

## Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

### Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 14 octobre 2022

Par

HABOUB Marwan

Outils diagnostics pour les infections à *alpha*herpèsvirus –  
Mise au point d'une méthode de détection de synthèse intrathécale  
d'IgG anti-HSV et anti-VZV

Thèse dirigée par Sébastien HANTZ

Examineurs :

Me. Pr Sylvie Rogez, PU-PH, laboratoire de virologie, CHU Limoges, Présidente

Me. Pr Sophie Alain, PU-PH, laboratoire de virologie, CHU Limoges, Juge

Me Dr Jasmine Chauzeix, MCU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU Limoges, Juge

M. Pr Sébastien Hantz, PU-PH, laboratoire de virologie, CHU Limoges, Directeur





**Faculté de Pharmacie**

Année 2022

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 14 octobre 2022

Par HABOUB Marwan

**Outils diagnostiques pour les infections à *alphaherpèsvirus* –  
Mise au point d'une méthode de détection de synthèse intrathécale  
d'IgG anti-HSV et anti-VZV**

Thèse dirigée par Sébastien HANTZ

Examineurs :

Me. Pr Sylvie Rogez, PU-PH, laboratoire de virologie, CHU Limoges, Présidente

Me. Pr Sophie Alain, PU-PH, laboratoire de virologie, CHU Limoges, Juge

Me Dr Jasmine Chauzeix, MCU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU Limoges, Juge

M. Pr Sébastien Hantz, PU-PH, laboratoire de virologie, CHU Limoges, Directeur



## Liste des enseignants

---

Le 1<sup>er</sup> septembre 2021

### Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

### Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

### Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

### Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

### Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques



**Mme VIANA Marylène** Pharmacie galénique

**Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires**

**M. BARRAUD Olivier (\*)** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme. CHAUZEIX Jasmine** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**M. JOST Jérémie** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**Maitres de Conférences des Universités – Universitaires**

**M. BASLY Jean-Philippe (\*)** Chimie analytique et bromatologie

**Mme BEAUBRUN-GIRY Karine** Pharmacie galénique

**Mme BÉGAUD Gaëlle** Chimie analytique et bromatologie

**M. BILLET Fabrice** Physiologie

**M. CALLISTE Claude** Biophysique et mathématiques

**M. CHEMIN Guillaume** Biochimie et biologie moléculaire

**Mme CLÉDAT Dominique** Chimie analytique et bromatologie

**M. COMBY Francis** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**Mme COOK-MOREAU Jeanne** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme DELEBASSÉE Sylvie** Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

**Mme DEMIOT Claire-Elise (\*)** Pharmacologie

**M. FABRE Gabin** Biophysique et mathématiques

**M. FROISSARD Didier** Botanique et cryptogamie

**Mme JAMBUT Anne-Catherine (\*)** Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

**M. LABROUSSE Pascal (\*)** Botanique et cryptogamie

**Mme LAVERDET Betty** Pharmacie galénique

<b>M. LAWSON Roland</b>	Pharmacologie
<b>M. LÉGER David</b>	Biochimie et biologie moléculaire
<b>Mme MARRE-FOURNIER Françoise</b>	Biochimie et biologie moléculaire
<b>M. MERCIER Aurélien</b>	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
<b>Mme MILLOT Marion (*)</b>	Pharmacognosie
<b>Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia</b>	Pharmacie galénique
<b>Mme POUGET Christelle (*)</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
<b>M. TOUBLET François-Xavier</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
<b>M. VIGNOLES Philippe (*)</b>	Biophysique et mathématiques

**(\*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)**

**Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche**

**Mme AUDITEAU Émilie**                      Épidémiologie, statistique, santé publique

**Enseignants d'anglais**

**M. HEGARTY Andrew**                      Chargé de cours

**Mme VERCELLIN Karen**                      Professeur certifié

## Remerciements

---

A **Madame le Professeur Sylvie ROGEZ**, vous me faites l'honneur de juger et de présider ce travail de thèse. Merci de m'avoir soutenu dans mon choix de carrière de microbiologiste polyvalent. Veuillez recevoir l'expression de tout mon respect et de ma profonde reconnaissance.

A **Madame le Professeur Sophie ALAIN**, je vous remercie de faire partie de ce jury de thèse ainsi que des connaissances de virologie que vous m'avez transmises. Soyez assuré de mon éternelle gratitude.

A **Madame le Maître de Conférences Jasmine CHAUZEIX**, je vous remercie de faire partie de ce jury de thèse ainsi que pour vos enseignements en hématologie lors de mon premier semestre. Recevez mes sincères remerciements.

A **Monsieur le Professeur Sébastien HANTZ**, directeur de ce travail de thèse, je vous remercie de votre encadrement, de votre enthousiasme dans nos recherches, de l'attrait pour la virologie que vous m'avez transmis, et du temps que vous m'avez accordé pour ce sujet de thèse très intéressant.

Je profite de cette thèse pour remercier tous mes proches,

A mes meilleurs potes d'Angers city, plus belle ville de France au passage, on se connaît depuis le lycée et on rigole toujours autant, à l'Ardèche Team, mes gars surs : Malo le cuisto toujours chaud et motivé (Mon meilleur acolyte de bredouille), Théophile dit philoté le philosophe de la bande, Théo-sama le grand (Hannns), Milouche la cartouche le sanguin, Victor le keunotor ou vickou (aaah les « Femmes »). Et à fouctal avec qui j'ai passé de sacrées soirées pendant toutes ces années.

A tous mes potes de la Fac de Pharma, à toutes ces années inoubliables, de cours/BU et de chouffe : La fine équipe pour toujours : le Minette (« toi j'te kiff, depuis la P2 »), Scott from Scotland, Antonindourich, Benoît la bûche, Louis cailloux (j'espère vraiment que tu n'as plus ton bonnet rose), Dabafour (la rilette échalotes <3), Loumacq (et nos parties de noobies sur fortnite, toutes nos ref kaamelott et j'en passe), Mallolo, Duriez et tes blagues salaces, Vico le prepuber beagoss, Oliv' et Maître Grims. Nos années de fac me manqueront (on se fait un Berthom ? 18h45 pour chopper une place et happy à 19H ?).

A tous mes co-internes si j'ai passé d'aussi bons semestres c'est grâce à vous : Cassandra, Rémus, Benji, Sarah M, Chacha (si j'ai adoré mon semestre d'hémato c'est grâce à toi !), Fifamè, Nico, Victor, Alix, Marie-Sarah, Emiliano, Emilie, Caroline, Etienne, Robin, Maximax et Max le PMiste et tous ceux que j'ai oublié (et aux derniers arrivés Ines Lucas ...).

A toutes les techniciennes que j'ai rencontré durant tous mes stages : En hématologie Hilal et Andrea, en parasitologie Hélène Annabelle Mick et Micky Vicky Valérie, en BVH la team turquoise (Emilie Delph Aurel Karine, Marie) corail (Gaelle dit BiBi, Morgane, Mymy, Samsam, Amélie) pourpre (Emilie F encore désolé pour ce ballon de foot dans la cuisse ce n'était pas voulu haha, Emilie P, Marion ...). Aux filles de sérologie pour avoir subi quelques bêtises sur vos automates (Aurore Chacha Pauline Marion et Jess) et j'en oublie certainement beaucoup, merci à toutes (et à tous pour samsam le seul mec) de m'avoir formé et appris autant.

Mes infectiologues préférées : Cicy, Léo et Camouille (la gargouille), y'a pas de classement promis vous êtes toutes trop cool, j'espère qu'on travaillera ensemble un jour !!

Marie-Fleur et le super stage de Parasitologie que j'ai passé avec toi, merci de m'avoir donné la passion et l'attrait pour les parasites et les champignons, et surtout toutes les connaissances que tu m'as transmises, un grand merci !

A tous les virologues, bactériologistes, parasitologues que j'ai croisé qui m'ont beaucoup appris (Sylvain, Fabien, Nadia, Aurélie, Christian, Olivier, Marie-Cécile, Jérôme, Marine, Marie-Laure).

Les belles rencontres que j'ai faites sur Limoges : Mes coloc's coup de cœur bien-sûr : Adrien (Nachos) et Ernesto, sans vous les gars Limoges n'aurait jamais eu la même saveur, on a vécu tellement de choses que c'est impossible de tout écrire ici mais je vous remercie d'être là, et pour toutes ces années. A Wass qui fait la bringue comme personne, tu es la preuve qu'on peut être fêtard drôle et fort en stage, ça c'est cool ! Tu m'as appris pleins de choses que ce soit pendant mon premier semestre d'hémato et ou encore en bactériologie ! Sarah N et Max, le semestre de biochimie et à nos jus. A Thibaut (Le Tib) tu es la relève j'espère que tu sauras guider tous ces jeunes futures biologistes dans la bonne direction (le krill le lundi soir). Mes copains de l'internat : Maître Wing le grimpeur aux 25 tractions, Saouss, michou, Raph, Lise, Pr Laburthe, Bellong et Yébou (Cyril et Caro je vous adore), Florian, Benoît et Floflo, la petite

Léa et nos soirées à la pinks ou temple trop de souvenirs, et encore une fois tous ceux que j'oublie.

Et enfin, ma famille sans qui je ne serai rien, et qui sait me ramener à la réalité quand il le faut : ma sœur Leïla, tu es la meilleure des sœurs qu'on puisse rêver d'avoir, toujours au petit soin, toujours à 200% qui sait gérer 30 choses à la fois. A mon titi, Kévin tu me manques beaucoup j'adore passer mes weekends avec toi et traîner ensemble juste tous les 2 quand je suis de passage à Angers.

A toi Célestine, mon amoureuse, qui a su supporter cet internat et tous ces changements, merci d'être à mes côtés, de toujours m'épauler et d'être là quand il le faut. Je t'aime toujours

Et bien-sûr toi maman, je te dédie toutes ces années d'étude, on ne te le dit jamais assez, mais bravo d'avoir élevé 3 enfants toute seule, c'est grâce toi si on est tous les 3 arrivés aussi loin. Je sais que mes nouvelles peuvent parfois se faire rares mais sache que je pense toujours à toi.

Marwan,

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Liste des abréviations

---

ADN : acide désoxyribonucléique

AI : Antibody index

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

BHM : Barrière hémato-méningée

CLIA : Chimiluminescence immuno-assay

CMV : Cytomégalovirus

EBNA : Epstein Barr nuclear antigen

EBV : Epstein-barr virus

EEG : Electroencéphalogramme

EH : Encéphalite herpétique

FLAIR : Fluid attenuated inversion recovery

gG1 : Glycoprotéines de type 1

gG2 : Glycoprotéines de type 2

HSV : Herpes simplex virus

IEF : Isoélectrofocalisation

IgG : Immunoglobulines de type G

IRM : Imagerie à résonance magnétique

IV : Intraveineux

LCS : Liquide cérébro-spinal

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Polymerase chain reaction

QA<sub>lb</sub> Théo : Quotient théorique de l'albumine

Q<sub>alb</sub> : Quotient de l'albumine

Q<sub>IgG</sub> : Quotient des IgG

Q<sub>IgGspé</sub> : Quotient spécifique des IgG spécifique d'un virus

Q<sub>lim</sub> : Quotient limite des IgG

RLU : Relative light unit

Se : Sensibilité

SEP : Sclérose en plaque

SNC : Système nerveux central

Sp : Spécificité

SPILF : Société de pathologie infectieuse de langue française

TORCH : Toxoplasma Rubella  
Cytomégalovirus Herpes virus

VCA : Viral capsid antigen

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

ZO : Zona ophtalmique

## Table des matières

---

Liste des enseignants.....	4
Remerciements.....	7
Droits d'auteurs.....	10
Liste des abréviations.....	11
Table des matières.....	12
Table des illustrations.....	14
Table des tableaux.....	16
Introduction.....	17
Généralités.....	18
1.1. Herpèsvirus.....	18
1.1.1. Introduction aux <i>Herpesviridae</i> .....	18
1.1.1.1. Structure générale des <i>Herpesviridae</i> .....	19
1.1.1.2. Physiopathologie commune aux <i>Herpesviridae</i> :.....	20
1.1.2. <i>Alphaherpesvirinae</i> : Herpès simplex virus et Varicelle-zona virus.....	20
1.1.2.1. Historique.....	21
1.1.2.2. Structure.....	22
1.1.2.3. Multiplication du virus.....	23
1.1.2.4. Épidémiologie de l'HSV et du VZV.....	25
1.1.2.5. Pouvoir pathogène.....	26
1.1.2.6. Traitements.....	35
1.1.2.7. Prévention.....	37
1.2. Outils diagnostics dans les infections à <i>alphaherpèsvirus</i> .....	38
1.2.1. Isolement du virus en culture cellulaire.....	38
1.2.2. Détection de l'ADN viral.....	39
1.2.3. Diagnostic sérologique.....	39
1.2.4. Synthèse intrathécale.....	44
Objectifs de l'étude expérimentale.....	54
Matériel et méthodes.....	55
2.1. Evaluation de trousse automatisées permettant la détection des anticorps spécifiques IgG de type HSV-1 et HSV-2.....	55
2.1.1. Echantillons de l'étude.....	55
2.1.2. Description des trousse utilisées.....	55
2.1.2.1. HSV-1/2 IgG DiaSorin®.....	55
2.1.2.2. HSV-1 IgG et HSV-2 IgG DiaSorin®.....	55
2.1.2.3. HSV-1 IgG et HSV-2 IgG Abbott®.....	56
2.1.2.4. Immunoblot HSV.....	56
3.1.1. Statistiques.....	57
3.2. Mise en place d'une technique de détection de synthèse intrathécale alphaherpèsvirus (HSV et VZV).....	58
3.2.1. Contexte.....	58
3.2.2. Techniques utilisées.....	58
3.2.2.1. Dosages des anticorps IgG anti-HSV et anti-VZV.....	58
3.2.2.2. Dosage de l'albumine.....	59



3.2.2.3. Dosage des IgG totales.....	59
3.2.2.4. Isoélectrofocalisation.....	59
3.2.2.5. Détection de l'ADN viral par PCR.....	59
3.2.3. Détermination du bruit de fond .....	61
3.2.4. Détermination de l'équation de la droite pour le dosage des anticorps .....	61
3.2.5. Dilution successive de sérums dans du LCS .....	63
3.2.5.1. Dilution des IgG VZV dans une matrice LCS.....	63
3.2.5.2. Dilution des IgG HSV dans une matrice LCS .....	64
3.2.6. Cohorte de LCS – Sérums appariés .....	64
Résultats .....	65
4.1. Evaluation de 2 trousse automatisées permettant la détection des anticorps IgG spécifiques de type HSV-1 et HSV-2 .....	65
4.1.1. Résultats des trousse de dosage d'IgG anti-HSV-1 .....	65
4.1.2. Résultats des trousse de dosage d'IgG anti-HSV-2 .....	67
4.1.3. Résultat trousse HSV 1-2 totaux.....	69
4.2. Mise en place d'une technique détection de synthèse intrathécale à alphaherpèsvirus (HSV et VZV) .....	69
4.2.1. Analyse du bruit de fond en techniques HSV-G et VZV-G .....	69
4.2.2. Dilution de sérums positifs en VZV-G et HSV-G dans du LCS.....	70
4.2.2.1. Dilution d'IgG anti-VZV.....	70
4.2.2.2. Dilution d'IgG anti-HSV .....	72
4.2.2.3. Détermination de l'équation de la droite pour la technique VZV-G .....	73
4.2.2.4. Détermination de l'équation de la droite pour la technique HSV-G .....	75
4.2.3. Détermination de l'Antibody Index (AI) d'une cohorte de LCS – Sérums appariés .....	77
4.2.3.1. Description de la population .....	77
4.2.3.2. AI VZV .....	77
4.2.3.3. AI HSV .....	80
4.2.3.4. Corrélation entre l'antibody index et l'intégrité de la barrière hémato- encéphalique .....	83
4.2.3.5. Isoélectrofocalisation et index anticorps .....	85
Discussions .....	86
5.1. Évaluation de 2 trousse automatisées permettant la détection des anticorps IgG spécifiques de type HSV-1 et HSV-2 .....	86
5.2. Mise en place d'une technique détection de synthèse intrathécale alphaherpèsvirus (HSV et VZV) .....	88
Conclusion .....	94
Références bibliographiques .....	95
Annexes .....	100
Annexe 1. Tableau caractéristique des 30 échantillons de LCS pour étude du bruit de fond .....	101
Annexe 2. Tableau récapitulatif des caractéristiques de tous les échantillons discordants .....	102
Serment De Galien.....	104

## Table des illustrations

Figure 1 Taxonomie de la famille des <i>Herpesviridae</i> , telle que déterminée par le Comité international de taxonomie des virus et basée sur l'analyse phylogénétique de whole-genome (2).	18
Figure 2 Structure schématique des <i>Herpesviridae</i>	19
Figure 3 : Photos en microscopie électronique. A gauche, virus de l'herpès simplex de type 1,	23
Figure 4 Cycle de réplication du HSV-1 dans les cellules épithéliales. (12)	24
Figure 5 Varicelle d'un enfant de 1 an. Eléments cutanés d'âge différent, en A : une croûte en cours de cicatrisation, en B une macule érythémateuse. Centre hospitalier universitaire de Limoges ; Chirurgie pédiatrique ; E. Siret (Interne).	27
Figure 6 Méningo-encéphalite herpétique sévère avec lésions temporales bilatérales asymétriques, prédominant à droite et effet de masse. A et B : Imagerie par IRM coupe transversale, FLAIR ( <i>Fluid attenuated inversion recovery</i> ); C : Coupe sagittale, T1	29
Figure 7 Démarche diagnostic et thérapeutique en fonction de la PCR HSV/VZV sur liquide cébro-spinal	31
Figure 8 A gauche : Kératite herpétique (épithéliale dendritique) (photo avec filtre bleu après instillation de fluorescéine) A droite : Kératite stromale avec opacification cornéenne	32
Figure 9 Patient atteint d'un zona ophtalmique typique, atteinte du nerf trijumeau (5 <sup>ème</sup> paire de nerf crânien)	33
Figure 10 Effet cytopathogène de HSV-1 en culture cellulaire (cellules Vero), à gauche les cellules Vero non infectées, à droite les cellules Vero ballonnées suite à l'infection par HSV-1	38
Figure 11 Cinétique classique d'apparition des anticorps anti- <i>alphaherpèsvirus</i> suite à la primo-infection.	39
Figure 12 Principe de la chimiluminescence appliquée à la détection d'anticorps IgG spécifiques : une particule magnétique est recouverte de l'antigène d'intérêt (« coater »), les particules magnétiques « coatées » sont mise en présence de l'échantillon, après incubation un anticorps anti-IgG humain fixé à l'isoluminol est ajouté, la réaction est déclenché par l'ajout du « starter », puis la luminescence en RLU est mesurée	42
Figure 13 Production et déplacement du LCS	45
Figure 14 Évolution du QIgG de 361 patients en fonction du Qalb au cours de pathologies entraînant des altérations diverses de la barrière sang/LCS, mais pas de synthèse intrathécale (37)	48
Figure 15 Evolution du QIgA et du QIgM en fonction du Qalb pour les mêmes patients	48
Figure 16 Les différentes zones du diagramme de Reiber : 1 : zone des valeurs normales ; 2 : altération de la barrière sans synthèse intrathécale ; 3 : synthèse intrathécale sans altération de la barrière ; 4 : synthèse intrathécale et altération de la barrière ; 5 : zone des résultats physiologiquement impossible. La courbe centrale représente le Qlim, au-dessus, il existe une synthèse intrathécale.	50

Figure 17 Interprétation de l'immunoblot HSV ViroTech Diagnostics ® .....	56
Figure 18 Degrés d'accord et valeur Kappa proposé par Landis et Koch.....	57
Figure 19 Exemples de PCR du kits RealStar <i>alphaherpesvirus</i> .....	60
Figure 20 Étalonnage et courbe utilisé par l'analyseur LiaisonXL® pour le dosage des IgG anti-HSV. Chacun des deux étalons est mesuré 3 fois, la moyenne des 3 valeurs est utilisée. ....	62
Figure 21 Étalonnage et courbe utilisé par l'analyseur LiaisonXL® pour le dosage des IgG anti-VZV .....	62
Figure 22 Technique de dilution en cascade d'un sérum du 1/2 au 64 <sup>ème</sup> pour un volume total de 200 µL.....	63
Figure 23 Dispersion des 30 LCS en fonction du RLU et de la technique HSV-G ou VZV-G	69
Figure 24 Représentation graphique du signal lumineux mesuré par l'automate (RLU) en fonction de la dilution de 3 sérums de concentrations différentes en VZV-G .....	70
Figure 25 Représentation graphique du signal lumineux mesuré par l'automate (RLU) en fonction de la dilution de 3 sérums de concentrations différentes en HSV-G .....	72
Figure 26 Représentation graphique de la concentration en IgG anti-VZV (x) en fonction du RLU (y) (n=205) .....	73
Figure 27 Représentation graphique du Log (concentration en IgG anti-VZV) (x) en fonction du Log(RLU) (y).....	74
Figure 28 Représentation graphique de la concentration en IgG anti-HSV (x) en fonction du RLU (y) n=84.....	75
Figure 29 Représentation graphique du Log (concentration en IgG anti-HSV) (x) en fonction du Log(RLU) (y).....	76
Figure 30 Tableau récapitulatif des 10 couples LCS-sérum dont l'AI VZV est positif (>1,4). (POS : Positif ; NEG : Négatif ; Absence : absence de bande supplémentaire entre le LCS et le sérum en isoélectrofocalisation) .....	78
Figure 31 Tableau récapitulatif des 5 couples LCS-sérum dont l'AI HSV est positif (>1,4). (NEG : Négatif Absence : absence de bande supplémentaire entre le LCS et le sérum) .....	81
Figure 32 Valeur de l'Antibody index VZV en fonction du RQalb qui représente l'atteinte de la barrière hémato-méningée .....	83
Figure 33 Valeur de l'Antibody index HSV en fonction du RQalb qui représente l'atteinte de la barrière hémato-méningée .....	84
Figure 34 Cinétique de l'ADN et des anticorps anti-HSV dans le liquide cérébro-spinal. ....	91
Figure 35 Algorithme suggéré pour une demande de SIT HSV-G et VZV-G. En cas de valeur rendu inférieur au seuil par l'automate mais supérieur à 10 000 RLU, utilisé l'équation de la droite de .....	93

## Table des tableaux

---

Tableau 1 Sensibilités, spécificités et efficacités des différentes formules (38).....	53
Tableau 2 Les 3 sérums positifs en IgG VZV, un seul est positif en IgG HSV.....	63
Tableau 3 Les 3 sérums positifs en IgG HSV, un seul est positif en IgG VZV.....	64
Tableau 4 Volumes de LCS nécessaire à la réalisation d'une synthèse intrathécale .....	64
Tableau 5 Tableau de contingence entre les techniques HSV-1 Abbott® et DiaSorin®.....	65
Tableau 6 Caractéristiques des 8 sérums discordants entre les 2 techniques IgG anti-HSV-1. .....	65
Tableau 7 Résultats de l'immunoblot des 8 échantillons discordants en HSV-1. (gG1 et gG2 : Glycoprotéines spécifiques respectivement des herpès simplex de type 1 et 2).....	66
Tableau 8 Tableaux de calcul des sensibilité (Se) et spécificité (Sp) pour les trousse IgG HSV1. (VP : vrai positif ; FN : faux négatif ; VN : vrai négatif ; FP : faux positif).....	66
Tableau 9 Tableau de contingence entre les techniques HSV-2 Abbott® et DiaSorin®.....	67
Tableau 10 Caractéristiques des 14 sérums discordants entre les 2 techniques IgG anti- HSV-2. ....	67
Tableau 11 Résultats des 14 sérums discordants en immunoblot (gG 1 et gG2 : glycoprotéines spécifiques respectivement des virus de l'herpès simplex de type 1 et 2).....	68
Tableau 12 Tableaux de calcul des sensibilité (Se) et spécificité (Sp) (VP : vrai positif ; FN : faux négatif ; VN : vrai négatif ; FP : faux positif). ....	68
Tableau 13 Dilutions de 3 sérums positifs en VZV-G (fort, moyen et faible) dans du LCS ....	71
Tableau 14 Dilutions de 3 sérums positifs (fort, moyen et faible) en HSV-G dans du LCS....	72

## Introduction

---

Les infections par les virus appartenant au genre des *alpha*herpèsvirus sont extrêmement fréquentes dans l'espèce humaine avec une distribution mondiale. Cette sous-famille des *Herpesviridae* comprend les virus de l'herpès simplex (HSV) de type 1 et 2, ainsi que le virus de la varicelle et du zona (VZV). Leur séroprévalence varie de 15 à plus de 90% dans la population générale en fonction du virus et de la population considérée. Ils sont responsables d'atteintes graves chez l'immunocompétent (encéphalites, pneumopathies etc.), chez la femme enceinte (atteintes néonatales) et l'immunodéprimé. Il est donc indispensable que les laboratoires disposent d'outils fiables et performants dans le diagnostic des atteintes à herpèsvirus.

