transplantation, we try to ameliorate suspect donors exclusion. The presence of virus in his latency form in the cornea is an hypothesis which deserves to be confirmed. During virus latency, viral particles can be present the long of nerves between ganglion and the target organ. As those particles can be detected in donor's corneal tissue, it seems likely they can be detected in scleral tissue near the nerves endings. The aim of our study is to test presence of viral particles of HSV and VZV in the donor's sclera, using real time PCR. The patients who received the graft had a regular follow up in order to check the tolerance of the graft and the eventual presence of viral infection. Our results show that HSV DNA was found in 4,7% of the donors'sclera. A half of these corneas have been used in graft. No primary graft failure occurs in these cases. We can say that screening for HSV in sclera is possible but our study is not large enough to know real interest and modalities of such a screening.

MOTS-CLES : HSV, Kératoplastie, PCR Temps-réel, Dépistage

KEY WORDS: HSV, Corneal Graft, Real Time PCR, Screening

OPHTALMOLOGIE

Service d'Ophtalmologie du CHU de Limoges, Service de Virologie
2 Avenue Martin Luther King. 87042 LIMOGES Cedex