Les encéphalites infectieuses sont des affections rares mais graves dont la cause est encore à l'heure actuelle souvent inconnue. Une étude épidémiologique française de 2007 incluant 253 cas d'encéphalites, dont 131 avec une étiologie déterminée, montre que le virus de l'herpès simplex (HSV) est le principal agent responsable d'encéphalite infectieuse (42%) suivi du varicelle-zona virus (VZV) (15%) (1). Le « gold-standard » pour le diagnostic de l'encéphalite infectieuse à HSV ou VZV est la PCR (*polymerase chain reaction*), mais elle peut parfois être mise à défaut et se révéler faussement négative malgré un tableau clinique et/ou radiologique en faveur d'une encéphalite herpétique ou varicelleuse.

Deux travaux distincts ont été menés dans ce travail. En premier lieu nous avons comparé 2 trousse commerciales différentes pour la détection automatisée d'immunoglobulines de type G (IgG) anti-HSV-1, ainsi que 2 trousse des mêmes fabricants, détectant les IgG anti-HSV-2.

Puis dans un second temps nous avons développé et validé une méthode simple et automatisée pour la détermination de la production intrathécale d'anticorps vis-à-vis des *alpha*herpèsvirus, (virus de l'herpès simplex (HSV) de type 1 et 2, et virus varicelle-zona), utile dans le diagnostic étiologique d'encéphalites herpétiques ou varicelleuses en cas de PCR négative.

# Généralités

## 1.1. Herpèsvirus

### 1.1.1. Introduction aux *Herpesviridae*

L'ordre des *Herpesvirales* compte 3 familles de virus caractérisées par le spectre d'hôtes qu'ils infectent. Les *Herpesviridae* pour les mammifères et les oiseaux, les *Alloherpesviridae* chez les poissons et amphibiens, et enfin les *Malacoherpesviridae* chez les mollusques. Il existe un phénomène de cospéciation au cours de l'évolution qui provoque une spécificité du virus pour son hôte.

Il existe 9 herpèsvirus capables d'infecter l'être humain, séparés en 3 sous-familles, *Alpha-*, *Beta-* et *Gamma-herpesvirinae*.

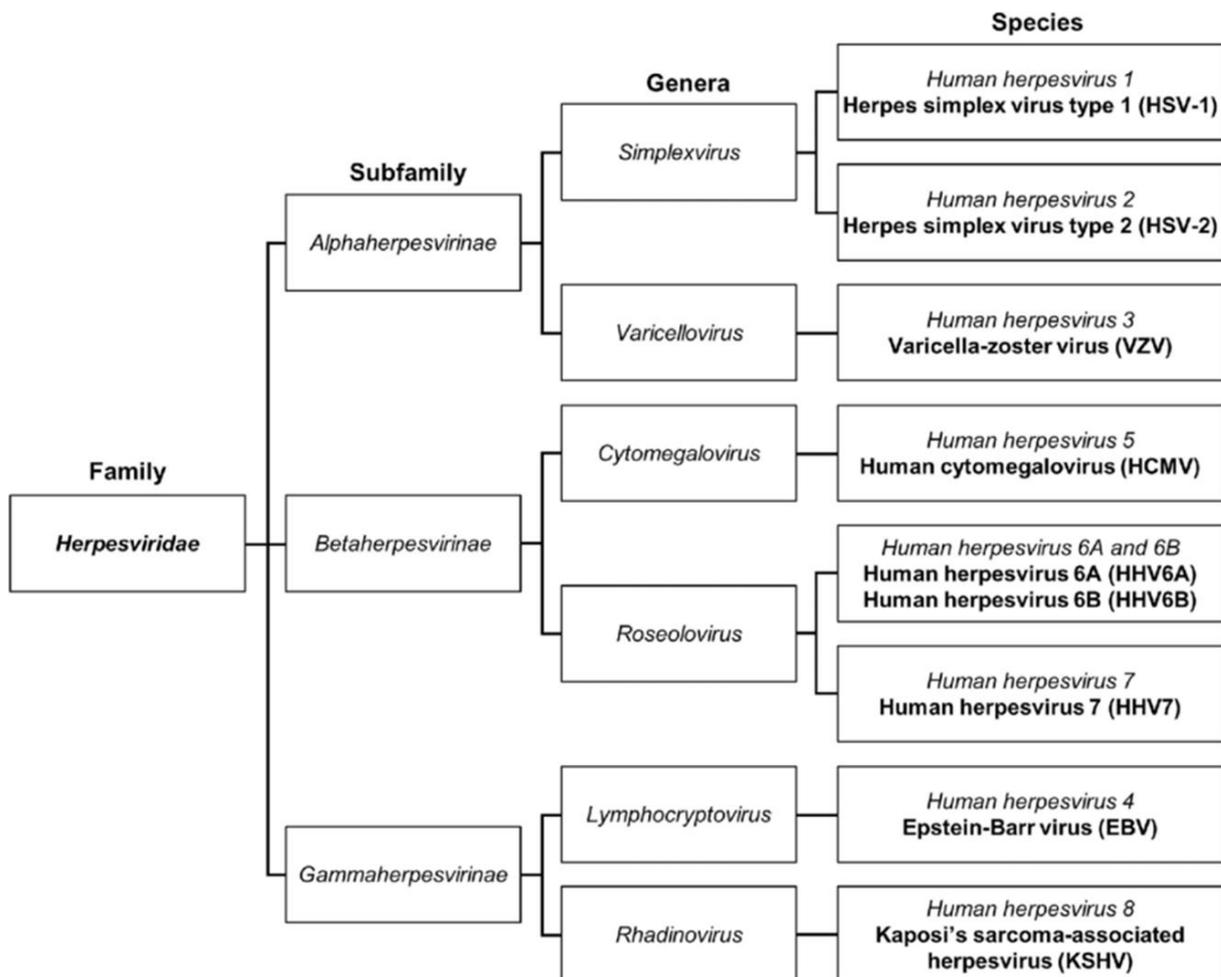


Figure 1 Taxonomie de la famille des *Herpesviridae*, telle que déterminée par le Comité international de taxonomie des virus et basée sur l'analyse phylogénétique de whole-genome (2).

Les herpèsvirus humains sont à l'origine de manifestations cliniques variant considérablement en fonction de l'âge, du statut immunitaire du patient, ou bien encore du type d'infection virale (primo-infection ou réactivation). Chez l'individu immunocompétent, l'infection est généralement peu ou pas symptomatique et très bien contrôlée. Toutefois il existe des

manifestations cliniques avec un degré de sévérité supérieur même chez l'individu immunocompétent, comme l'encéphalite herpétique, l'herpès néonatal, la pneumopathie varicelleuse ou le sarcome de Kaposi (plus fréquent chez l'immunodéprimé).

Chez l'immunodéprimé, en particulier lorsque la lignée cellulaire T est touchée (patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), individus greffés sous immunosuppresseurs, traités par chimiothérapie anticancéreuse, ou encore par immunothérapie), les infections par herpesvirus humains peuvent être plus sévères, se manifestant par des lésions plus extensives et persistantes.

### 1.1.1.1. Structure générale des *Herpesviridae*

Les virions d'herpèsvirus comportent 4 éléments principaux de structure (3) :

- Génome ADN bicaténaire linéaire
- Capside icosaédrique (environ 125 nm de diamètre)
- Enveloppe d'origine cellulaire portant des glycoprotéines virales
- Tégument, structure protéique fibrillaire entre l'enveloppe et la capsid

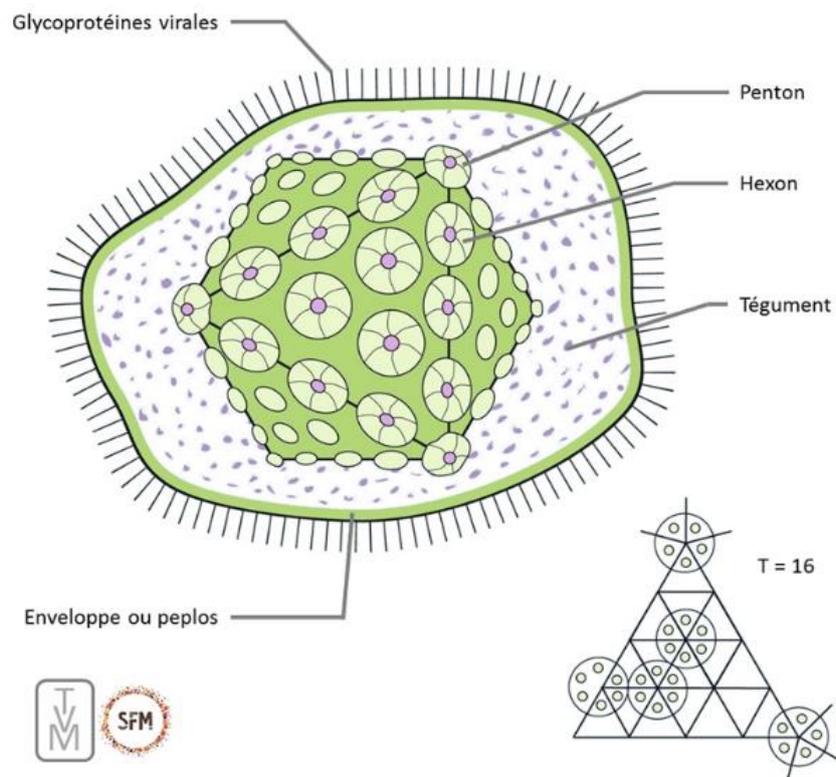


Figure 2 Structure schématique des *Herpesviridae*

La triangulation T de la capsid est de 16, c'est-à-dire que sur l'icosaèdre (polyèdre de 20 faces, 12 sommets, 30 arêtes), chaque face est subdivisée en 16 triangles portant chacun 3 sous-unités protéiques. Reliées aux 12 sommets par 5 pour former les pentons, et par 6 pour former les hexons, elles forment au total 162 capsomères. (source : Traité de Virologie Médicale)

L'ADN viral est enroulé autour de protéines basiques, formant le nucléoïde ou core. Sa taille varie de 125 kpb (kilos pairs de bases) pour le varicelle-zona virus (VZV), à 250 kpb pour le cytomégalovirus (CMV), codant de 70 à 200 protéines.

Malgré des différences de génomes entre les herpèsvirus (comme le pourcentage de guanines/cytosines variant de 46 à 70%, le nombre de séquences répétées, terminales ...), ils possèdent des caractéristiques communes, une quarantaine de gènes homologues au sein de 7 zones génomiques conservées. Ces 7 domaines regroupent les gènes codant des protéines de capsid, du tégument, des glycoprotéines d'enveloppe et des protéines nécessaires à la réplication.

Les génomes des herpèsvirus sont riches en promoteurs, et pauvres en région non codante, donc utilisent peu l'épissage et le chevauchement des gènes.

L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique dérivant de la cellule hôte, responsable de sa sensibilité dans le milieu extérieur, aux solvants des lipides, aux détergents, aux désinfectants usuels, aux pH extrêmes, à la chaleur et à la dessiccation.

La transmission se fait donc d'hôte à hôte par contacts interhumains intimes, voie orale ou sexuelle, à l'exception du VZV qui se transmet par voie aérienne, responsable d'épidémies dans les collectivités.

#### **1.1.1.2. Physiopathologie commune aux *Herpesviridae* :**

Après une première phase correspondant à la primo-infection, le virus établit une latence dans l'organisme hôte lui permettant de pallier sa fragilité dans le milieu extérieur. Chaque virus possède son site de latence, nous pouvons citer les corps cellulaires des neurones des ganglions sensitifs pour l'herpès simplex virus, les neurones et cellules gliales satellites des ganglions sensitifs rachidiens et des paires crâniennes pour le varicelle-zona virus. Les cellules CD34+ de la moelle osseuse, les monocytes-macrophages ou encore les cellules endothéliales pour le cytomégalovirus, ou encore les lymphocytes T CD4+ pour les *Roseolovirus*.

Lors de la latence, l'ADN viral n'est pas intégré dans le génome cellulaire mais bien présent dans le noyau de la cellule sous forme d'épisome (ADN double brin circulaire). Il existe une exception pour les herpès virus humain HHV-6A et B, qui sont capables de s'intégrer à l'ADN cellulaire.

#### **1.1.2. *Alphaherpesvirinae* : Herpès simplex virus et Varicelle-zona virus**

Le genre des *Alphaherpesvirinae* regroupent les virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) et de type 2 (HSV-2), ainsi que le virus de la varicelle et du zona (VZV). Appartenant à la même sous-famille, ils possèdent beaucoup de similarités sur le plan structural, de la physiopathologie ou encore des lésions cliniques mais différent par leur présentation clinique, leur mode et capacité de transmission ou encore le site d'établissement de la latence (4).

### 1.1.2.1. Historique

*A propos de l'herpès simplex virus :*

En 2500 avant Jésus-Christ (av. J-C), les premières descriptions de lésions ressemblant à celles de l'herpès ont été mises en évidence sur des tablettes sumériennes ainsi que dans l'un des plus anciens traités médicaux : le Papyrus Ebers en 1500 av. J-C (5,6).

Le terme « herpès » d'origine grecque signifiant « rampant » fut utilisé pour la première fois par Hippocrate pour décrire des lésions se propageant à la surface de la peau (6). Plusieurs autres faits historiques ont ensuite été rapportés dont celui de la tentative de l'empereur romain Tibère de limiter la propagation de ce qui devait être l'herpès labial en proscrivant les baisers durant les cérémonies et les rituels publics (7).

C'est ensuite au tour de l'écrivain William Shakespeare, dans sa célèbre pièce de Roméo et Juliette, de sous-entendre la présence de lésions herpétiques sur les lèvres de Juliette en 1597. En 1736, John Astruc, en tant que médecin du roi Louis XV, décrit pour la première fois, grâce à l'étude des prostituées sous surveillance médicale, la relation entre l'herpès et les organes génitaux dans son traité sur les maladies vénériennes intitulé *De Morbis Veneris*.

Au 19<sup>ème</sup> siècle, des définitions plus rigoureuses et contemporaines de cette maladie émergent et le terme « herpès simplex » fait son apparition.

En 1808, Robert Willan père de la dermatologie moderne, et son collègue Thomas Bateman sont les premiers à différencier l'herpès labial de l'herpès génital (8). Toutefois, il faudra attendre près d'un siècle, soit en 1893 pour que la transmission du virus d'un individu à l'autre soit mise en évidence par le dermatologue français Jean-Baptiste Émile Vidal tandis que le caractère infectieux de l'herpès nous sera révélé qu'en 1919 par Loewenstein.

Dès le 20<sup>ème</sup> siècle, les recherches concernant les herpès virus prennent plus d'ampleur. En 1912, Wilhelm Grüter poursuit ses travaux sur des modèles animaux et découvre que l'agent responsable des infections herpétiques peut croître sur des embryons de poulets et de lapins et qu'il peut aussi se transmettre d'un lapin à l'autre.

En 1938, Robert Doerr met en évidence la production endogène de virus sous l'influence de certains stimuli (6). Cette découverte est suivie par celle de Burnet et Williams qui, en 1939, décrivent les propriétés de persistance et de latence du virus de l'herpès (9).

Dans les années 1950, le développement de la culture cellulaire et l'étude du système nerveux central (SNC) permet l'isolement d'autres membres de la famille des herpèsvirus. Cette percée met alors en évidence la capacité du virus à induire d'autres maladies telles que les encéphalites, les kératites et l'herpès néonatal. Au cours de cette décennie les premières sérologies herpèsvirus sont développées à partir de virus cultivé sur cellule.

Dès lors, en 1962, le Dr. Karl Schneweis découvre le fruit de millions d'années d'évolution et révèle l'existence de deux sérotypes différents : le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) qui affecte principalement la région labiale et le virus herpès simplex de type 2 (HSV-2) qui est associé aux atteintes génitales (10).

Dans les années 1960 et 1970, les bases fondatrices de la recherche sur le virus herpès sont posées et des découvertes clés sont faites. Parmi celles-ci, on retrouve la caractérisation de la structure et de la taille de la particule virale, la description du génome viral, ainsi que la mise en évidence de la grande variété de protéines qui composent le virus.

*A propos du virus varicelle-zona:*

La varicelle a longtemps été considérée comme une forme atténuée de la variole, jusqu'en 1768 où William Heberden caractérise précisément les deux maladies à l'aide de critères cutanés très distinctifs.

En 1892, Janus von Bokay signale des cas de varicelles survenant chez des patients en contact étroit avec des personnes atteintes de zona. Suggérant qu'un même agent pathogène est responsable des 2 pathologies.

En 1924, Thomas Rivers et William Tillett démontrent que l'agent de la varicelle est un virus.

En 1925, Karl Kundratit inocule le contenu d'une vésicule de zona chez un patient non immunisé et provoque une varicelle.

En 1943, Joseph Garland suggère que le zona pourrait être dû à une réactivation du virus de la varicelle acquis beaucoup plus tôt dans la vie.

EN 1952, Thomas Weller isole le virus de la varicelle en culture cellulaire, et démontre quelques années plus tard que le virus du zona est le même.

En 1974, Michiaki Takahashi met au point la première souche vaccinale (la souche Oka) utilisée dans le vaccin contre la varicelle et le zona.

#### **1.1.2.2. Structure**

Les structures virales des virus herpès simplex de type 1 et 2, ainsi que du virus varicelle-zona, possèdent la morphologie caractéristique des *alpha*herpèsvirus.

La particule virale d'HSV mesure entre 120 et 200 nm de diamètre, avec un génome d'environ 152 kpb (kilopaires de bases). L'homologie de séquence entre HSV-1 et HSV-2 atteint environ 50%. Concernant leur enveloppe, les protéines et glycoprotéines structurales sont soit communes aux deux espèces, soit spécifiques d'une espèce comme les glycoprotéines gG1 pour HSV-1 et gG2 pour HSV-2.

La particule virale du VZV mesure quant à elle 150 à 200 nm, et son génome est d'environ 125 kpb. Il possède 5 régions génomiques (R1 à R5) de taille variable, son génome est toutefois très stable. Le VZV peut être classé en 5 clades qui diffèrent selon leur origine géographique, les souches des clades 1, 3 et 5 sont d'origine européenne, les souches appartenant au clade 2 (dont la souche Oka) sont d'origine asiatique, et les souches du clade 4 sont d'origine africaine.

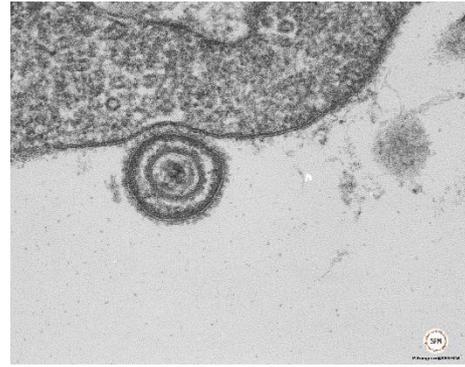
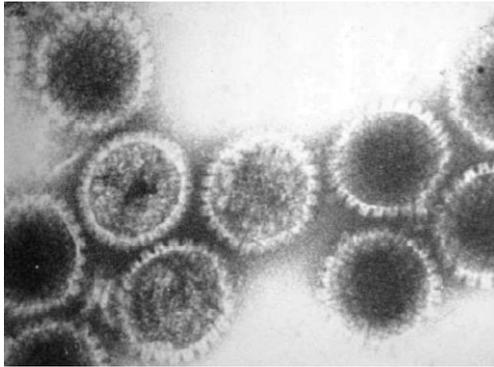


Figure 3 : Photos en microscopie électronique. A gauche, virus de l'herpès simple de type 1, à droite le virus varicelle-zona.

### 1.1.2.3. Multiplication du virus

Les virus HSV et VZV nécessitent, pour infecter la cellule humaine, une fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale. Plusieurs glycoprotéines sont nécessaires à cette fusion (11).

Très brièvement, une fois la fusion accomplie, les protéines du tégument et de la capsid virale sont relarguées dans le cytoplasme de la cellule infectée. Parmi celles-ci, des protéines dégradant l'ARNm de la cellule provoquent un arrêt de la synthèse protéique par cette dernière. La capsid contenant l'ADN viral migre vers le noyau. Initialement linéaire, l'ADN se circularise, et la transcription des gènes viraux de HSV et VZV peut alors commencer. Les étapes de transcription puis de traduction des gènes viraux se déroulent en 3 phases : une phase très précoce ou *Immediate early* (IE) ou alpha correspondant à la synthèse des protéines de régulation, une phase précoce ou *early* (E) ou beta correspondant à la synthèse des protéines nécessaires à la réplication virale et une phase tardive ou *late* (L) ou gamma correspondant à la synthèse des protéines structurales. Une dernière étape consiste à l'assemblage des nucléocapsides nouvellement formées, l'acquisition de l'enveloppe virale et la libération de particules virales à travers la cellule hôte infectée.

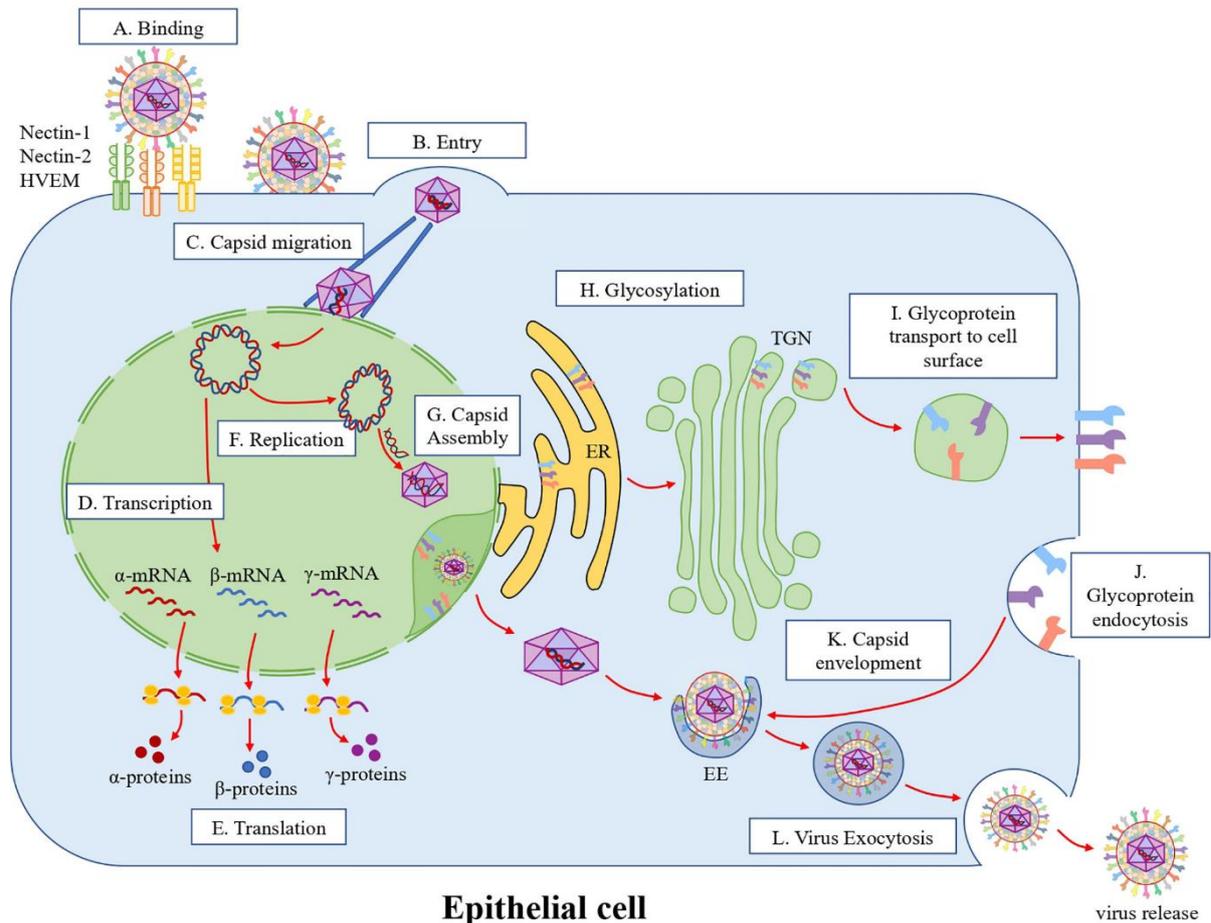


Figure 4 Cycle de réplication du HSV-1 dans les cellules épithéliales. (12)

(A) Fixation et infection. Le HSV-1 se fixe aux récepteurs de la surface cellulaire. Les glycoprotéines gB et gC reconnaissent les protéoglycanes constitués d'héparane sulfate (HSPG) de la surface cellulaire et s'y lient. Ensuite, gD se lie à nectin-1, nectin-2 ou HVEM, ce qui active le complexe gH/gL à la surface du virion, activant à son tour gB qui agit comme une protéine de fusion combinant les membranes virale et cellulaire. (B) Entrée. Après l'événement de fusion membranaire, les protéines de la capside virale et du tégument sont libérées dans le cytoplasme. (C) Migration de la capside. Les capsides virales sont ensuite transportées par les microtubules jusqu'à la membrane nucléaire externe, où le génome d'ADN double brin viral est injecté dans le noyau par les pores nucléaires. (D) Transcription. Dans le noyau, les gènes viraux alpha, bêta et gamma sont transcrits séquentiellement. (E) Traduction. Les ARNm viraux sont ensuite exportés du noyau vers le cytoplasme pour leur traduction et la synthèse des protéines virales. (F) Réplication. Le génome du HSV-1 est circularisé dans le noyau et est répliqué sous forme de cercle roulant. (G) Assemblage de la capside. Les protéines de la capside se transloquent dans le noyau et assemblent la capside virale dans ce compartiment, où le génome viral est inséré dans la capside. Cette capside traverse ensuite la membrane nucléaire par des processus d'enveloppement/désenveloppement. (H) Glycosylation. Les glycoprotéines virales sont synthétisées et initialement glycosylées dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER). (I) Transport des glycoprotéines vers la surface des cellules. Les glycoprotéines sont ensuite exportées vers la surface cellulaire par les corps multivésiculaires (MVB). (J) Endocytose des glycoprotéines. Les glycoprotéines exportées

sont endocytées pour produire des enveloppes de particules virales dans le cytoplasme. (K) Enveloppement. Les glycoprotéines sont concentrées dans les endosomes précoces (EE) qui fusionnent avec la capsid virale dans le cytoplasme. (L) Exocytose du virus. Une fois la capsid recouverte des glycoprotéines virales, les virions sont libérés dans l'espace extracellulaire par exocytose.

#### 1.1.2.4. Épidémiologie de l'HSV et du VZV

Les virus herpès simplex (HSV) de type 1 et 2 sont strictement humains, de même que pour le virus varicelle-zona, l'homme étant l'unique réservoir.

En France la séroprévalence au sein de la population adulte est d'environ 70% pour HSV-1 et 15% pour HSV-2. L'épidémiologie de HSV-2 est celle d'une infection sexuellement transmissible, sa prévalence est donc nulle pendant l'enfance, et peut atteindre 90% chez les individus multipliant les partenaires. Elle varie aussi en fonction du niveau-socio-économique et du pays.

Les derniers chiffres de mars 2022 de l'OMS (organisation mondiale de la santé) estiment que 3,7 milliards de personnes (67% de la population) de moins de 50 ans sont infectées par HSV-1, et 491 millions de personnes âgées de 15 à 49 ans (11% de la population) sont infectées par HSV-2. L'infection à HSV-2 augmente le risque de contracter ou transmettre le VIH (12).

Le virus de la varicelle et du zona est un virus ubiquitaire de forte prévalence, bien que la primo-infection puisse être tardive dans certains pays tropicaux ou en zone rurale (13).

Le point d'actualité de mars 2017 publié par Santé Publique France dénombre environ 700 000 cas de varicelle (plus de 90 % ont moins de 10 ans), environ 3 000 hospitalisations (25 % ont plus de 10 ans) et 20 décès (70 % ont plus de 10 ans). Ces données reflètent le caractère fréquent et exceptionnellement grave de la maladie dans l'enfance mais aussi l'augmentation du risque de complications avec l'âge. Le risque d'être atteint de la varicelle au cours d'une vie est très élevé (environ 95 %) et celui de subir au moins une réactivation du virus (zona) est de l'ordre de 15 à 20 %. Plus de 90 % de la population est immunisée après l'âge de 10 ans.

La varicelle est surveillée par le réseau Sentinelles depuis 1990 et pour le zona depuis 2004. Ce réseau est coordonné par l'équipe « Surveillance et Modélisation des maladies transmissibles » de l'Institut Pierre Louis d'Épidémiologie et de Santé Publique (UMR S 1136) de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) et de l'Université Pierre et Marie Curie, en collaboration avec Santé Publique France. Chaque semaine, le réseau rapporte dans son bulletin hebdomadaire, une estimation du nombre de cas de varicelle diagnostiqués en métropole, ainsi que des cartes décrivant leur répartition géographique.

La varicelle est une maladie "saisonnière" pour laquelle on observe chaque année une recrudescence printanière du nombre de cas (semaine 11 à 15). Un second pic peut également être observé en juin/juillet (semaine 25 à 28).

### **1.1.2.5. Pouvoir pathogène**

#### **1.1.2.5.1. Les infections cutanéomuqueuses**

##### **Herpès oral**

90% des primo-infections par le HSV-1 sont asymptomatiques. En cas de symptômes ils se manifestent par une gingivostomatite associant de nombreuses vésicules évoluant vers des ulcérations sur l'ensemble de la muqueuse buccale, des douleurs pouvant mener à l'arrêt de l'alimentation, et de la fièvre. La guérison est complète quelques semaines plus tard.

Après la primo-infection, le virus se localise dans le ganglion nerveux de Gasser (ganglion du nerf trijumeau), et en cas de réactivation (due à divers stimuli : fatigue, stress, fièvre, exposition au UV, l'approche des menstruations), des symptômes sous forme d'herpès labial récidivant peuvent apparaître. Les vésicules sous forme de bouquet localisé sont unilatérales, et sur la jonction cutanéomuqueuse des lèvres. Parfois d'autres localisations sont possibles comme sur le menton, la narine, ou la pommette.

##### **Herpès génital**

La primo-infection herpétique génitale survient à la suite des premiers rapports sexuels. Souvent lors de l'adolescence ou chez les jeunes adultes. Dans 30% des cas des vésicules apparaissent sur le gland ou le prépuce, ou bien sur la vulve, le vagin et/ou le col utérin. On peut observer des adénopathies inguinales et une dysurie pouvant aller jusqu'à la rétention urinaire. Une fièvre et une altération de l'état général peut aussi s'installer. Historiquement c'était le type 2 des herpès simplex qui était responsable d'herpès génital, mais on constate une augmentation de la fréquence d'HSV-1 dans cette localisation. Après la primo-infection, la latence va s'établir dans les ganglions nerveux sacrés proches de l'infection initiale. Tout au long de la vie de l'individu, des épisodes de réactivations se produiront, symptomatiques ou non, avec excrétion virale. Elles se présentent sous la forme de vésicules en bouquet de façon unilatérale au niveau de la vulve ou du pénis, mais elles peuvent avoir un aspect atypique ulcéré et parfois dans des localisations ectopiques (fesse, cuisse, anus).

Les fréquences de récurrences varient considérablement en fonction des individus, elles diminuent 1 an après la première infection. En cas de rapports rectaux, il peut exister des proctites, rectites herpétiques, avec ténésme et constipation dont le diagnostic clinique est difficile.

## Varicelle de l'immunocompétent

Chez l'enfant, l'incubation moyenne est de 14 jours, puis des prodromes (fièvre, céphalées...) précèdent l'éruption cutanée. L'exanthème débute habituellement au niveau du cuir chevelu, de la face, ou du tronc. Les lésions cutanées se présentent sous forme de macules érythémateuses qui se transforment en quelques heures en vésicules à contenu transparent (gouttes de rosée) entouré d'un érythème à contour irrégulier. Le prurit est intense et une fièvre modérée s'installe. Le contenu des vésicules se trouble et des croûtes se forment. L'éruption évolue par vagues successives, d'où la présence d'éléments cutanés d'âge différent. La phase évolutive se termine classiquement en 7 jours, et les croûtes disparaissent, pouvant laisser des cicatrices ou une dépigmentation temporaire. Le taux de complications est estimé à 4%, l'âge inférieur à 1 an et supérieur à 14 ans étant des facteurs de risques de complication. La surinfection bactérienne représente la complication principale (à *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes*). Mis à part les complications cutanées, on peut rarement observer des fasciites nécrosantes, voir des bactériémies. Les complications neurologiques représentent 20% des hospitalisations et comprennent l'ataxie cérébelleuse bénigne, la méningo-encéphalite, le syndrome de Reye ou de Guillain-Barré, et très exceptionnellement une pneumopathie varicelleuse (plus fréquente chez l'adulte).



Figure 5 Varicelle d'un enfant de 1 an. Eléments cutanés d'âge différent, en A : une croûte en cours de cicatrization, en B une macule érythémateuse. Centre hospitalier universitaire de Limoges ; Chirurgie pédiatrique ; E. Siret (Interne).

Chez l'adulte la varicelle est beaucoup plus marquée que chez l'enfant et plus l'âge est avancé plus le risque de complications sévères augmente. La principale cause de mortalité est la pneumopathie varicelleuse, qui survient 25 fois plus fréquemment chez l'adulte que chez l'enfant. (14) Le sexe masculin, l'âge adulte, le tabagisme, une atteinte cutanée comportant plus de 100 éléments, la grossesse, le contact étroit avec un sujet infecté et toute immunodépression sont des facteurs de risque d'atteinte pulmonaire qui ont été identifiés (15).

Chez le patient immunodéprimé l'atteinte est plus grave et l'éruption cutanée s'étend rapidement à l'ensemble du corps avec la possibilité d'atteinte multiviscérale (pneumonie, hépatite ...).

### **1.1.2.5.2. Les formes neurologiques**

#### **1.1.2.5.2.1. Encéphalite herpétique**

Le virus de l'herpès simplex est la première cause d'encéphalite identifiée dans les pays développés. Elle représente environ 30 à 40% des encéphalites identifiées (16). C'est la seule encéphalite virale pour laquelle il existe un traitement antiviral efficace. Une étude américaine retrouve des taux de létalité de 7% chez le nouveau-né, 1,2% chez l'enfant, et 7,7% chez l'adulte (17). HSV-1 est la première cause d'encéphalite virale, devant le VZV, les arbovirus (Dengue, Chikungunya...), certains entérovirus, la rage, ou encore le VIH. Son incidence est de 300 cas par an en France, avec un pic entre 40 et 50 ans.

#### **Physiopathologie de l'encéphalite herpétique**

La voie d'entrée de l'HSV dans le cerveau la plus acceptée à l'heure actuelle est neuronale. Une étude a montré à l'aide d'un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique constituée de cellules endothéliales microvasculaires, et d'un outil de mesure d'impédance, que l'HSV (qu'il soit de type 1 ou 2) réduisait la résistance de la barrière cellule-cellule immédiatement après sa fusion avec la cellule endothéliale. Ils montrent ainsi que 30h après l'infection par le virus, il y a une destruction des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, participant ainsi à la genèse de l'encéphalite herpétique (EH).(18)

L'EH est une encéphalite aigue nécrosante et hémorragique, typiquement asymétrique, à localisation temporale ou temporo-frontale (voir sous-chapitre imagerie). Elle associe des troubles neurologiques (céphalées, altération du comportement, hallucinations, aphasie, crises convulsives...) évoluant vers des troubles de la conscience, accompagnés de fièvre.

L'invasion du système nerveux central (SNC) se fait soit au cours d'une primo-infection (33% des cas) à partir des voies olfactives par migration neurotrophe, soit à la suite d'une réactivation (67% des cas) associée à une migration antérograde à partir de ganglion de Gasser.

#### **Diagnostic**

Le gold standard pour le diagnostic de cette affection est la PCR sur liquide cérébro-spinal (LCS) à la recherche de l'ADN d'HSV 1 ou 2. C'est le meilleur test diagnostique avec une sensibilité de 98% et une spécificité de 94% (19). Il peut cependant exister des faux négatifs au début de la maladie. Dans une telle situation, la PCR sur LCS doit être répétée après 4 jours minimum (Recommandation SPILF 2017 « Encéphalites infectieuses aiguës de l'adulte »). Des cas de double PCR faussement négatives sont décrits dans la littérature, avec confirmation de l'EH après autopsie par histologie et PCR sur tissu (20).

## Numération et chimie du liquide cérébro-spinal

La numération du LCS est réalisée en urgence, ainsi que la glycorachie et la protéinorachie. Une encéphalite virale sera suspectée en cas de lymphorachie, de glycorachie normale, et d'une hyperprotéinorachie.

Dans une étude multicentrique (21), 4404 LCS ont été analysés par PCR, 91 étaient positifs en HSV, 75 HSV-1 et 16 HSV-2 (2,1%), les auteurs n'ont observé aucune corrélation significative entre les valeurs de PCR HSV en log, le nombre d'éléments blancs ainsi que la protéinorachie, les individus étaient immunocompétents, âgés de plus de 2 ans, et atteints d'encéphalite à HSV. Cette étude montre entre autres que les tests de routine sur LCS (PCR, chimie du LCS ... ) ne peuvent pas exclure le diagnostic d'encéphalite à HSV et doivent être interprétés en fonction des résultats cliniques et radiologiques.

## Imagerie

L'imagerie, en particulier l'IRM (imagerie à résonance magnétique) cérébrale, est un outil diagnostique important dans le diagnostic des encéphalites à HSV. Elle a une sensibilité de 80 à 100% pour objectiver des anomalies cérébrales. Cependant, des images d'IRM normale chez un patient (bien que très rare chez les patients atteints d'EH), ne doivent pas conduire à exclure le diagnostic.

L'IRM cérébrale montre en général des hyperintensités dans le cortex et la substance blanche dans les images en T2 et FLAIR, généralement bilatérales et asymétriques. L'atteinte isolée du tronc cérébral est rare. C'est l'imagerie pondérée en diffusion (DWI) qui semble être la séquence la plus sensible pour détecter l'EH en phase aiguë. Une présentation sévère d'EH peut provoquer une nécrose hémorragique et est caractérisée par un signal T2 hypointense.

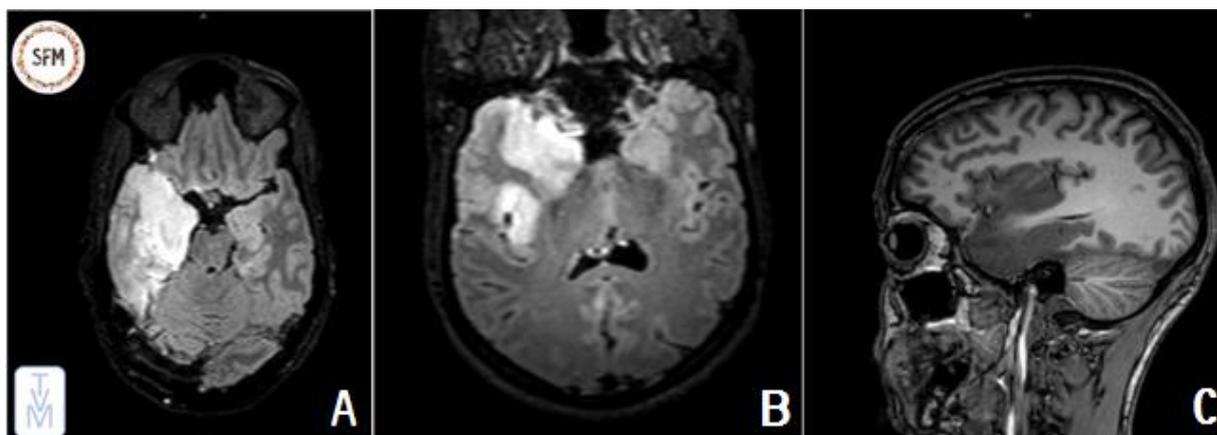


Figure 6 Méningo-encéphalite herpétique sévère avec lésions temporeles bilatérales asymétriques, prédominante à droite et effet de masse. A et B : Imagerie par IRM coupe transversale, FLAIR (*Fluid attenuated inversion recovery*); C : Coupe sagittale, T1

#### 1.1.2.5.2.2. Méningo-encéphalite varicelleuse

La méningite est définie comme la présence de signes et de symptômes méningés (fièvre, céphalées, raideur dans la nuque, photophobie). La méningo-encéphalite est définie par une perte de conscience supplémentaire, des changements de comportement, des convulsions, des signes neurologiques focaux, des anomalies de l'électroencéphalogramme (EEG) ou une imagerie du SNC compatible avec une encéphalite.

Le virus de la varicelle et du zona peut conduire à une méningo-encéphalite varicelleuse, plus fréquemment chez l'immunodéprimé. Une encéphalite de mécanisme direct est rare au cours d'une varicelle ; elle implique une invasion virale non contrôlée par le système immunitaire. Elle est plus fréquente au cours du zona, chez l'individu âgé ou immunodéprimé.

C'est le plus souvent une réactivation du VZV et un transport neuronal antérograde centripète (= vers le système nerveux central), qui mènera à une méningite ou une méningo-encéphalite, une myélite, une vasculopathie, ou une rétinite.

Le diagnostic repose sur la PCR VZV sur LCS. De même que pour l'HSV en cas de négativité de cette PCR, il est recommandé par la SPILF de répéter l'opération à plus de 4 jours de la première ponction lombaire. Enfin en cas de négativité de cette 2<sup>e</sup> PCR, il est recommandé de rechercher une synthèse intrathécale d'anticorps anti-VZV (*SPILF 2017*).

#### Traitement des encéphalites herpétiques et varicelleuses

Chez l'adulte, le traitement de l'EH par aciclovir doit être administré à la dose de 10 mg/kg/8h pendant 14 jours chez l'immunocompétent, et 21 jours chez l'immunodéprimé. L'objectif étant d'atteindre des concentrations plasmatiques de 3 mg/L minimum pour assurer une concentration intrathécale de 1 mg/L.

Une résistance à l'aciclovir (mutation dans le gène de la thymidine kinase voire dans celui de la polymérase) peut être observée mais essentiellement chez l'immunodéprimé. Le foscarnet peut être un antiviral alternatif lorsqu'une résistance à l'aciclovir est suspectée ou prouvée.

Concernant l'encéphalite varicelleuse, en cas de LCS positif à VZV ou de forte présomption clinique (présence de vésicules cutanées, atteinte d'un nerf crânien, ou signe de vasculopathie à l'imagerie), le traitement repose, comme pour l'HSV sur l'aciclovir, mais à 15 mg/kg/8h.

Ci- dessous, l'arbre décisionnel de la *SPILF 2017* décrit la stratégie thérapeutique par aciclovir en cas d'encéphalite à *alpha*herpèsvirus en fonction des résultats de PCR et de synthèse intrathécale. A noté qu'il n'existe pas de recommandation française sur la détection de la synthèse intrathécale anti-HSV.

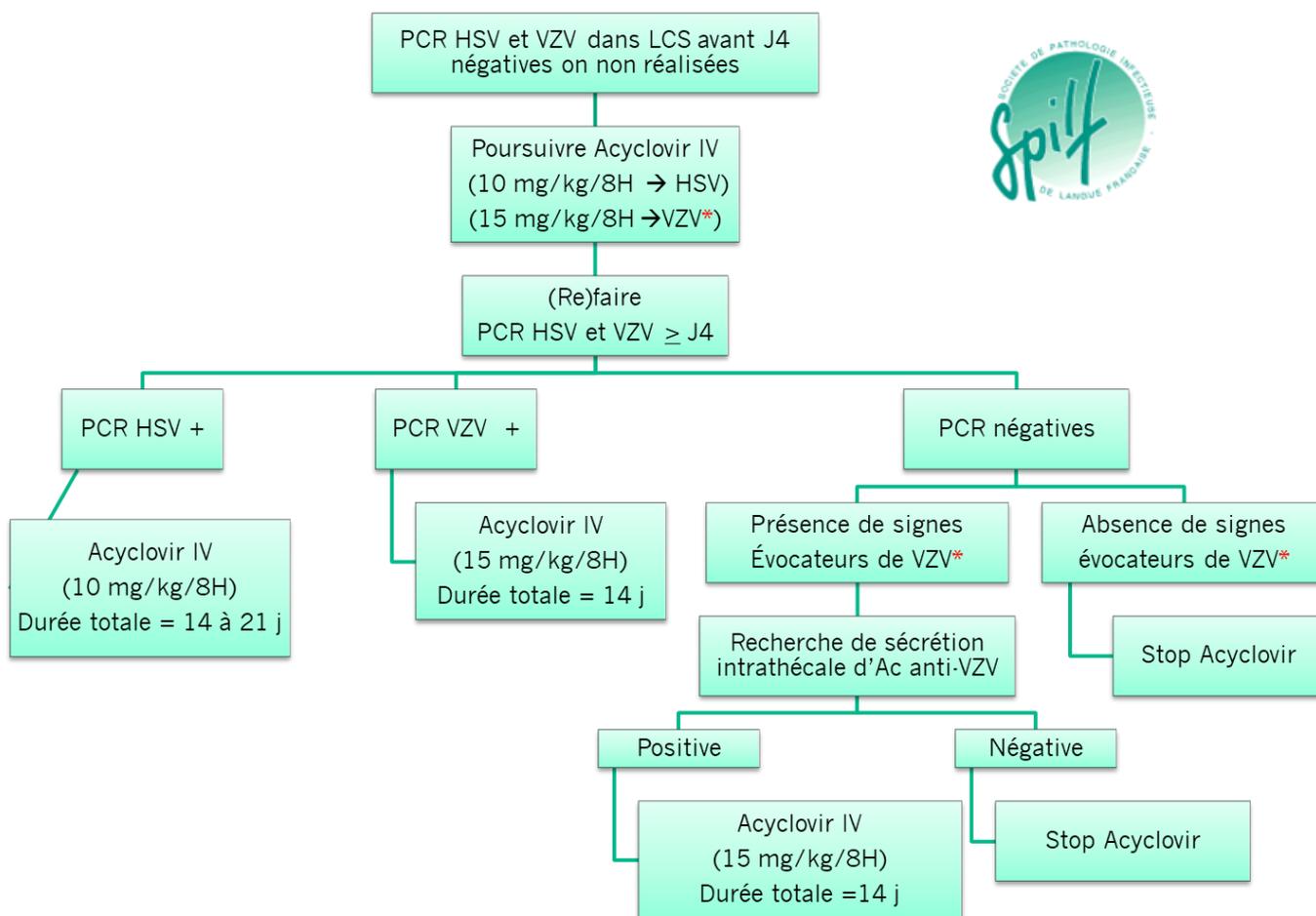


Figure 7 Démarche diagnostic et thérapeutique en fonction de la PCR HSV/VZV sur liquide cérébro-spinal

## Encéphalites auto-immunes conséquentes aux herpès simplex virus

Un article montre en 2018 l'importance des encéphalites auto-immunes post encéphalite herpétique. Cette étude montre qu'il existe un délai d'environ 5 semaines au cours duquel 27% des patients atteints de HSE développent un auto-anticorps contre les récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) ou d'autres protéines de surface neuronale, associées à des symptômes neurologiques (22). Parmi les autres patients, 30 % développent des auto-anticorps dans le sérum (et certains dans le LCS) sans symptôme.

En conséquence, des directives récentes recommandent un dépistage de l'encéphalite auto-immune en cas d'échec au traitement antiviral ou de récurrence des symptômes malgré une prise en charge précoce (23).

### 1.1.2.5.3. Atteintes oculaires

#### Kératites herpétiques

Le virus de l'herpès simplex de type 1 peut être responsable d'atteintes du segment antérieur, presque toujours unilatérales. Les atteintes les plus fréquentes sont les kératites (mais d'autres sont décrites : blépharites, conjonctivites, uvéites antérieures). Le risque est la récurrence, et compte tenu de la particularité du tissu cornéen, les récurrences peuvent entraîner à terme une opacification de la cornée et une néovascularisation cornéenne.

Les kératites herpétiques sont la 1<sup>ère</sup> cause de cécité unilatérale d'origine infectieuse dans les pays occidentaux. (90 000 patients touchés et 20 000 récurrences herpétiques par an en France métropolitaine).

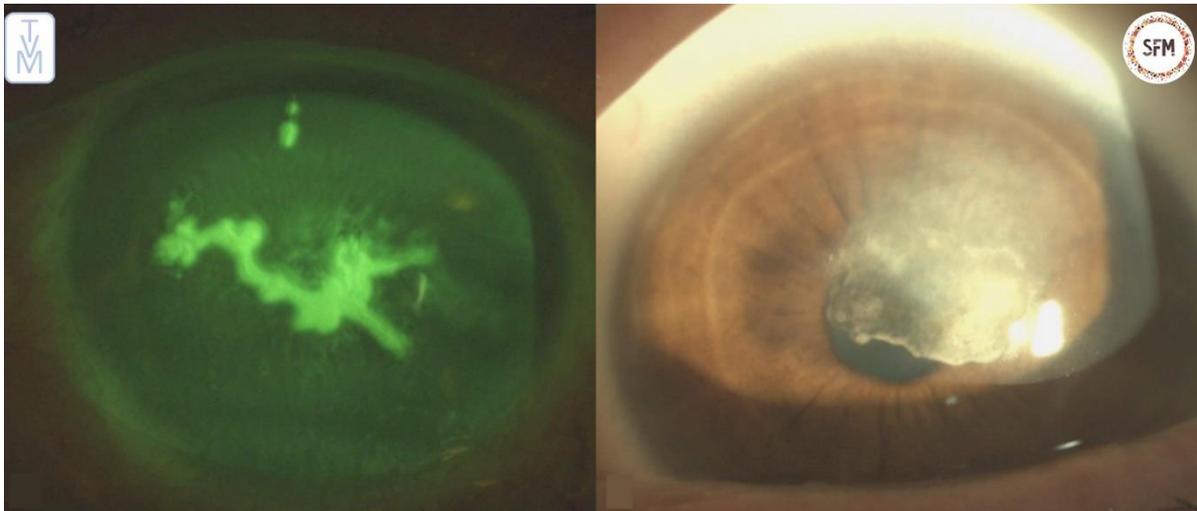


Figure 8 A gauche : Kératite herpétique (épithéliale dendritique) (photo avec filtre bleu après instillation de fluorescéine) A droite : Kératite stromale avec opacification cornéenne

Le traitement repose sur l'instillation d'antiviraux topiques, ou systémiques, associés à des corticoïdes locaux (contre-indiqués en cas de kératite épithéliale). L'opacification peut être traitée chirurgicalement par une greffe de cornée, mais le pronostic reste péjoratif en raison des récurrences virales possibles chez le greffon, et de la néovascularisation cornéenne (24).

## Zona ophtalmique

Le virus de la varicelle-zona peut se compliquer de vésicules palpébrales accompagnées d'une atteinte du segment antérieur (kératite, uvéite, conjonctivite), qui touche 10 à 20% des cas. L'évolution est souvent favorable et les récurrences rares.

Le zona ophtalmique (ZO) quant à lui est une éruption vésiculeuse unilatérale due à l'atteinte de la 5<sup>ème</sup> paire de nerf crânien issu du ganglion de Gasser, où le virus y établit sa latence.



Figure 9 Patient atteint d'un zona ophtalmique typique, atteinte du nerf trijumeau (5<sup>ème</sup> paire de nerf crânien)

Melvin I. Roat, MD, FACS, Sidney Kimmel Medical College at Thomas Jefferson University

Une complication rare du ZO est l'apparition d'algies post-zostériennes, qui regroupent des paresthésies, allodynies, et douleurs neurogènes. Elles impactent sévèrement la qualité de vie des patients. Le traitement repose sur l'instauration rapide d'antiviraux systémiques associées à des corticoïdes locaux en cas d'inflammation oculaire.

### 1.1.2.5.4. Atteintes néonatales

#### Herpès néonatal

L'infection herpétique chez le nouveau-né est très rarement asymptomatique contrairement à l'adulte ; elle peut être due à HSV-1 ou HSV-2. C'est la primo-infection génitale lors de l'accouchement ou dans le mois le précédent qui est la situation la plus à risque d'herpès néonatal, due à la sécrétion intense virale, et l'absence d'anticorps de type IgG chez la mère transmissibles à l'enfant.

L'infection se fait en général lors de l'accouchement au moment du passage dans les voies génitales (90% des cas). Plus rarement, l'enfant peut être contaminé in utero (5% des cas) soit par voie ascendante en cas de rupture des membranes ovulaires, soit lors d'une virémie au cours d'une primo-infection herpétique maternelle. Enfin, la transmission est aussi possible si la mère n'a jamais rencontré HSV-1 par contact en période post-natal avec des sécrétions salivaires d'un membre de l'entourage présentant un herpès labial (5% des cas). Dans près de 50% des cas, l'herpès néonatal se présente sous une forme cutanéomuqueuse avec des

vésicules cutanées (vésicules dites en bouquet), buccales, ou oculaires (+/-conjonctivite). Le plus souvent bénigne, cette forme peut évoluer de façon imprévisible vers une dissémination du virus dans le SNC.

Dans 40% des cas, on observe une forme localisée au SNC conduisant à des séquelles dans près de 45% des nouveau-nés. Les formes disséminées qui peuvent atteindre tous les organes (poumons, foie, et système nerveux central) sont retrouvées dans 10% des cas. Malgré l'instauration du traitement antiviral, la mortalité reste supérieure à 50% dans les formes disséminées. On rapporte environ 20 cas par an en France (25).

En cas de suspicion d'herpès néonatal, des prélèvements (sang et liquide céphalorachidien) pour recherche d'ADN viral par PCR doivent être réalisés pour confirmer le diagnostic. Tout nouveau-né symptomatique suspect d'herpès néonatal doit être prélevé et traité par aciclovir intraveineux (IV). En cas de lésion génitale maternelle à l'accouchement, la prise en charge d'un nouveau-né asymptomatique dépend de l'évaluation du risque de transmission. En cas de récurrence maternelle (risque de transmission mineur), des prélèvements pour PCR HSV sont réalisés à 24 heures de vie et le nouveau-né est surveillé jusqu'aux résultats. En cas de primo-infection ou d'infection initiale non primaire (primo-infection par un type d'HSV chez un patient déjà infecté par l'autre type viral) (risque de transmission majeur), les prélèvements sont réalisés à 24 heures de vie et un traitement IV par aciclovir est débuté.

Le traitement de l'herpès néonatal repose sur l'aciclovir IV à la posologie de 60 mg/kg/j réparti en 3 injections. La durée du traitement dépend de la forme clinique (14 jours pour la forme cutanéomuqueuse, 21 jours pour les autres formes). Un relais par aciclovir per os à la posologie de 300 mg/m<sup>2</sup>/j pour une durée de 6 mois est recommandé pour améliorer le pronostic neurologique et diminuer le risque de récurrence.

La transmission post-natale est principalement due à HSV-1. Les règles de prévention de la transmission post-natale doivent être connues des parents et de l'entourage mais également des soignants.

### **Varicelle néonatale**

Le virus de la varicelle et du zona peut être responsable de fœtopathies graves en cas de primo-infection varicelle chez la mère avant la 20<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (le risque est de 1/ 1000 avec 1 à 2% de risque de fœtopathie). Le tableau malformatif à l'échographie est le suivant : hypoplasie d'un membre, retard de croissance intra-utérin, anomalies neurologiques (microcéphalie, hydrocéphalie).

La varicelle néonatale, quant à elle, survient dans les 10 premiers jours de vie et se caractérise par des éruptions vésiculeuses intenses et généralisées. Elle est due à la transmission du VZV au nouveau-né suite à une primo-infection maternelle survenant en fin de grossesse. Plus l'infection survient proche du terme de la grossesse, et moins il y aura de transferts d'anticorps anti-VZV à l'enfant, et plus le risque de varicelle néonatale sera important. En cas de notion de contagion chez une femme séronégative moins de 10 jours avant l'accouchement, une injection d'immunoglobulines spécifiques est recommandée.

En cas de varicelle pendant la grossesse un traitement antiviral par voie orale (valaciclovir) est recommandé, ainsi qu'un suivi échographique rapproché. En cas de signes échographiques, le diagnostic peut être fait par PCR sur liquide amniotique.

### 1.1.2.5.5. Formes cliniques chez le patient immunodéprimé

On considère un patient immunodéprimé s'il est sous traitement immunosuppresseur (greffe d'organe solide ou de cellules souches hématopoïétiques), atteint du VIH au stade SIDA, ou encore sous chimiothérapie anticancéreuse. Les atteintes herpétiques à HSV sont souvent plus étendues et délabrantes. Les récurrences sont plus fréquentes et avec des atteintes plus graves, à type de méningo-encéphalites herpétiques, œsophagites, hépatites, ou de pneumonies.

Concernant le zona, il peut survenir à tout âge chez l'immunodéprimé, les algies post-zostériennes sont plus fréquentes et plus intenses. De même que pour les herpès simplex, les atteintes peuvent être généralisées (méningo-encéphalite varicelleuse, pneumonie varicelleuse, hépatite, pancréatite).

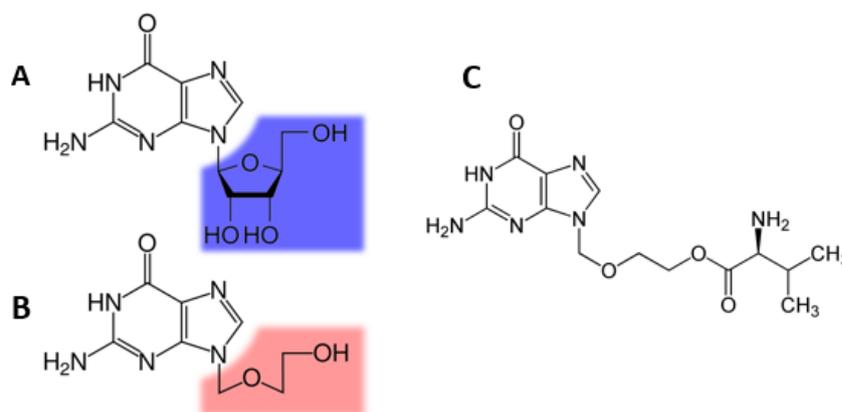
### 1.1.2.6. Traitements

#### 1.1.2.6.1. Les antiviraux actifs sur les herpès simplex

La prise en charge thérapeutique repose sur l'utilisation d'antiviraux inhibant l'ADN polymérase du virus, qui est l'enzyme clef de la réplication de l'HSV. Ces antiviraux sont virostatiques et n'ont pas d'action sur la forme de latence du virus.

#### Analogues nucléosidiques

L'aciclovir est le traitement de référence pour l'HSV, ainsi que le valaciclovir (prodrogue de l'aciclovir) qui permet une administration *per os* avec une bien meilleure biodisponibilité. Ce sont des analogues nucléosidiques entrant en compétition avec le nucléoside naturel de l'ADN polymérase virale, la guanosine. Leur activité nécessite une triple phosphorylation par la thymidine kinase virale ainsi que des kinases cellulaires.



Structures chimiques voisines de la guanosine : Guanosine (A), Aciclovir (B), Valaciclovir (C)

D'autres thérapies analogues de la guanosine sont efficace sur l'HSV, comme le penciclovir, et sa prodrogue le famciclovir, très peu utilisés en France, la trifluridine, toxique par voie systémique, qui est utilisée sous forme de collyre dans les kératites herpétiques, ou encore le ganciclovir, actif sur HSV, mais surtout utilisé contre le CMV et HHV-6 (6<sup>ème</sup> herpès virus humain). La toxicité hématologique du ganciclovir est importante et il est réservé au traitement des infections à CMV ou HHV-6 sous forme orale ou IV. Pour les kératites herpétiques, il peut être utilisé sous forme de gel ophtalmique.

### **Analogue nucléotidique**

Chez les analogues nucléotidiques, on retrouve le cidofovir qui agit indépendamment de la thymidine kinase viral. Il peut donc être utilisé en cas de résistance aux molécules précédemment décrites. Sa toxicité rénale le limite aux cas d'infections graves à HSV.

### **Analogue du pyrophosphate**

Un analogue du pyrophosphate, le foscarnet, exerce son activité sans phosphorylation préalable. Il inhibe directement l'ADN polymérase virale. Il présente une toxicité rénale, qui est réversible à l'arrêt du traitement, il est donc administré en cas d'infection grave à HSV ou de résistance aux précédents traitements, à l'instar du cidofovir.

#### **1.1.2.6.2. Les antiviraux actifs sur le Varicelle-Zona virus**

Comme les infections à herpès simplex, l'aciclovir et sa prodrogue le valaciclovir sont les traitements de référence dans l'infection à VZV. Les mécanismes d'action sur le VZV sont similaires à l'HSV. Le famciclovir, la prodrogue du penciclovir a un mécanisme similaire à l'aciclovir. Le foscarnet, analogue du pyrophosphate, inhibiteur direct de l'ADN polymérase du VZV peut aussi être utilisé, il est indiqué en deuxième ligne en cas de résistance à l'aciclovir.

### **Indication du traitement antiviral pour le VZV**

Concernant la varicelle de l'immunocompétent il n'y a pas d'indication dans la forme simple de l'enfant et de l'adulte, le traitement étant uniquement symptomatique (antiseptiques prévenant la surinfection bactérienne, antihistaminique dans le cadre du prurit). L'aspirine est contre-indiquée pour des risques de syndrome de Reye.

Le traitement antiviral est indiqué en cas de formes compliquées : pneumopathie varicelleuse, encéphalite à VZV, ainsi que dans certaines situations chez la femme enceinte et le nouveau-né en fonction du contexte clinique.

### **Prise en charge thérapeutique des vasculopathies post-VZV**

Le diagnostic clinique de la vasculopathie imputable au VZV est fortement suspecté lorsqu'un patient ayant des antécédents récents de varicelle ou de zona présente un accident ischémique transitoire ou un accident vasculaire cérébral corroboré par des anomalies IRM, en particulier à la jonction substance grise-matière blanche. La présence d'une pléiocytose mononucléaire dans le LCS, y compris de globules rouges dans le LCS, ainsi que l'angiographie qui révèle un rétrécissement focal et un bourrelet dans les vaisseaux cérébraux, étayent le diagnostic clinique.

Le traitement est instauré sur la base de preuves de catégorie 3 (les opinions d'autorités respectées basées sur l'expérience clinique, les études descriptives ou les rapports de comités d'experts). Un article du Lancet Neurology (26) publié en 2009 que lorsque le diagnostic de

vasculopathie à VZV est envisagé et dans l'attente des études du LCS (SIT IgG anti-VZV ou l'ADN du VZV) pour confirmer le diagnostic, il faut traiter immédiatement tous les patients avec de l'aciclovir par voie intraveineuse, à raison de 10 à 15 mg/kg trois fois par jour pendant 14 jours. Étant donné qu'il y a souvent une composante inflammatoire dans les vasculopathies cérébrales, ils préconisent également l'administration de prednisone par voie orale, à raison de 1 mg/kg par jour pendant 5 jours (aucune diminution progressive n'est nécessaire).

Ils préconisent de ne pas traiter les patients atteints de vasculopathie à VZV avec des stéroïdes pendant plus d'une semaine car un traitement à long terme peut potentialiser l'infection virale. Enfin, ils rencontrent plusieurs patients atteints de vasculopathie à VZV qui continuent à présenter des symptômes neurologiques après un traitement par aciclovir intraveineux. La plupart de ces patients étaient séropositifs au VIH, et un patient était diabétique. Dans ces situations, ils ont recommandé l'administration de valaciclovir par voie orale, à raison de 1 g trois fois par jour pendant un à deux mois supplémentaires, ce qui a entraîné la disparition des symptômes.

### 1.1.2.7. Prévention

#### Prévenir des infections herpétiques

Étant donné la possible excrétion de particules virales d'herpès simplex virus en l'absence de symptômes (lors de phases de récurrences asymptomatiques), la prévention de l'HSV repose sur des mesures simples d'hygiène pour la transmission orale chez le nouveau-né en post-partum, l'utilisation de préservatif lors de rapport sexuel, la désinfection des voies génitales basses à la chlorhexidine moussante ou la povidone iodée lors de l'accouchement ou la césarienne pour éviter la contamination du nouveau-né par les voies génitales.

La mise au point d'une vaccination herpétique est encore à l'étude, malgré de nombreux essais chez l'animal ou l'humain qui n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Les approches modernisées utilisant l'analyse *in silico* et la bioinformatique sont des méthodes émergentes qui présentent un potentiel pour produire des vaccins avec des cibles et des formulations améliorées (27).

Une vaccination herpétique HSV-1 et HSV-2 permettrait de prévenir la contamination par HSV, ainsi de réduire la transmission inter-individus en diminuant entre autres le nombre de récurrences. L'objectif serait également de prévenir les formes graves (encéphalites et infections néonatales)

#### Prévenir les infections à VZV

Le VZV est un des virus les plus contagieux parmi ceux qui sont transmis par aérosol. En milieu hospitalier, une infection à VZV nécessite un isolement afin de protéger les femmes enceintes ainsi que les patients immunodéprimés. L'isolement se fait en chambre seul avec précautions contact et respiratoire.

Des immunoglobulines IgG anti-VZV sont disponibles en ATU (autorisation temporaire d'utilisation) et sont à administrer dans les 4 premiers jours après une notion de contagage avec un patient atteint. Ces immunoglobulines sont réservées aux immunodéprimés ainsi qu'aux femmes enceintes non immunes, ainsi qu'à leur nouveau-né en cas de varicelle chez la mère 5 jours avant ou 2 jours après la naissance de l'enfant.

Un traitement antiviral prophylactique par valaciclovir peut être proposé aux patients immunodéprimés et aux femmes enceintes en cas de contage varicelleux au-delà des 4 premiers jours.

Quant à la vaccination, il existe 2 types de vaccins contre le VZV qui ont 2 indications différentes. Le premier (Varivax® et Varilrix®) est un vaccin permettant de protéger contre la varicelle. Le second type de vaccin (Zostavax®), permet de stimuler le système immunitaire et de prévenir les réactivations provoquant le zona. Ce sont tous des vaccins vivants atténués dérivés de la souche vaccinale Oka. Seule la concentration est différente (10 fois plus élevée dans le vaccin anti-zona).

## 1.2. Outils diagnostics dans les infections à *alphaherpèsvirus*

Le diagnostic de lésions herpétiques est plutôt aisé, de même que celui de la varicelle et ne nécessite pas systématiquement de prélèvements à visée diagnostic chez l'immunocompétent. Cependant dans le cas de lésions génitales herpétiques atypiques (localisation anale, fesse ...), un diagnostic à visée étiologique s'impose. Dans le cas de lésions cutanées, le diagnostic se fera par détection directe de l'ADN viral dans le prélèvement cutané, réalisé par écouvillonnage minutieux de la lésion avec un écouvillon déchargé en milieu de transport, ou aspiration du liquide à la seringue.

De nombreux prélèvements peuvent être analysés au laboratoire selon les symptômes cliniques du patient, le liquide broncho-alvéolaire pour une recherche de pneumonie varicelleuse, le liquide cérébro-spinal en cas de méningo-encéphalite herpétique ou varicelleuse, le sang pour établissement du statut sérologique ou la recherche d'une infection disséminée ou d'une atteinte hépatique.

### 1.2.1. Isolement du virus en culture cellulaire

Avant l'ère de la biologie moléculaire, les virus de l'herpès étaient isolés par culture virale sur cellules (principalement sur cellule embryonnaire de fibroblastes humains type MRC-5 et sur cellules Vero).

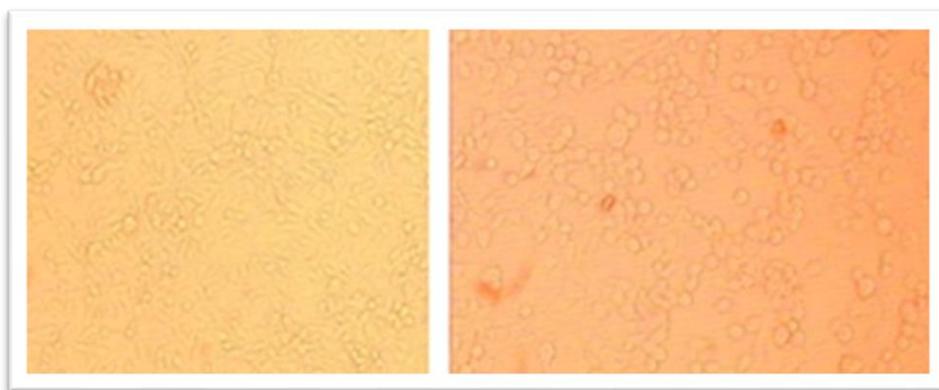


Figure 10 Effet cytopathogène de HSV-1 en culture cellulaire (cellules Vero), à gauche les cellules Vero non infectées, à droite les cellules Vero ballonnées suite à l'infection par HSV-1

*.Arisha Taj Mahaboob Batcha1 Bangladesh J Pharmacol. 2020; 15: 11-18.*

Un effet cytopathogène apparaît en 24 à 48h sous forme de cellules arrondies et ballonnées regroupées en grappe de raisin. Après éclatement, on observe la formation de plages de lyse. Cette technique de référence n'est plus utilisée en routine dans les laboratoires.

### 1.2.2. Détection de l'ADN viral

La détection du génome viral de HSV-1, HSV-2 et VZV permet un rendu de résultat très rapide, plus sensible que la culture, mais qui ne prouve pas forcément en cas de positivité que le prélèvement contient du virus infectieux. La détection se fait par PCR (*polymerase chain reaction*), qui est une technique d'amplification de l'ADN présent dans l'échantillon. C'est une PCR en temps réel, qui peut être multiplex permettant alors de détecter plusieurs pathogènes au cours de la même réaction d'amplification. Au laboratoire de virologie du CHU de Limoges, c'est une technique de PCR en temps réel qui détecte les 3 *alpha*herpèsvirus simultanément. C'est l'examen de référence pour le diagnostic d'encéphalite herpétique.

Dans une étude où les auteurs ont comparé le résultat de la PCR dans le LCS à celui des biopsies cérébrales positives en culture, la PCR HSV présente une sensibilité de 98% et une spécificité de 94%(19). La PCR VZV a, quant à elle, une sensibilité et une spécificité >95% (28).

### 1.2.3. Diagnostic sérologique

La sérologie est un diagnostic indirect qui permet d'objectiver une infection à HSV ou VZV, passée ou en cours. En cas de primo-infection, on observe l'apparition d'IgM puis secondairement des IgG qui persisteront à vie chez l'individu.

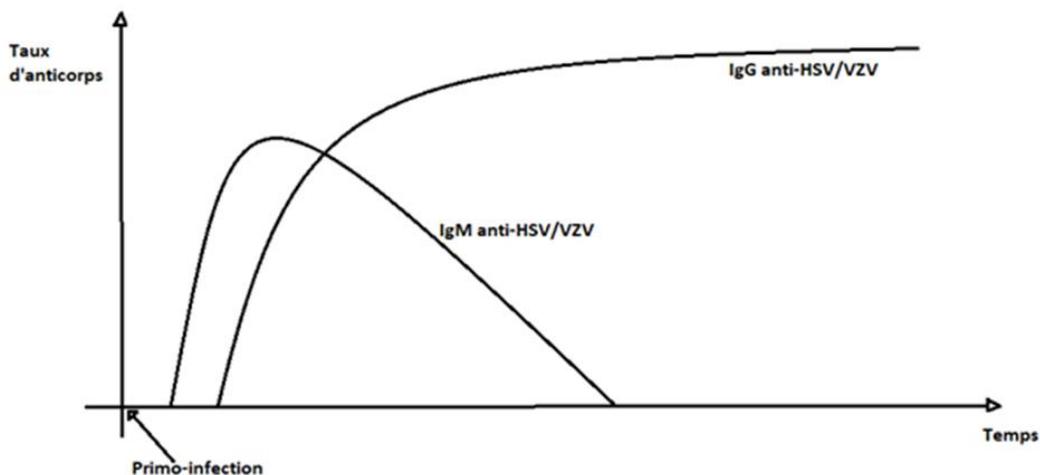


Figure 11 Cinétique classique d'apparition des anticorps anti-*alpha*herpèsvirus suite à la primo-infection.

La sérologie HSV-1, HSV2, ou VZV n'est pas indiquée dans le diagnostic d'une infection aiguë ou récente. C'est la recherche directe du pathogène au niveau de la lésion cutanéomuqueuse qui est recommandée en cas de présentation clinique atypique.

Il existe 2 de types de sérologie herpétique, la sérologie non spécifique de type, qui recherche les IgG anti-HSV-1 et HSV-2 sans distinction, et la sérologie spécifique de type qui distinguera les anticorps dirigés contre les 2 virus. La distinction entre les deux types d'herpès simplex virus a sa place dans le diagnostic d'herpès génital. En effet une séropositivité à HSV-2 permet de contribuer au diagnostic d'herpès génital, alors qu'en revanche une séropositivité isolée à HSV-1 ne sera pas contributive étant donnée la forte prévalence des infections à HSV-1 orofaciales dans la population générale. (29)

La sérologie herpès fait partie du panel « TORCH *serology* » qui sont les pathogènes responsables d'infections congénitales et périnatales (*Toxoplasma gondii*, Rubella virus, cytomégalovirus et *Herpesvirus*).

A ce jour la recherche d'IgG anti-herpès de type est inscrite à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) dans le cadre de la recherche d'herpès génital en cours de grossesse ou à l'accouchement et de la recherche du statut immunitaire chez un patient receveur de greffe.

Concernant la recherche d'IgG anti-VZV elle est également inscrite à la NABM dans le cadre de la détermination du statut immunitaire chez la femme enceinte, chez les candidats à la vaccination, ainsi qu'avant un traitement immunosuppresseur au long cours.

La conférence de consensus française sur la prise en charge de l'herpès cutanéomuqueux chez le sujet immunocompétent publiée en novembre 2001 ne retient pas dans les stratégies diagnostiques les tests sérologiques (30).

Certains laboratoires spécialisés réalisent le dosage des anticorps anti-VZV ou anti-HSV dans le liquide cébrospinal (synthèse intrathécale) pour confirmer le diagnostic de méningo-encéphalite herpétique ou varicelleuse, ainsi que la synthèse intraoculaire dans le cas d'uvéite antérieure. Ces techniques sont réservées à certains laboratoires spécialisés, et une uniformisation de la méthode de détermination de la synthèse intrathécale est nécessaire.

### **Intérêt sérologique des glycoprotéines G1 et G2 de l'herpès simplex**

Notre capacité à discriminer les infections par HSV-1 et HSV-2 par des moyens sérologiques est importante pour diverses raisons cliniques. La sérologie spécifique du type de HSV a un certain nombre d'applications, permettre des analyses épidémiologiques, évaluer l'efficacité d'un vaccin candidat contre l'infection herpétique et pour aider le clinicien lors du conseil des couples avec un herpès génital. Les génomes des deux types d'HSV semblent être suffisamment stables intratypiquement et discordants intertypiquement pour permettre une telle discrimination (47).

C'est à partir des années 90, après la description d'anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes de glycoprotéines de type G1 pour HSV-1 et de type G2 pour HSV-2 que les premiers essais de synthèse d'oligopeptides utiles dans le sérotypage diagnostique débutent. En 1998 une série de 67 oligopeptides couvrant le cadre de lecture ouvert de la glycoprotéine G (gG2) du virus de l'herpès simplex de type 2 a été synthétisée et testée pour sa réactivité avec 173 échantillons de sérum prélevés sur 117 individus (48).

## La chimiluminescence

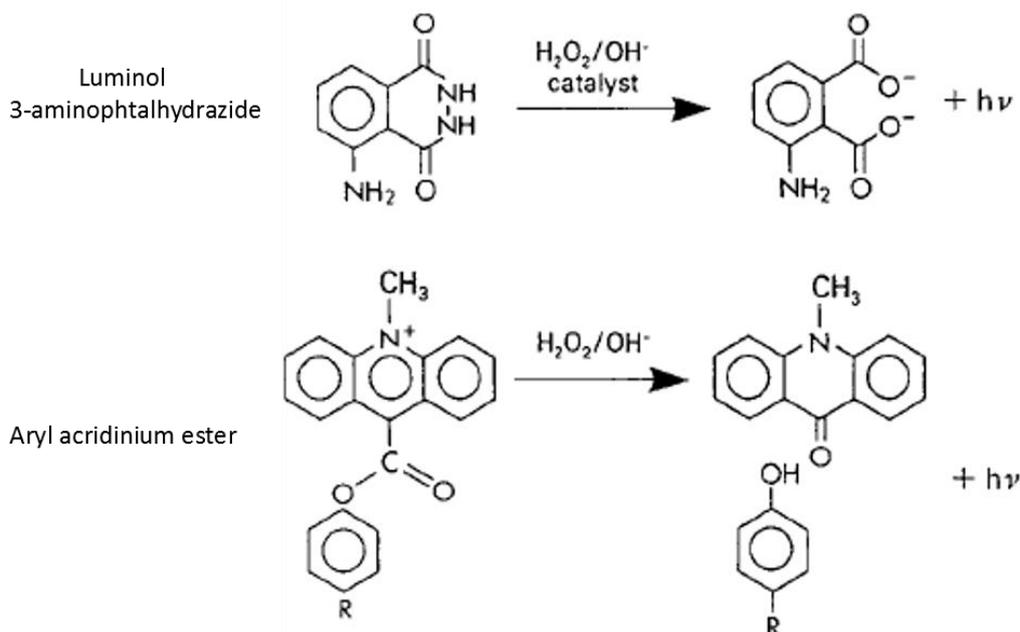
L'immunodosage par chimiluminescence est une technique de détection où le marqueur dosé sera mesuré par l'intermédiaire d'un indicateur luminescent. La luminescence est en générale un rayonnement visible, ou quasi-visible ( $\lambda = 300-800 \text{ nm}$ ) qui est généré lorsqu'un atome passe d'un état excité à l'état fondamental. L'énergie potentielle résultante dans l'atome est ainsi libérée sous la forme d'un photon. La luminescence présente l'avantage d'être une mesure absolue, contrairement à l'absorbance en spectrophotométrie où cette mesure est relative. La luminescence est une réaction exergonique.

Toutes les techniques d'immunodosage nécessitent 2 composants, en premier lieu un anticorps capable de lier spécifiquement le composé à doser, et en second lieu un traceur permettant à cette liaison spécifique d'être observée.

Il existe 2 types de chimiluminescence, directe et indirecte. Dans la première, le photon émis est directement issu de la désexcitation de la molécule excitée sans utiliser d'étapes supplémentaires, ni de molécules d'amplification, contrairement à la seconde où une molécule intermédiaire intervient. La chimiluminescence indirecte utilise comme phase solide des particules magnétiques recouvertes de l'antigène cible. La molécule chimiluminescente est conjuguée à un anticorps monoclonal dirigé contre les anticorps humains.

### Molécules chimiluminescentes

Plusieurs molécules organiques possèdent des capacités de chimiluminescence sous conditions appropriées. La molécule la plus connue et étudiée est synthétique, le luminol (= 3-aminophthalhydrazide). Un autre type de chimiluminescence est basé sur l'ester d'acridinium. Les conditions de réaction de ces 2 molécules sont très différentes.



La première réaction, est la décomposition du luminol en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (peroxyde d'hydrogène) d'une base, et d'un catalyseur (classiquement des complexes métalliques). La seconde réaction est la décomposition de l'ester d'acridinium en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , elle ne nécessite pas de catalyseur. Les 2 réactions sont dites exergoniques, et produisent l'émission

d'un photon (d'énergie  $h\nu$ ,  $h$  représentant la constante de Planck en J.s, et  $\nu$  la fréquence en Hz).

Les techniques sérologiques utilisées dans notre étude utilisent toute la méthode CLIA (chimiluminescence immuno-assay), la molécule lumineuse est un dérivé du luminol (isoluminol), et la réaction est donc déclenchée lors d'ajout du « starter » qui contient une base et du peroxyde d'hydrogène. Ci-dessous, le schéma du principe de la chimiluminescence, appliquée au dosage d'IgG humaines spécifiques.

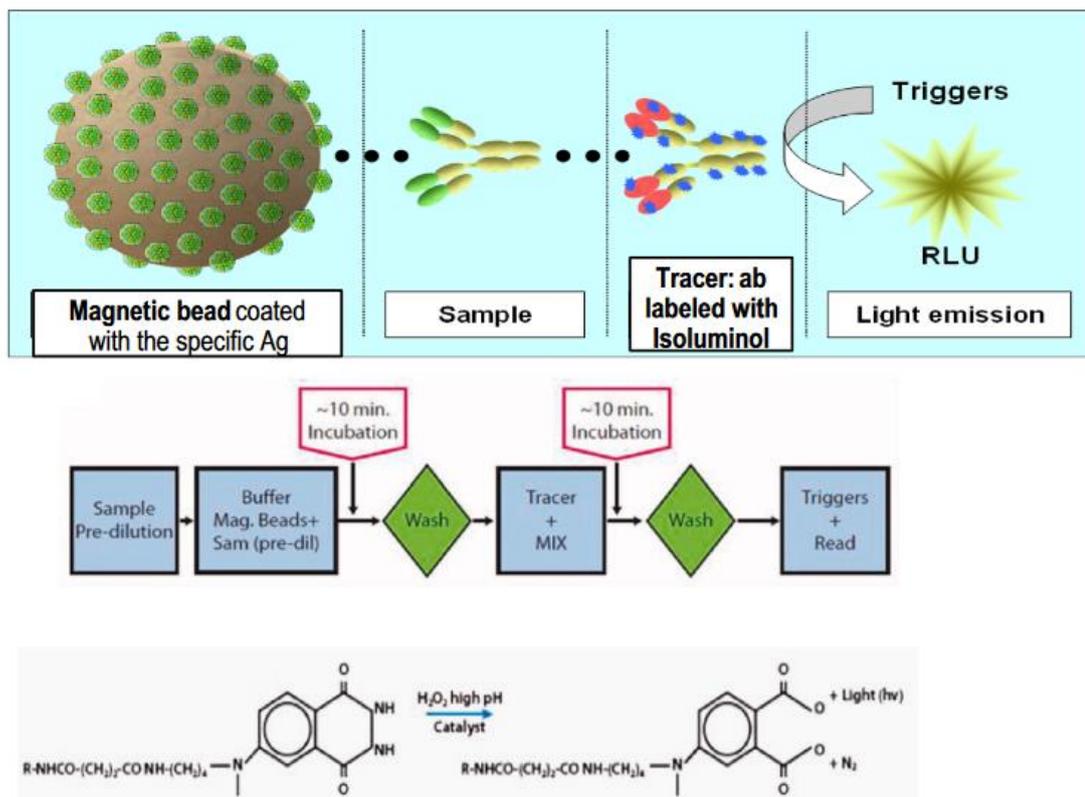


Figure 12 Principe de la chimiluminescence appliquée à la détection d'anticorps IgG spécifiques : une particule magnétique est recouverte de l'antigène d'intérêt (« coater »), les particules magnétiques « coatées » sont mise en présence de l'échantillon, après incubation un anticorps anti-IgG humain fixé à l'isoluminol est ajouté, la réaction est déclenché par l'ajout du « starter », puis la luminescence en RLU est mesurée

### Avantages et limites du CLIA

Les avantages de l'immunochemiluminescence sont nombreux : émission d'un signal lumineux important, pas de signal lumineux interférent (haute spécificité), acquisition du signal rapide, composés (conjugués et déclencheurs) très stables.

En revanche il existe quelques désavantages, comme le coût élevé des tests, des panels limités à quelques antigènes ou matrices, ainsi qu'un système analytique fermé (nous empêchant d'intervenir sur la dilution de l'échantillon par exemple). (31)

En outre, pour de nombreux systèmes de chimiluminescence, il existe un faible niveau de bruit de fond lumineux en l'absence d'analyte.

### **Automatisation et standardisation de la méthode**

L'utilisation d'automates analytiques basés sur la technologie CLIA permet un rendu de résultat plus rapide que les autres tests d'immuno-analyses, l'analyse durant en règle générale 30 à 40 minutes. La grande stabilité des réactifs permet une grande stabilité de la courbe de calibration, le logiciel de l'automate d'analyse permet le traitement automatique du résultat, la gestion des contrôles qualité internes et le suivi continu de tous les aspects des phases analytiques. De plus, il permet une reconnaissance des échantillons de patients, ainsi que des analyses associées demandées, limitant de façon importante les erreurs. L'automatisation permet aussi une meilleure productivité journalière (60 à 70 tests par heure).

### **Sensibilité**

La technologie CLIA permet une détection d'analytes à des quantités inférieures à celles des autres méthodes d'immunodosage. Cette technique est capable de déterminer la présence d'anticorps à des concentrations extrêmement faibles (de l'ordre de  $10^{-21}$  mol). La sensibilité de cette méthode peut permettre une détection d'anticorps beaucoup plus performante dans une matrice présentant une faible quantité d'anticorps tel que le liquide cérébro-spinal (31).

## 1.2.4. Synthèse intrathécale

### Principe général

La détermination d'une synthèse intrathécale consiste à étudier la présence ou non d'une synthèse d'immunoglobulines de type G (IgG), IgM ou d'IgA dans le LCS. Cette synthèse locale pouvant être le résultat de plusieurs pathologies : réaction inflammatoire auto-immune locale (ex : sclérose en plaque SEP), infection (ex : encéphalite herpétique, neuroborréliose etc.).

Le principe repose sur l'étude du rapport des IgG dirigés contre un pathogène entre le LCS et le sérum, par rapport au IgG totales de ces 2 compartiments. Une augmentation de la proportion d'IgG spécifiques dans le LCS signera la présence d'une synthèse locale.

La mise en évidence d'une synthèse intrathécale (SIT) d'IgG non spécifique (polyclonal ou monoclonal) est un élément essentiel au diagnostic de la sclérose en plaque (SEP) ainsi que des maladies inflammatoires du système nerveux central (32). Avant l'ère de la biologie moléculaire en routine, le diagnostic d'encéphalite herpétique reposait sur la mise en évidence d'une production locale d'immunoglobulines dirigées contre des herpèsvirus ainsi que la culture virale de LCS ou l'histologie sur tissu cérébral post-mortem (33).

Une recherche de la formule idéale du calcul de la synthèse intrathécale à partir de paramètres quantitatifs a donc été menée par de nombreux spécialistes. Tibbling et al. (34), Tourtelotte et Ma (35), Schuller et Sagar (36). Reiber et Felgenhauer (37) ont déterminé les formules qui se sont révélés les plus pertinentes (38). Tous ces spécialistes sont à la base des concepts sur le fonctionnement de la barrière sang-LCS (39).

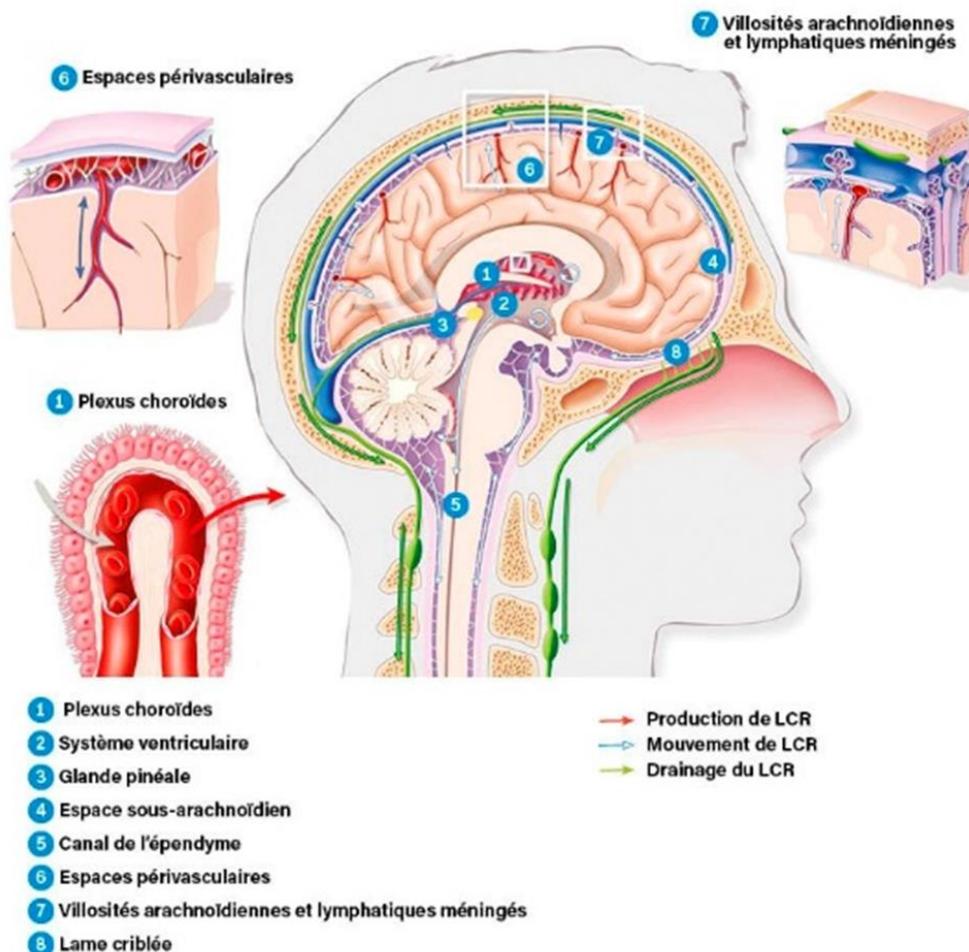
### Le liquide cérébro-spinal

Le liquide cérébro-spinal (LCS) occupe les espaces leptoméningés, péricérébraux et spinaux, ainsi que les ventricules cérébraux, soit un volume total chez l'adulte de 140 ml +/- 30 ml. Les échanges entre système nerveux, sang et LCS sont sous le contrôle de trois barrières :

- ❖ Hémato-encéphalique (BHE) (sang/système nerveux)
- ❖ Encéphalo-méningée (système nerveux/LCS)
- ❖ Hémato-méningée (BHM) (sang/LCS)

Le LCS en situation normale est d'apparence eau de roche, contient moins de 5 cellules par mm<sup>3</sup> (lymphocytes, monocytes, polynucléaires) et moins de 100 hématies par mm<sup>3</sup>. La protéinorachie varie entre 0,2 et 0,4 g/L en fonction de l'âge et est composée en majorité d'albumine. L'albumine ne provient jamais du SNC, elle est synthétisée uniquement au niveau du foie. De même, il n'existe pas de production locale d'immunoglobulines dans le LCS hors contexte pathologique, celles que l'on y retrouve sont d'origine sérique. Il existe des variations physiologiques interindividuelles de ces concentrations en protéines du LCS liées aux variations physiologiques de la perméabilité de la BHM et de leur concentration sérique. (40)

Le LCS est produit essentiellement au niveau des plexus choroïdes des ventricules cérébraux. Il passe des ventricules dans les citernes et les espaces sous arachnoïdiens péri-cérébraux et péri-médullaires, puis se déverse finalement dans le système nerveux central à travers les villosités arachnoïdiennes.



Sophiejacopin, illustration médical

Figure 13 Production et déplacement du LCS

La production de LCS varie avec l'âge, autour de 500mL/j chez l'adulte jeune (0,4 mL/min), et passe à environ 250mL/j chez le patient âgé (0,19mL/min). (41)

D'après Reiber, le LCS se déplace sous l'influence d'une force qui résulte du gradient de pression artérioveineux. Ce gradient de pression, donc le flux de LCS varie naturellement avec l'âge. La majorité des protéines comme l'albumine et les immunoglobulines sont transsudées à partir du sang, et d'autres comme la bêta-2-transferrine, la cystatine C, et la protéine S100 sont synthétisées par le SNC (42). Lors du ralentissement du flux de LCS, observé dans les maladies neurologiques, la concentration des protéines d'origine plasmatique augmente (41). Les différences de concentrations observées entre albumine et immunoglobulines s'expliquent par les différences de poids moléculaire et de taille, qui modifient le coefficient de diffusion. En moyenne, 1 molécule d'IgG du sérum sur 369 passe passivement dans le LCS. Pour l'albumine, le ratio est de 1 pour 230. Cette théorie remplace l'ancienne théorie des « brèches » dans la BHM.

C'est donc un ensemble de mécanismes qui permettent de maintenir un équilibre entre le milieu extracellulaire cérébrale et le sang. Le terme le plus approprié est donc « altération de la barrière hémato-méningée ».

Concernant la technique de prélèvement du LCS ou ponction lombaire (PL), le prélèvement se fait au niveau de l'espace sous-arachnoïdien entre 2 vertèbres sacrées, un volume de 10 à 15 ml chez l'adulte peut être prélevé.

Il faut, avant ce geste, écarter une contre-indication absolue : l'hypertension intracrânienne, suspectée devant certains signes cliniques évocateurs et confirmée par le fond d'œil (œdème papillaire) et/ou l'imagerie cérébrale.

L'analyse immunologique du LCS doit obligatoirement être couplée à celle du sérum du patient, prélevé le même jour.

## Les travaux de Hans Otto Reiber et Klaus Flegenhauer

H. Reiber et K. Felgenhauer, deux neurochimistes allemands publient en 1986 leurs travaux sur le transfert des protéines entre le sérum et le LCS. Ils déterminent le quotient de l'albumine et des immunoglobulines (Ig) G, IgA et IgM à partir de 396 patients sans synthèse intrathécale, avec ou sans une barrière hémato-méningée altérée, sans réponse immune impliquant le système nerveux central.

Une liste d'états pathologiques induisant une altération du fonctionnement de la BHM inclus dans leur étude a été établie :

- ❖ Tumeurs cérébrales et spinales sauf lymphome non-Hodgkinien, leucémie, carcinome métastatique, dysgerminome, tumeur après opération
- ❖ Premiers jours d'une méningite bactérienne ou virale
- ❖ Infarctus aigu du cerveau sauf embolisation métastatique, angéite, infarctus dans les maladies systémiques auto-immunes
- ❖ Phase initiale d'un syndrome de Guillain-Barré
- ❖ Polyneuropathies sauf paranéoplasique, dans les maladies systémiques auto-immunes, neurolyme
- ❖ Maladies dégénératives du SNC

Ils mesurent et calculent les quotients de l'albumine (Qalb) et des IgG (QIgG) pour chaque patient, et placent le Qalb en abscisse et QIgG en ordonnée.

$$\text{Quotient de l'albumine : } Qalb = \frac{\text{Alb LCS}}{\text{Alb Sérum}}$$

$$\text{Quotient des IgG : } QIgG = \frac{\text{IgG LCS}}{\text{IgG Sérum}}$$

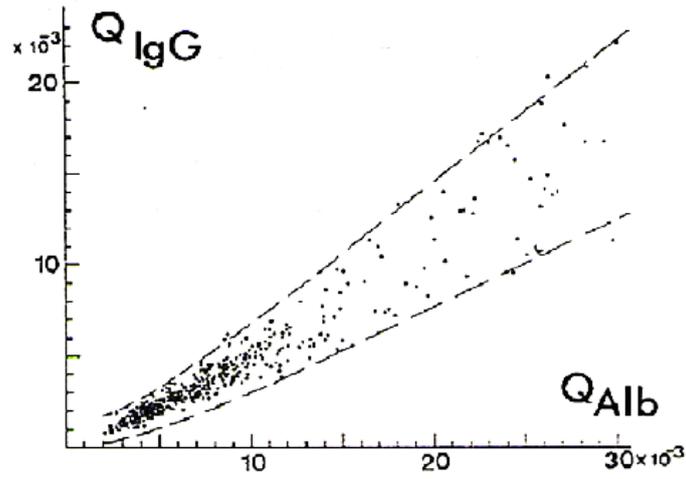


Figure 14 Évolution du QIgG de 361 patients en fonction du Qalb au cours de pathologies entraînant des altérations diverses de la barrière sang/LCS, mais pas de synthèse intrathécale (37)

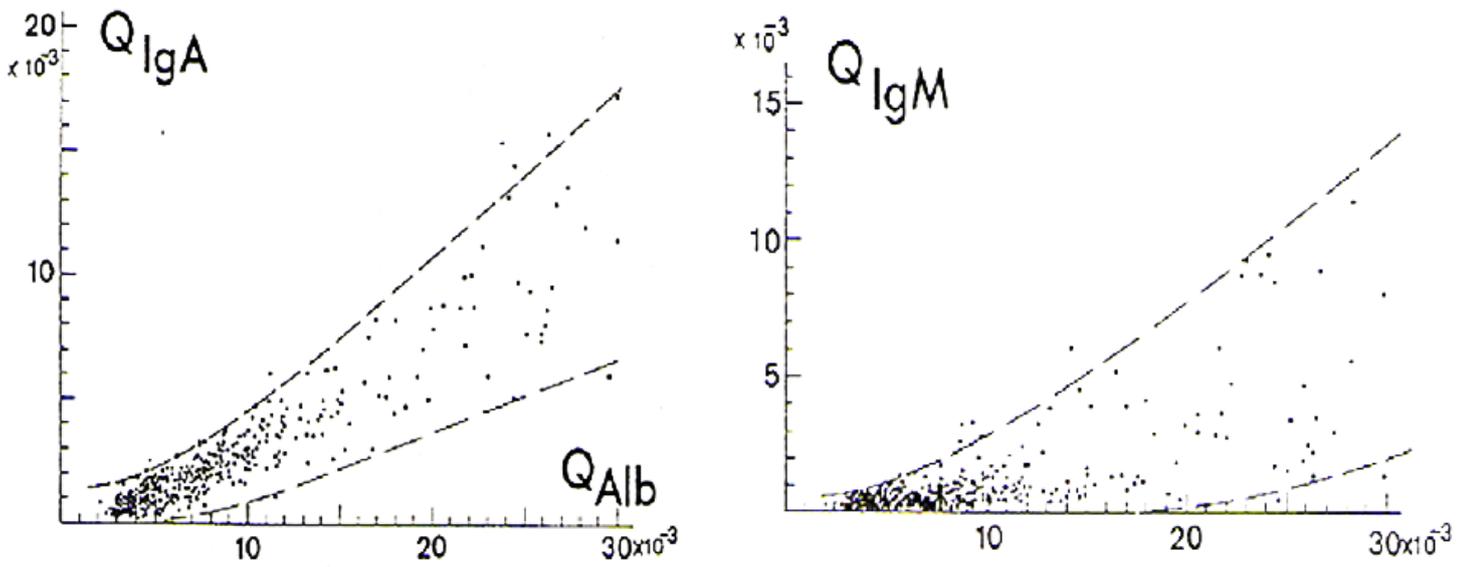


Figure 15 Evolution du QIgA et du QIgM en fonction du Qalb pour les mêmes patients

Ils observeront ainsi que les quotients entre l'albumine et les immunoglobulines ne suivent pas une fonction linéaire, mais hyperbolique. L'équation de la limite supérieure des nuages de points donnera :

$$Q(IgX) = \frac{a}{b} \sqrt{Q(Alb)^2 + b^2 - c}$$

Les coefficients a, b, et c sont propres à chaque immunoglobuline.

*Reiber et al* déterminent donc le quotient limite  $Q_{lim}$  représentant la discrimination entre un transfert passif dans le LCS et une synthèse locale des IgG basée sur des milliers d'observations de LCS. Le quotient limite ( $Q_{lim}$ ) d'une immunoglobuline donnée, IgG par exemple, représente la fraction d'IgG du LCS qui ne provient que du sang, calculé à partir du quotient de l'albumine du patient.

$$Q_{lim}(IgG) = 0,93 \sqrt{(Q_{Alb})^2 6 \times 10^{-6} - 1,7 \times 10^3}$$

### Appréciation de l'intégrité de la barrière hémato-méningée

Pour interpréter les variations de la concentration en IgG dans le LCS, il faut connaître l'état de la barrière sang-LCS. En effet, si cette barrière est altérée, la quantité d'IgG transsudées dans le LCS augmente (et est d'autant plus élevée que la concentration des IgG dans le sang est élevée).

Le  $Q_{alb}$  est le marqueur de choix de l'état de la barrière sang-LCS car l'albumine est synthétisée exclusivement par le foie (elle ne provient jamais du SNC et sa présence reflète une diffusion passive)

Rappelons aussi l'importance de l'âge sur le flux de LCS et donc sur la barrière hémato-méningée. A la naissance, le flux de LCS est très faible, mais augmente dès le premier mois de vie et est maximale à l'âge de 1 an, puis se stabilise. A partir de 5 ans il diminue de façon constante au long de la vie (41). Le quotient de l'albumine ( $Q_{alb}$ ) augmente donc lentement à partir de l'âge de 5 ans suivant la relation suivante :

$$Q_{alb} \text{ théorique} = \left(4 + \frac{\text{âge}}{15}\right) : 1000$$

Le rapport entre le quotient de l'albumine et le quotient théorique du patient nous renseigne sur l'intégrité de la BHM. Un rapport supérieur à 1, soit un quotient de l'albumine supérieur au quotient théorique, signifie une altération de la barrière.

$$RQ_{alb} = \frac{Q_{alb}}{Q_{alb} \text{ théorique}}$$

En raison de l'importante répercussion de l'âge sur la barrière, il faut donc interpréter les différents coefficients en fonction de l'âge.

## Diagramme de Reiber

Afin de faciliter l'interprétation des résultats des dosages, Reiber a créé un diagramme logarithmique avec en abscisse différentes valeurs de  $Q_{alb}$  et en ordonnée différentes valeurs de  $Q_{IgG}$ . L'index IgG du patient se positionne sur une de ces zones. Au centre du diagramme se trouve le  $Q_{lim}$  qui est la valeur optimale des  $Q_{IgG}$  pour laquelle on peut affirmer l'absence de synthèse intrathécale en fonction du  $Q_{alb}$ .

Cette limite a été déterminée à partir des données de 4300 patients (43). Elle est basée sur la moyenne des valeurs observées majorée de trois écart-types. Tout index supérieur correspondra à une synthèse intrathécale.

Ce diagramme est partagé en 5 zones. L'intersection des points entre  $Q_{alb}$  et  $Q_{IgG}$  permettra de visualiser s'il existe une synthèse intrathécale IgG et/ou une dysfonction de la barrière hémato-méningée.

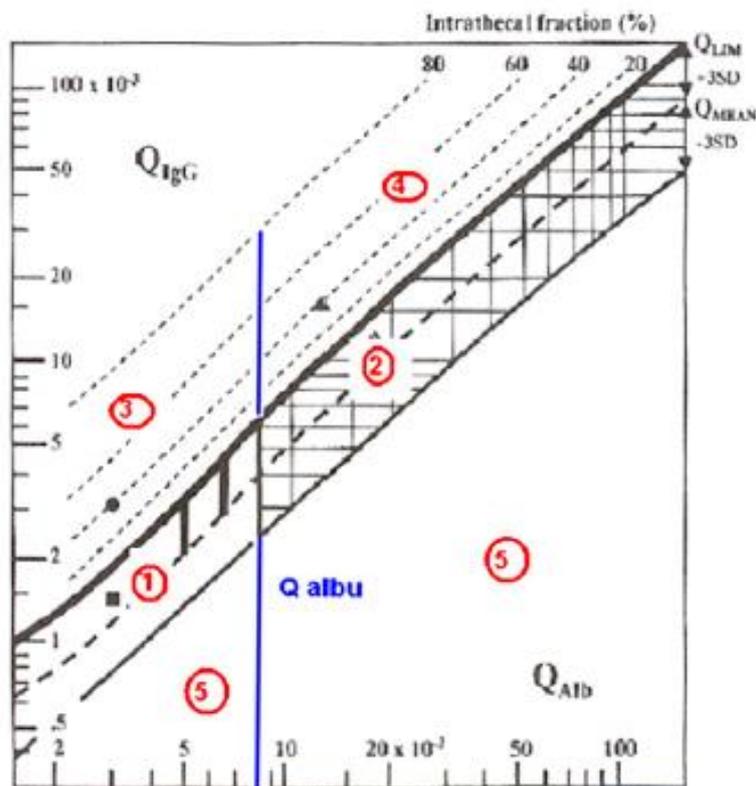


Figure 16 Les différentes zones du diagramme de Reiber : 1 : zone des valeurs normales ; 2 : altération de la barrière sans synthèse intrathécale ; 3 : synthèse intrathécale sans altération de la barrière ; 4 : synthèse intrathécale et altération de la barrière ; 5 : zone des résultats physiologiquement impossibles. La courbe centrale représente le  $Q_{lim}$ , au-dessus, il existe une synthèse intrathécale.

A noter que nous parlons ici de synthèse intrathécale d'IgG totale/polyclonale, et qu'il peut exister une synthèse intrathécale IgG dirigée contre un virus spécifique sans synthèse intrathécale polyclonale comme définit précédemment par Reiber. Reiber ne prend pas en compte dans sa première approche la synthèse intrathécale d'IgG spécifique à un virus.

## Intérêt de la détection d'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines au cours d'une infection du système nerveux central

Au cours des infections du SNC, virale, bactérienne, fongique ou parasitaire, des immunoglobulines G, A et M peuvent être synthétisées dans le LCS (32).

La réponse immunitaire au sein du LCS s'exprime différemment de celle du sérum : il n'y a pas de classique séroconversion avec apparition des IgM dans un premier temps puis des IgG. Dès le début de la maladie plusieurs classes d'immunoglobulines peuvent être présentes dans le LCS. Elles varient dans le temps et sous l'influence de traitements. Leur présence peut même parfois révéler une infection ancienne (neurosyphilis, encéphalite herpétique) (44).

Au cours de la phase aiguë de l'infection, ce sont l'examen direct et les techniques de culture ou de biologie moléculaire qui permettent un diagnostic rapide. Mais après la phase aiguë ou bien lorsque la PCR ou la culture est négative, il est possible de suivre la maladie ou l'efficacité du traitement en suivant l'évolution de l'index des immunoglobulines selon la méthode de Reiber (43), ou tout simplement de rechercher une étiologie à une encéphalite infectieuse dont le germe n'a pas été identifié.

Dans le cas d'infections du SNC, la BHM peut être fortement altérée, avec donc un risque de Qalb très élevé. Il est donc impératif d'interpréter l'index anticorps à l'aide des formules ou du diagramme de Reiber.

Afin de déterminer la nature de l'agent infectieux, Reiber a appliqué ses formules aux dosages des anticorps spécifiques des agents infectieux dans le LCS et le sérum. Il définit donc l'index d'anticorps spécifique appelé AI (45).

La détermination de l'AI repose sur le dosage des anticorps spécifiques dans le LCS et le sérum. Dans un premier temps, il faut calculer le quotient spécifique des anticorps anti-organisme recherché, qui est le rapport de la concentration en anticorps spécifique dans le LCS sur la concentration en anticorps spécifique dans le sérum :

$$Q_{spé} = \frac{\text{IgG spé LCS}}{\text{IgG spé Sérum}}$$

On détermine ensuite le rapport des immunoglobulines G totales dans le LCS ainsi que dans le sérum :

$$Q_{IgG} = \frac{\text{IgG LCS}}{\text{IgG Sérum}}$$

Ce qui nous permet de calculer l'index anticorps AI :

$$AI = \frac{Q_{spé}}{Q_{IgG}} \text{ si } Q_{IgG} < Q_{lim}, \text{ sinon } AI = \frac{Q_{spé}}{Q_{lim}}$$

De façon normale, un AI se situe entre 0,7 et 1,3 (n=250 patients témoin, pour tous les types d'anticorps). S'il est supérieur à 1,4 nous pouvons considérer qu'il existe une synthèse intrathécale d'anticorps IgG spécifique de l'agent pathogène recherché. Il faut néanmoins

savoir que le dosage précis, en parallèle, des anticorps spécifiques entre le sérum et le LCS présentent plusieurs difficultés en raison de la concentration en anticorps très faible dans le LCS ainsi que des erreurs de mesures possibles lors des dilutions (46).

### La synthèse intrathécale dans les encéphalites

Dans les encéphalites herpétiques, on retrouve d'après les données de la littérature des années 1980, des taux significatifs d'anticorps dans le LCS dans 25 % des cas au 4<sup>ème</sup> jour de la maladie, dans 50 % des cas au 10<sup>ème</sup> jour, et cette production locale peut persister plus de 2 ans (47,48).

Un article paru dans *Médecine et Maladies infectieuses* en 1985 (49), a titré par technique ELISA les IgG et IgM anti HSV-1, rougeole, rubéole, VZV, oreillons et cytomégalovirus dans le LCS et le sérum de 31 patients hospitalisés au CHU de Toulouse pour une encéphalite, ainsi que de 31 patients témoins (provenant de Neurologie, présentant des atteintes vasculaires, syndromes neurodégénératifs, atteintes neurologiques non organiques etc.). Il se sont basés sur la formule de *Tibbling et al*, et ont fixé un ratio supérieur à 3 comme seuil de positivité. Ils n'utilisent donc pas la correction de Reiber.

$$AI \text{ selon Tibbling} = \frac{IgG \text{ LCS}}{IgG \text{ sérum}} > 3$$

Ils observent une synthèse intrathécale chez 13 malades et 4 témoins : 5 cas de rougeole, 3 cas d'HSV-1, 3 cas de VZV et 2 cas de rubéole. Une synthèse simultanée pour la rougeole, la rubéole, au VZV et aux oreillons a été observée chez un cas de neurosyphilis. Chez les 4 témoins, une SIT rougeole a été observée, dont 2 avec une SIT HSV-1 et rubéole.

Les résultats de cette étude, qui confirment d'autres études menées en Scandinavie (48), nous montrent qu'il faut absolument interpréter les résultats de synthèse intrathécale anti-virus avec précautions. La synthèse peut être liée à une stimulation non spécifique (50).

### Les autres travaux sur la synthèse intrathécale et la détermination de la formule idéale

Une étude de menée en 1990 a déterminé les synthèses intrathécales de 1007 patients, à l'aide de 6 formules de calcul de différents spécialistes : IgG index (34), Log index (51), IgG/albumine ratio, la formule de Schuller (52), la formule de Tourtelotte (53) et la formule de Reiber (54).

Cette étude détermine la sensibilité et la spécificité de chaque formule pour la détermination d'une présence de synthèse intrathécale ou non, et ce sont les formules de *Reiber et al* qui sont les plus performantes (38).

Tableau 1 Sensibilités, spécificités et efficacités des différentes formules (38)

	Sensibilité	Spécificité	Efficacité
<b>Schuller</b>	71,99	72,27	72,19
	53,19	88,55	78,65
<b>Ratio IgG/Alb</b>	72,70	74,34	73,88
	58,50	88,68	80,24
<b>Tourtellotte</b>	76,95	76,55	76,66
	70,57	83,44	79,84
<b>Reiber</b>	76,24	76,14	76,16
	60,78	92,41	83,42
<b>Index</b>	76,95	76,83	76,86
	57,80	91,40	82,03
<b>Log index</b>	76,95	76,41	76,86
	57,10	91,86	82,13

## Objectifs de l'étude expérimentale

---

1. La première partie de cette étude a pour objectif d'évaluer 2 techniques automatisées permettant la détection des anticorps spécifiques IgG de type HSV-1 et HSV-2, à l'aide de 2 trousse de DiaSorin® (une détectant les IgG anti-HSV-1 et une détectant les IgG anti-HSV-2), comparées aux 2 trousse homologues fournies par Abbott®. La mise en place de la sérologie différenciée HSV-1/HSV-2 étant recommandée par la NABM, nous avons souhaité évaluer les performances des nouvelles trousse Abbott par rapport à celles de DiaSorin®.
2. La deuxième partie de cette étude consiste à mettre au point une technique permettant de déterminer la synthèse intrathécale des IgG anti-*alpha*herpèsvirus à partir d'outils de mesure développés initialement pour le sérum. La détermination d'une synthèse intrathécale avec production d'immunoglobulines de type G (IgG) anti-HSV ou anti-VZV permet le diagnostic rétrospectif d'encéphalite ou méningo-encéphalite herpétique, ou d'encéphalite varicelleuse. Dans de très rares cas, la biologie moléculaire à la recherche d'ADN d'HSV-1, HSV-2 ou de VZV est négative malgré un tableau clinique et une IRM typique d'encéphalite herpétique. Le taux d'encéphalites herpétiques faussement négatives est inférieur à 0,4% (50). Une étude menée au CHU de Limoges en 2009 a rapporté 3 cas de patients avec un tableau d'EH et une biologie moléculaire négative chez lesquels une SIT d'anticorps anti-HSV a été objectivée avec les formules de Tibbling-Link (51), ce qui a conduit au maintien du traitement par aciclovir pour les 3 patients. Une mise en évidence d'immunoglobuline anti-HSV ou anti-VZV dans le LCS permet ainsi d'apporter une contribution significative au diagnostic. Enfin, il a aussi été montré par Reiber et al. que le suivi de l'efficacité du traitement antiviral ainsi que l'évolution de la maladie peuvent être réalisés à l'aide de la décroissance de l'index anticorps (38).

## Matériel et méthodes

---

### 2.1. Evaluation de trousse automatisées permettant la détection des anticorps spécifiques IgG de type HSV-1 et HSV-2.

#### 2.1.1. Echantillons de l'étude

Cette étude inclut 173 échantillons de sérum stockés en sérothèque au CBRS du CHU de Limoges durant la période de janvier 2020 à juillet 2021. Les échantillons ont été conservés à -20°C, et analysés en mai 2022 dans le cadre de cette étude. 149 présentent une sérologie positive en IgG HSV1+2 (Technique DiaSorin® sur LiaisonXL) et 24 sont négatifs. Les sérologies IgG VZV (Liaison XL, DiaSorin®) ont été préalablement testées en parallèle de la sérologie initiale pour évaluer d'éventuelles réactions croisées (164 positifs et 9 négatifs).

#### 2.1.2. Description des trousse utilisées

##### 2.1.2.1. HSV-1/2 IgG DiaSorin®

La méthode pour la détermination qualitative des IgG spécifiques anti-HSV est un test indirect basé sur le principe de l'immunoluminométrie (CLIA). Des protéines recombinantes (non précisées par le fournisseur) de l'HSV sont utilisées pour revêtir les particules magnétiques (phase solide) et un anticorps monoclonal de souris est lié à un dérivé de l'isoluminol (conjugué anticorps-isoluminol). Pendant la première incubation, les anticorps anti-HSV présents dans les étalons, les échantillons ou les contrôles se lient à la phase solide. Pendant la seconde incubation, l'anticorps conjugué réagit avec les IgG anti-HSV déjà liées à la phase solide. Après chaque incubation, le matériel non lié est éliminé par un cycle de lavage. Ensuite, la réaction de chemiluminescence débute par l'injection automatique des réactifs starter dans les modules réactionnels. Le signal lumineux, et par conséquent la quantité de conjugué anticorps-isoluminol, est mesuré par un photomultiplicateur en unités relatives de luminescence (RLU, relative light units) et est indicatif de la concentration d'IgG anti-HSV présente dans les étalons, les échantillons ou les contrôles.

Seuil de positivité : >1 index ; seuil de détection : 0,5 index ; limite haute de détection : 30 index ; douteux si entre 0,9 e 1,1 index.

##### 2.1.2.2. HSV-1 IgG et HSV-2 IgG DiaSorin®

Ces trousse permettent la détection spécifique des immunoglobulines de type G (IgG) dirigées contre l'HSV-1 et l'HSV-2 de façon qualitative dans le sérum humain. C'est un dosage immunologique par chimiluminescence (CLIA) indirect utilisé avec l'analyseur LIAISON XL®.

Un antigène recombinant gG1 de HSV-1 ou gG2 de HSV-2 est fixé sur des particules magnétiques (phase solide). Le reste de la procédure est similaire à celle décrite pour le réactif HSV-1/2 IgG DiaSorin® utilisé pour le dosage des anticorps IgG anti-HSV-1 et anti-HSV-2 poolés

Seuil de positivité : >1 index ; seuil de détection : 0,5 index ; limite haute de détection : 30 index ; douteux si entre 0,9 e 1,1 index.

### 2.1.2.3. HSV-1 IgG et HSV-2 IgG Abbott®

Ces 2 trousse permettent la détection spécifique des immunoglobulines de type G (IgG) dirigées contre l'HSV-1 ou l'HSV-2 de façon qualitative dans le sérum humain. C'est un dosage immunologique microparticulaire par chimiluminescence (CMIA) utilisé avec l'analyseur ALINITYi®.

L'échantillon, les microparticules paramagnétiques recouvertes d'antigènes gG1 ou gG2 recombinants spécifiques d'HSV-1 ou HSV-2 et le diluant de dosage sont mis en présence et incubés. Les anticorps IgG dirigés contre HSV-1 ou HSV-2 présents dans l'échantillon se lient aux microparticules recouvertes d'antigènes recombinant spécifiques de l'HSV en question. Après lavage, le conjugué d'anticorps anti-IgG humaines marqué à l'acridinium est ajouté pour former un mélange réactionnel puis incubé. Après un autre cycle de lavage, les solutions de préactivation et d'activation sont ajoutées. La réaction chimiluminescente résultante est mesurée en unités relatives de lumière (RLU). Il existe une relation directe entre la quantité d'IgG anti-HSV-1 ou anti-HSV-2 présente dans l'échantillon et les RLU détectées par le système optique.

La présence ou l'absence d'IgG anti-HSV-1 ou HSV-2 dans l'échantillon est déterminée en comparant les URL chimiluminescentes de la réaction à la valeur URL seuil déterminée à l'aide d'une courbe de calibration active.

### 2.1.2.4. Immunoblot HSV

La technique d'immunoblot Virotech Diagnostics HSV LINE IgG a été réalisée sur les échantillons présentant des résultats discordants. Elle permet la distinction qualitative entre HSV-1 et HSV-2. Ce kit possède une concordance, une sensibilité et une spécificité respectivement de 99,48 %, 98,11 % et 100 %, en comparaison avec des tests ELISA et de chimiluminescence (55).

La bandelette HSV présente 3 bandes d'interprétation, la première « antigène HSV total », la seconde « glycoprotéine G1 » et la troisième « glycoprotéine G2 ». Les trois bandes s'interprètent en fonction de l'intensité de la bande gG2 qui est la bande « cut-off ». Les recommandations d'interprétation par le kit sont les suivantes :

Assessment of bands			Overall interpretation	
HSV total antigen	gG1	gG2	HSV-1	HSV-2
-	-	-	negative	negative
only one isolated band			negative	negative
+	borderline	-	borderline	negative
+	-	borderline	negative	borderline
+	borderline	borderline	borderline	borderline
+	+	-	positive	negative
+	-	+	negative	positive
+	borderline	+	borderline	positive
+	+	borderline	positive	borderline
+	+	+	positive	positive

Figure 17 Interprétation de l'immunoblot HSV ViroTech Diagnostics ®

### 3.1.1. Statistiques

Le test Kappa de Cohen permet d'évaluer l'accord entre 2 observateurs. C'est l'outil le plus utilisé pour évaluer la concordance et la reproductibilité de mesures.

L'accord observé entre un ou plusieurs jugements qualitatifs, résulte de la somme d'une composante « aléatoire » (hasard) et d'une composante d'accord « véritable » (réel). Mais la part du hasard gêne notre appréciation. Pour contrôler ce hasard, le coefficient Kappa (K) propose de chiffrer l'intensité ou la qualité de l'accord réel (56). C'est un indice qui permet de « retirer » la portion de hasard ou de subjectivité de l'accord entre les techniques.

Les données sont mises sous forme de tableau de contingence, on établit l'hypothèse H0 d'indépendance des jugements ( $K = 0$ ) (des techniques de dosage biologique dans notre cas), et H1 ( $K > 0$ ), puis on calcule les différentes proportions utilisées par le test de Cohen (Proportion d'accords observés, proportion d'accord dus au hasard etc.)

$$K = \frac{\text{Proportion d'accords observés} - \text{proportions d'accords dus au hasard}}{100 - \text{proportions d'accords dus au hasard}}$$

Nous comparons ensuite le coefficient Kappa au classement de Landis et Koch afin de déterminer le degré d'accord entre les 2 techniques (57).

Accord	Kappa
Excellent	0,81
Bon	0,80 - 0,61
Modéré	0,60 - 0,21
Mauvais	0,20 - 0,0
Très mauvais	< 0,0

Figure 18 Degrés d'accord et valeur Kappa proposé par Landis et Koch

Les calculs pour le test Kappa ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad®.

Afin d'évaluer les performances d'une méthode diagnostique au moyen de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives, il est nécessaire d'avoir une méthode de référence. Les échantillons ont donc été classés comme positifs ou négatifs sur la base d'un consensus de résultat (au moins 2 tests positifs ou négatifs avec 2 techniques différentes). En cas de discordance entre les 2 techniques de chimiluminescence (Abbott® et DiaSorin®), l'immunoblot a permis de conclure. Une fois le statut de référence de l'échantillon établi, nous avons pu déterminer les performances de chacune des trousse.

## **3.2. Mise en place d'une technique de détection de synthèse intrathécale alphaherpèsvirus (HSV et VZV)**

### **3.2.1. Contexte**

Nous avons à notre disposition une trousse permettant la détection qualitative d'anticorps IgG anti-HSV (sans distinction HSV-1 et HSV-2) ainsi qu'une trousse permettant la détection quantitative d'anticorps anti-VZV. Ces 2 techniques de dosage sont effectuées sur l'analyseur LiaisonXL®, qui est un automate présent dans la plupart des laboratoires d'analyses médicales français. Le développement d'une nouvelle technique de dosage sur ce type d'automate permettra donc une exportation simplifiée de la technique vers tous les laboratoires souhaitant acquérir la méthode.

Il faut savoir que ces 2 trousse/techniques de dosages ont été développées pour une seule matrice, le sérum. Le premier défi de ce travail est donc de les adapter pour un dosage sur liquide cérébro-spinal (LCS).

Nous étudierons donc en premier lieu le bruit de fond de ces 2 techniques sur LCS négatifs afin de déterminer un seuil de négativité.

Ensuite nous mettrons en place une succession de dilution de sérums positifs en HSV/VZV dans du LCS afin d'observer la linéarité, reproductibilité des techniques qualitatives et quantitatives.

Enfin en dernier point nous calculerons la synthèse intrathécale (SIT) à partir de couples LCS/sérums adressés au laboratoire dans le cadre de troubles neurologiques divers.

### **3.2.2. Techniques utilisées**

#### **3.2.2.1. Dosages des anticorps IgG anti-HSV et anti-VZV**

Nous avons fait le choix d'utiliser les 2 techniques de dosages d'IgG anti-HSV ou VZV, utilisées sur l'analyseur LiaisonXL®, en routine au laboratoire de virologie du CHU de Limoges.

Le test « LIAISON® HSV-1/2 IgG DiaSorin® » permet la détection qualitative d'anticorps IgG anti-HSV, sans discrimination d'HSV-1 et d'HSV-2. La méthode est un test indirect basé sur le principe de l'immunoluminométrie, ou *chimiluminescence immuno assay* (CLIA). Des protéines recombinantes de l'HSV sont utilisées pour revêtir les particules magnétiques (phase solide) et un anticorps monoclonal de souris est lié à un dérivé de l'isoluminol (conjugué anticorps-isoluminol). Le volume minimum d'échantillon nécessaire est de 190 µL (40 µL d'échantillon + 150 µL de volume mort). La dilution de l'échantillon par l'automate n'est pas précisée dans la notice et le département Recherche et Développement de Diasorin ne nous a pas fourni d'informations complémentaires.

Le test « VZV LIAISON® VZV IgG DiaSorin® » est quant à lui une technique quantitative de mesure des IgG spécifiques anti-VZV, basé sur le principe de l'immunoluminométrie (CLIA). L'antigène du virus zoster-varicelle (extrait partiellement purifié de cultures cellulaires infectées, souche ROD) est utilisé pour revêtir les particules magnétiques (phase solide).

Le volume minimum d'échantillon nécessaire est de 170 µL (20 µL d'échantillon + 150 µL de volume mort). La dilution de l'échantillon par l'automate est elle aussi non précisée pour cette technique.

### 3.2.2.2. Dosage de l'albumine

Le dosage de l'albumine est réalisé sur l'automate BN II ® de Siemens®, aussi bien sur sérum que sur LCS dans le service d'immunologie du CHU de Limoges. Le principe du dosage repose sur l'immunonéphélométrie, un anticorps anti-albumine se fixe sur sa cible et forme des immun-complexes. La dispersion du faisceau lumineux par les immun-complexes est mesurée et comparée à une gamme étalon de concentrations standards connues. Les sérums sont dilués au rapport 1 : 400 et les LCS sont dilués au rapport 1 : 5. La prise d'essai est de 15 µL (avec 10 µL de volume mort en cupule Eppendorf).

### 3.2.2.3. Dosage des IgG totales

Le dosage des IgG totales est réalisé sur l'automate BN II ® de Siemens®. Le principe du dosage se base sur l'immunonéphélométrie : la réaction entre l'anticorps anti-IgG humain et les protéines présentes dans la matrice analysée (formant des immun-complexes) est mesurée grâce à l'intensité de la dispersion de la lumière projetée. L'intensité mesurée est ensuite comparée à une courbe d'étalonnage basée sur des standards de concentrations connus. Les sérums sont dilués au rapport 1 : 400 et les LCS sont dosés pur. L'antisérum IgG est d'origine animale, obtenu par immunisation de lapins avec des immunoglobulines humaines IgG hautement purifiées. Il n'a pas été détecté de réaction croisée avec des IgM par le fournisseur. La prise d'essai est de 100 µL (avec 10 µL de volume mort en cupule Eppendorf).

### 3.2.2.4. Isoélectrofocalisation

La technique utilisée est l'isoélectrofocalisation sur gel d'agarose dans le système semi-automatique HYDRASYS®, fourni par SEBIA®. Brièvement, le principe repose sur l'isoélectrofocalisation des protéines du LCS, c'est-à-dire la séparation des protéines sur gel en fonction de leurs point isoélectrique et poids moléculaire. Une deuxième étape d'immunofixation à l'aide d'un antisérum IgG couplé à la peroxydase permet de révéler la présence ou non de bandes supplémentaires oligoclonales spécifiques dans le LCS comparé au sérum. Les 187 LCS et sérums couplés de l'étude ont bénéficié de cette technique.

Le profil du LCS est dit « oligoclonal » en présence de quelques bandes supplémentaires dans le LCS par rapport au sérum, « monoclonal » si une seule bande supplémentaire est observée dans le LCS, et « polyclonal » si aucune bande supplémentaire n'est visible.

Le test exact de Fisher est utilisé pour comparer les index anticorps positifs avec la présence ou non de bandes oligoclonales. Ce test est une alternative au test de Chi-deux lorsque les échantillons sont faibles (<5). Le principe de ce test est de déterminer si la configuration observée dans le tableau de contingence est une situation extrême par rapport aux situations possibles compte tenu des distributions marginales, H0 : les variables X et Y sont indépendantes.

### 3.2.2.5. Détection de l'ADN viral par PCR

La PCR dite « triplex » RealStar® *alphaherpèsvirus* PCR Kit 1.0 (Altona diagnostic®) détecte l'ADN de HSV-1, HSV-2 et VZV.

Le test repose sur la technologie de PCR en temps réel, utilisant une réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences cibles spécifiques et de sondes cibles

spécifiques pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent (reporter) et un extincteur de signal (quencher).

Les sondes spécifiques de l'ADN du HSV-1 sont marquées par le fluorophore ROX™, tandis que les sondes spécifiques de l'ADN du HSV-2 sont marquées par un fluorophore Cy@5 et les sondes spécifiques de l'ADN du VZV sont marquées par le fluorophore FAM™. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée par le fluorophore JOE™. L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ADN spécifique du HSV-1, du HSV-2, du VZV, et du contrôle interne dans les canaux correspondants de l'instrument de PCR en temps réel. Les réactifs dits « Master A et B » contiennent le contrôle interne, le tampon de PCR, l'ADN polymérase, les amorces et les sondes.

La technique de PCR est réalisée sur l'automate CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), et demande un volume minimum de LCS de 200 µL avant extraction.

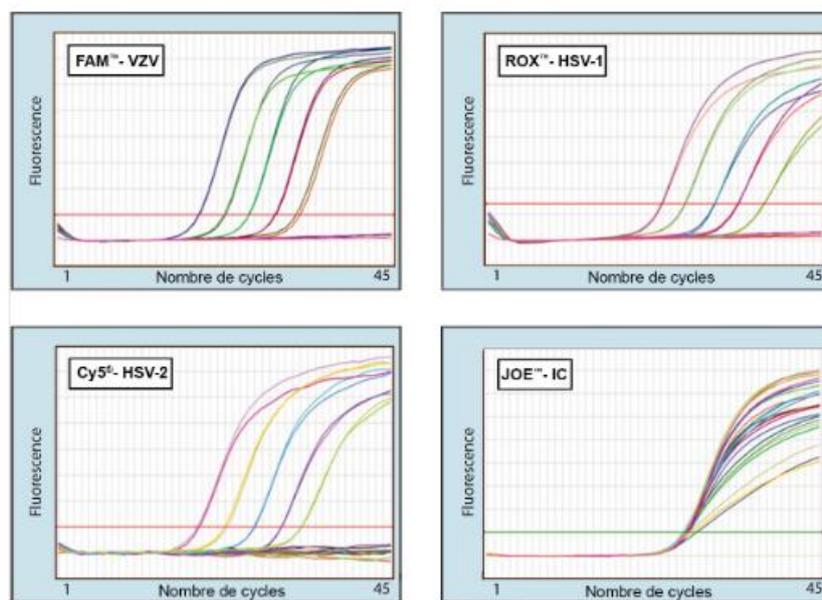


Figure 19 Exemples de PCR du kits RealStar *alphaherpesvirus*  
Les échantillons positifs en VZV génèrent des signaux dans le canal de détection FAM™. Les échantillons positifs en HSV-1 génèrent des signaux dans le canal de détection de ROX™ et les échantillons positifs en HSV-2 génèrent des signaux dans le canal de détection de Cy@5. Le contrôle interne génère des signaux dans le canal de détection JOE™.

### **3.2.3. Détermination du bruit de fond**

Nous avons sélectionné de façon aléatoire 30 LCS envoyés dans le service de Bactériologie du CHU de Limoges afin de déterminer le bruit de fond en unité relative de luminescence (RLU) avec les techniques de dosages LIAISON® HSV-1/2 IgG DiaSorin® et LIAISON® VZV IgG DiaSorin®.

Ces 30 LCS sont négatifs en culture bactérienne à 5 jours, et 18 ont été testés en PCR triplex HSV-1, HSV-2, VZV et retrouvés négatifs.

### **3.2.4. Détermination de l'équation de la droite pour le dosage des anticorps**

Pour rappel, la technique HSV possède un intervalle de mesure située entre 0,5 et 30 d'index et un seuil de positivité à 1. Concernant la technique VZV, l'intervalle de mesure se situe entre 10 et 4000 mUI/mL et le seuil de positivité est à 135 mUI/mL.

Étant donné la faible concentration en immunoglobulines du LCS, beaucoup de valeurs sont rendues inférieures au seuil de détection. Cependant un signal est mesurable en RLU (Relative Light Unit). Afin de s'affranchir de ce seuil <0.5 index pour HSV et <10 UI/mL pour VZV, nous avons décidé d'utiliser la valeur en RLU donnée par l'analyseur.

L'analyseur LiaisonXL utilise 2 points de gamme d'étalonnage et trace une courbe non linéaire, hyperbolique, que ce soit pour la technique LIAISON® HSV-1/2 IgG DiaSorin® ou la technique LIAISON® VZV IgG DiaSorin® (figure 20 et 21).

L'équation de la courbe étant à la discrétion du fabricant, nous avons utilisé les différents points mesurés à partir des couples LCS/Sérum pour la déterminer, obtenir une droite linéaire, et extrapoler les concentrations inférieures au seuil.

Nous avons analysé 187 couples LCS/Sérum en technique IgG HSV et VZV, soit 374 résultats d'IgG HSV et VZV toutes matrices confondues.

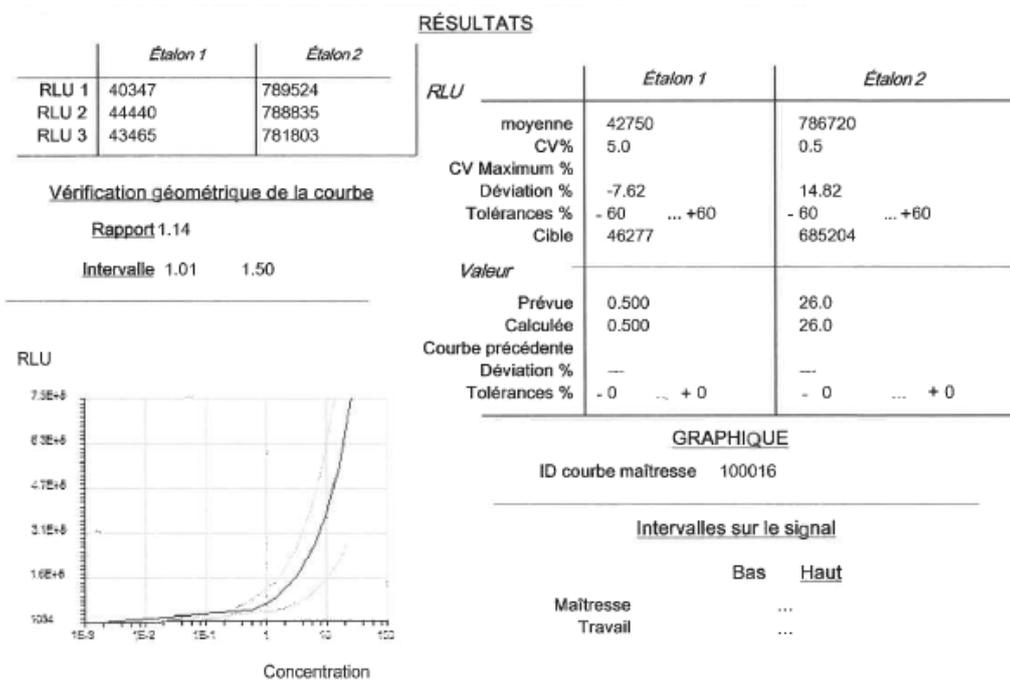


Figure 20 Étalonage et courbe utilisé par l'analyseur LiaisonXL® pour le dosage des IgG anti-HSV. Chacun des deux étalons est mesuré 3 fois, la moyenne des 3 valeurs est utilisée.

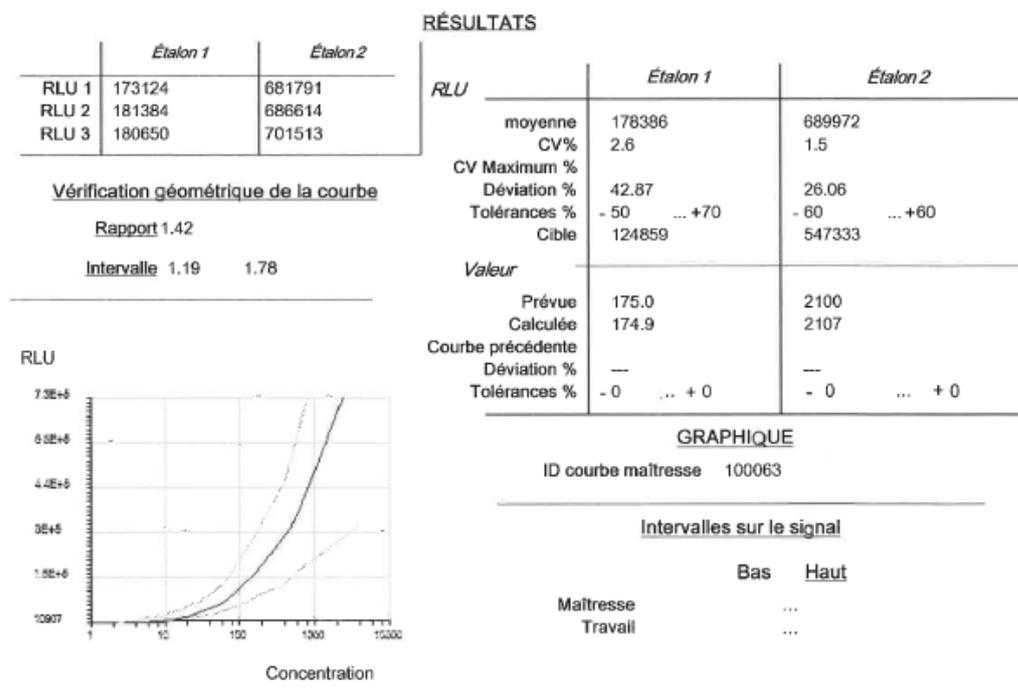


Figure 21 Étalonage et courbe utilisé par l'analyseur LiaisonXL® pour le dosage des IgG anti-VZV

### 3.2.5. Dilution successive de sérums dans du LCS

L'objectif de ce test de dilution est d'étudier la réponse et la linéarité de l'unité lumineuse rendue par l'automate. Pour ce faire différents sérums à différentes concentrations connues en HSV-G et VZV-G ont été sélectionnés. Le fournisseur ne décrit aucune interférence avec les IgG potentiellement interférents (EBV EBNA et VCA, Toxoplasma, anti-nucléaires etc ...). La matrice pour réaliser les dilutions est un liquide de dérivation d'un patient de neurochirurgie, qui a été testé préalablement négatif en culture bactérienne, et négatif en PCR HSV/VZV, ainsi qu'en sérologie IgG HSV et VZV. Sa cellularité était inférieure à une cellule par mm<sup>3</sup>.

#### 3.2.5.1. Dilution des IgG VZV dans une matrice LCS

Nous avons sélectionné 3 sérums avec des taux d'IgG anti-VZV différents : un faible, un moyen, ainsi qu'un fort.

Les caractéristiques des 3 sérums tests utilisés pour dilution sont décrites dans le tableau 2.

Tableau 2 Les 3 sérums positifs en IgG VZV, un seul est positif en IgG HSV

Titre	IgGHSV1+2	IgGVZV
<b>Fort</b>	<0,9	3865
<b>Moyen</b>	<0,9	1755
<b>Faible</b>	26,1	231,8

L'analyseur LiaisonXL® effectue une prise d'essai de l'ordre de 20 µL, et requiert un volume mort d'environ 150 µL. Nous avons donc décidé d'effectuer une série de dilution en cascade pour diluer nos sérums du 1/2 au 64<sup>ème</sup>, pour un volume final de 200 µL. Le schéma ci-dessous reprend la méthode de la dilution en cascade utilisée.

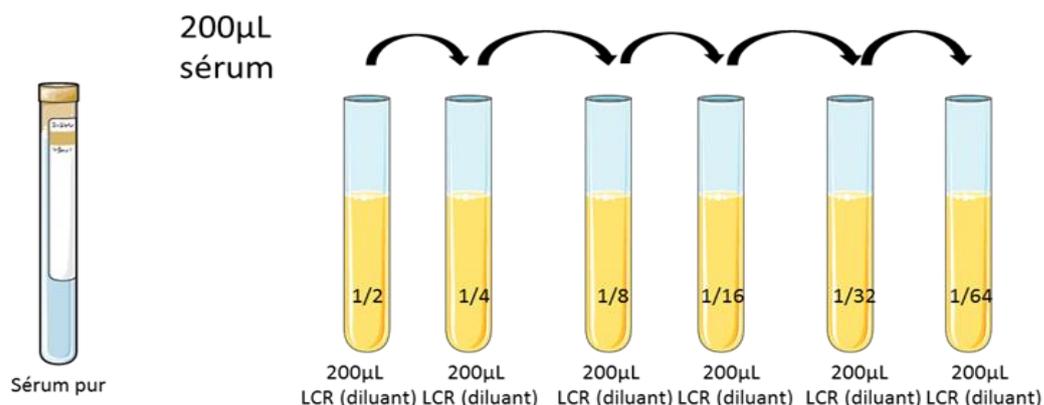


Figure 22 Technique de dilution en cascade d'un sérum du 1/2 au 64<sup>ème</sup> pour un volume total de 200 µL

### 3.2.5.2. Dilution des IgG HSV dans une matrice LCS

De façon similaire, 3 sérums à taux d'IgG HSV différents (fort, moyen, faible) issus de notre sérothèque ont été sélectionnés pour l'étude de la décroissance des IgG et du RLU en fonction de la dilution. Leurs caractéristiques sont représentées dans le tableau 3.

Tableau 3 Les 3 sérums positifs en IgG HSV, un seul est positif en IgG VZV

Titre	IgGHSV1+2	IgG VZV
Fort	28,6	<135
Moyen	14,8	1601
Faible	6,42	<135

### 3.2.6. Cohorte de LCS – Sérums appariés

187 couples de sérums et LCS ont été analysés. Ils avaient été prélevés initialement pour une recherche de synthèse intrathécale Lyme entre janvier 2020 et mai 2022, chez des patients présentant des tableaux neurologiques compatibles. Les résultats de dosage de l'albumine LCS/Sérum ainsi que des IgG totales LCS/Sérum étaient donc déjà disponibles avant notre étude. Ils ont tous bénéficiés d'une isoélectrofocalisation dans le service de Biochimie et génétique moléculaire du CHU de Limoges dans le cadre de la recherche de synthèse intrathécale dans les maladies inflammatoires auto-immunes du système nerveux central. Les techniques de dosage LIAISON® HSV-1/2 IgG DiaSorin® et LIAISON® VZV IgG DiaSorin® ont été réalisées sur chaque LCS et Sérum de la cohorte.

### Volume d'échantillon nécessaire

La détermination d'une synthèse intrathécale anti-HSV et anti-VZV utilise différents paramètres biologiques, nécessitant donc un volume important de LCS. Elle nécessite un volume minimal de 495 µL de LCS. A savoir que ce volume peut être réduit à 345 µL si on supprime le volume mort d'un des dosages anti-virus étant donné que le dosage se fait sur le même automate et le même tube.

Tableau 4 Volumes de LCS nécessaire à la réalisation d'une synthèse intrathécale

Techniques de dosage LCS	Volume nécessaire (µL)
Albumine	25 (dont 10 de volume mort)
IgG totales	110 (dont 10 de volume mort)
IgG anti-HSV	190 (dont 150 de volume mort)
IgG anti-VZV	170 (dont 150 de volume mort)
Total	495

## Résultats

### 4.1. Evaluation de 2 trousse automatisées permettant la détection des anticorps IgG spécifiques de type HSV-1 et HSV-2

#### 4.1.1. Résultats des trousse de dosage d'IgG anti-HSV-1

Pour rappel, l'échantillon comporte 173 sérums, 149 positifs ainsi que 24 négatifs dans notre technique de routine « IgG DiaSorin® HSV1+2 ».

Lorsque nous avons analysé les 173 sérums, 132 étaient positifs et 41 négatifs avec la technique « HSV-1 IgG Abbott® ». 138 étaient positifs et 35 négatifs avec la technique « HSV-1 IgG DiaSorin® ».

Tableau 5 Tableau de contingence entre les techniques HSV-1 Abbott® et DiaSorin®.

		Résultat Abbott®		
		Catégorie	HSV1 +	HSV 1 -
Résultat DiaSorin®	HSV1 +	131	7	138
	HSV 1 -	1	34	35
Total		132	41	173

Le nombre total d'observations concordantes est de 165 (131 sérums positifs en HSV-1 dans les 2 techniques, et 34 sérums négatifs), soit 95,4% de concordance.

8 échantillons se sont révélés discordants entre les 2 techniques, 7 rendus négatifs en technique Abbott® (positifs en DiaSorin®), 1 rendu positif en technique Abbott® (négatif en technique DiaSorin®). Un des 8 échantillons avait un résultat HSV1+2 négatif. Les valeurs IgG VZV ont été dosées en 2020 sur les sérums frais, et sont indiquées à titre indicatif.

Tableau 6 Caractéristiques des 8 sérums discordants entre les 2 techniques IgG anti-HSV-1.

#	IgGHSV1+2	IgGHSV1+2 (index)	IgGVZV	IgGVZV (mUI/mL)	Abbott HSV-1	Interprétation HSV-1	DiaSorin HSV-1 (index)	Interprétation HSV-1
11	+	13,4	+	1646	28,86	+	0,215	-
26	+	26,7	+	1611	0,63	-	3,59	+
42	+	1,87	+	1098	0,64	-	1,52	+
48	+	3,75	+	>4000	0,73	-	2,56	+
63	+	3,57	+	1009	0,19	-	1,52	+
80	+	>30.0	+	194,6	0,29	-	22,5	+
86	+	5,37	+	1657	0,7	-	6,27	+
96	-	<0.9	+	2205	0,15	-	9,63	+

D'après le tableau de contingence (Tableau. 1) le test statistique Kappa permet calculer une concordance de 0,865. (Se Kappa = 0,046, intervalle de confiance à 95% : [0,775 ; 0,956]).

Les 8 échantillons discordants ont été analysés en immunoblot, les résultats sont reportés dans le Tableau 7).

Tableau 7 Résultats de l'immunoblot des 8 échantillons discordants en HSV-1. (gG1 et gG2 : Glycoprotéines spécifiques respectivement des herpès simplex de type 1 et 2)

#	gG1	gG2	Interprétation ImmunoBlot HSV-1
107	-	+	Négatif
104	+	+	Positif
102	-	-	Négatif
100	-	-	Négatif
105	-	+	Négatif
101	-	-	Négatif
106	+	+	Positif
103	-	-	Négatif

Tableau 8 Tableaux de calcul des sensibilité (Se) et spécificité (Sp) pour les trousse IgG HSV1. (VP : vrai positif ; FN : faux négatif ; VN : vrai négatif ; FP : faux positif).

	VP	131		VP	133
<b>HSV-1 Abbott®</b>	FN	3	<b>HSV-1 DiaSorin®</b>	FN	1
	VN	38		VN	34
	FP	1		FP	5

Pour la technique HSV-1 IgG Abbott, les sensibilité et spécificité sont respectivement de 97,8% et 97,4%. Pour la technique HSV-1 IgG DiaSorin®, elles sont respectivement de 99,3% et 87,2%.

#### 4.1.2. Résultats des trousse de dosage d'IgG anti-HSV-2

Lors de l'analyse des 173 sérums, en IgG anti-HSV-2 cette fois-ci, 44 étaient positifs, et 129 négatifs avec la technique « HSV-2 IgG Abbott® ». 32 étaient positifs et 141 négatifs avec la technique « HSV-2 IgG DiaSorin® ». Ci-dessous le tableau de contingence pour les 2 techniques de dosages IgG anti-HSV-2.

Tableau 9 Tableau de contingence entre les techniques HSV-2 Abbott® et DiaSorin®.

		Résultat Abbott®			
		Catégorie	HSV 2 +	HSV 2 -	Total
Résultat DiaSorin®	HSV 2 +		31	1	32
	HSV 2 -		13	128	141
Total			44	129	173

Le nombre total d'observations concordantes est de 159 (31 sérums positifs en HSV-2 dans les 2 techniques, et 128 sérums négatifs), soit 91,9% de concordance.

14 échantillons se sont révélés discordants entre les 2 techniques : 13 rendus négatifs par la technique DiaSorin® et positifs en technique Abbott®, et 1 positif en DiaSorin® et négatif en Abbott®. Les valeurs IgG VZV ont été dosées en 2020 sur les sérums frais et sont indiquées dans le tableau ci-dessous à titre indicatif.

Tableau 10 Caractéristiques des 14 sérums discordants entre les 2 techniques IgG anti-HSV-2.

#	IgGHSV1+2 interprétation	IgGHSV1+2 index	IgGVZV interprétation	IgGVZV mUI/mL	Alinity HSV 2	interprétation	LiaisonXL HSV 2	interprétation XL hsv2
119	+	20,8	+	1443	0,79	-	24,8	+
113	+	22,9	+	1373	1,63	+	0,5	-
112	+	19,1	+	1658	1,92	+	0,5	-
116	+	20,9	+	766,2	6,29	+	0,5	-
114	+	23,7	+	3166	1,32	+	0,5	-
108	+	>30.0	+	1057	1,1	+	0,5	-
117	+	28,1	+	2158	20,05	+	0,5	-
118	+	>30.0	+	1005	1,03	+	0,5	-
102	+	1,87	+	1098	2,3	+	0,5	-
108	+	1,16	+	1279	2,3	+	0,5	-
103	-	<0.9	+	2205	2,17	+	0,5	-
109	-	<0.9	+	705,1	1,79	+	0,5	-
110	-	<0.9	+	909,2	1,79	+	0,65	-
111	-	<0.9	+	1397	1,71	+	0,601	-

Le test statistique Kappa permet de calculer une concordance de 0,766. (Se Kappa = 0,059, intervalle de confiance à 95% : [0,651 ; 0,881]).

Les 14 échantillons discordants ont bénéficié d'un immunoblot, Les résultats sont répertoriés ci-dessous (tableau 11).

Tableau 11 Résultats des 14 sérums discordants en immunoblot (gG 1 et gG2 : glycoprotéines spécifiques respectivement des virus de l'herpès simplex de type 1 et 2)

#	gG1	gG2	Interprétation ImmunoBlot pour HSV-2
119	+	-	Négatif
113	+	-	Négatif
112	+	-	Négatif
117	+	+	Positif
114	+	-	Négatif
108	-	-	Négatif
116	+	-	Négatif
118	+	-	Négatif
103	-	-	Négatif
102	-	-	Négatif
109	-	-	Négatif
110	-	-	Négatif
111	-	-	Négatif
108	-	-	Négatif

Tableau 12 Tableaux de calcul des sensibilité (Se) et spécificité (Sp) (VP : vrai positif ; FN : faux négatif ; VN : vrai négatif ; FP : faux positif).

	<b>VP</b>	<b>33</b>		<b>VP</b>	<b>31</b>
<b>HSV-2 Abbott®</b>	FN	0		FN	2
	VN	129		VN	139
	FP	11		FP	1
				<b>HSV-2 DiaSorin®</b>	

Pour la technique HSV-2 IgG Abbott, la sensibilité et la spécificité sont respectivement de 100% et 92,1%. Pour la technique HSV-2 IgG DiaSorin®, elles sont respectivement de 94.9% et 99,3%.

#### 4.1.3. Résultat trousse HSV 1-2 totaux

Pour rappel, sur les 173 sérums sélectionnés pour l'étude, 24 sont négatifs et 149 sont positifs en technique HSV IgG totaux DiaSorin®. 2 sérums négatifs ont été trouvés positifs en HSV-1 par les 2 techniques spécifiques (résultats concordants entre les 2). Ils ont été confirmés en immunoblot. 3 sérums positifs en HSV IgG totaux ont été trouvés négatifs par les 2 techniques spécifiques (concordants entre eux), l'immunoblot a confirmé la négativité d'un d'entre eux, mais les 2 autres ont été trouvés positifs en HSV-1.

Tous les résultats et caractéristiques des sérums analysés en immunoblot sont présentés en annexe 2.

#### 4.2. Mise en place d'une technique détection de synthèse intrathécale à alphaherpèsvirus (HSV et VZV)

##### 4.2.1. Analyse du bruit de fond en techniques HSV-G et VZV-G

L'analyse du bruit de fond de 30 LCS a permis de déterminer une première approche de seuil de négativité des techniques IgG-VZV et IgG-HSV. Nous nous intéressons ici au résultat en unité relative de lumière (RLU : Relative Light Unit). La figure 23 montre la dispersion des résultats d'IgG anti-VZV et anti-HSV en fonction du RLU. La médiane se situe autour de 4000 RLU pour la technique HSV-G et autour de 2000 RLU pour la technique VZV-G. 2 valeurs extrêmes sont supérieures ou aux alentours de 20 000 RLU pour chaque technique. Les dossiers clinico-biologiques correspondant à ces échantillons sont sans particularité microbiologique. Les 2 valeurs extrêmes en HSV-G appartiennent à des LCS différents des 2 valeurs extrêmes en VZV-G.

Nous utiliserons le seuil de 10 000 RLU pour les 2 techniques pour considérer qu'il existe un signal significatif dans le LCS. En dessous, le prélèvement sera considéré comme négatif.

Le tableau récapitulatif des 30 LCS est en annexe 1.

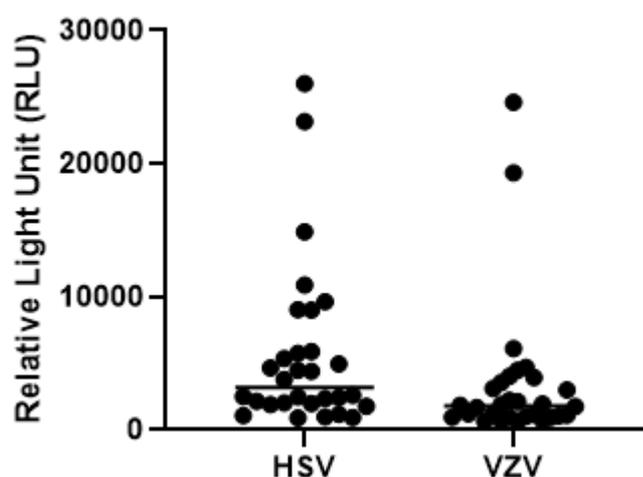


Figure 23 Dispersion des 30 LCS en fonction du RLU et de la technique HSV-G ou VZV-G

## 4.2.2. Dilution de sérums positifs en VZV-G et HSV-G dans du LCS

### 4.2.2.1. Dilution d'IgG anti-VZV

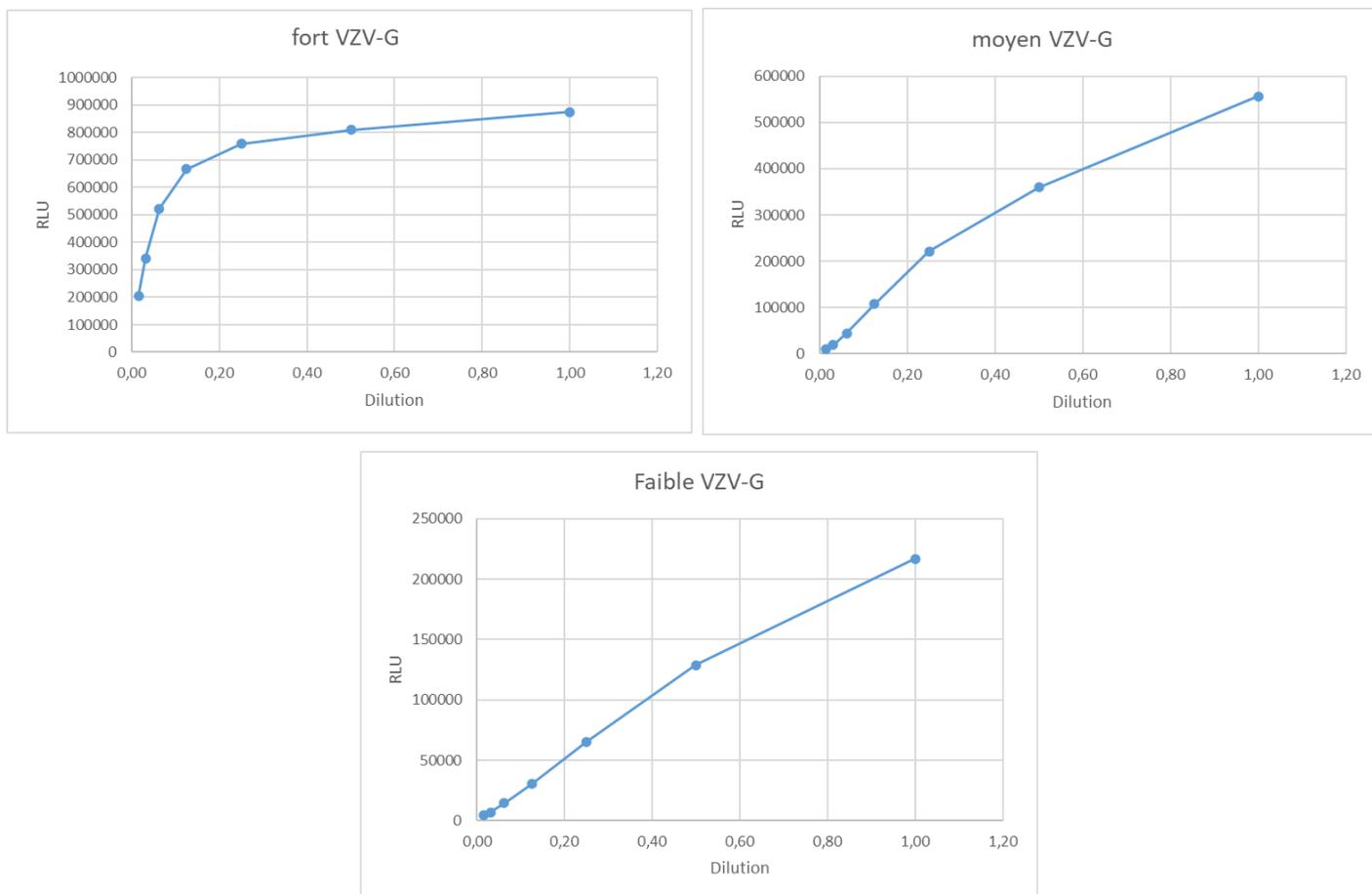


Figure 24 Représentation graphique du signal lumineux mesuré par l'automate (RLU) en fonction de la dilution de 3 sérums de concentrations différentes en VZV-G

Nous pouvons observer graphiquement que le sérum fort initialement mesuré à 3865 mUI/mL, est mesuré à près de 900 000 RLU, et qu'une fois dilué au demi, il est mesuré à plus de 800 000 RLU, et ainsi de suite.

Concernant les dilutions des sérums à concentration moyenne et faible, il semblerait que la décroissance en fonction de la dilution soit linéaire, le résultat du sérum moyen est mesurable jusqu'à 9394 RLU et est cohérent avec le résultat de la dilution précédente (19 671 RLU). Celui du sérum faible est cohérent jusqu'à 6974 RLU (cohérent avec 14278 RLU mais pas avec 4743). Le tableau ci-dessous reprend les résultats numériques pour chaque dilution.

Dilution		Fort RLU	Fort mUI/mL	Moyen RLU	Moyen mUI/mL	Faible RLU	Faible mUI/mL
Pur	1	874 143	3565	555 913	1415	217 066	342,1
1/2	0,5	810 511	3011	359 436	669,6	128 936	144,7
1/4	0,25	758 405	2607	221 347	352,6	65 223	67,36
1/8	0,125	667 116	2001	107 690	114,5	30 360	31,02
1/16	0,066	523 064	1263	44 485	48	14 278	12,73
1/32	0,031	342 187	626,1	19 671	17,79	6 974	<10
1/64	0,016	205 828	312,9	9 394	<10	4 743	<10

Tableau 13 Dilutions de 3 sérums positifs en VZV-G (fort, moyen et faible) dans du LCS

#### 4.2.2.2. Dilution d'IgG anti-HSV

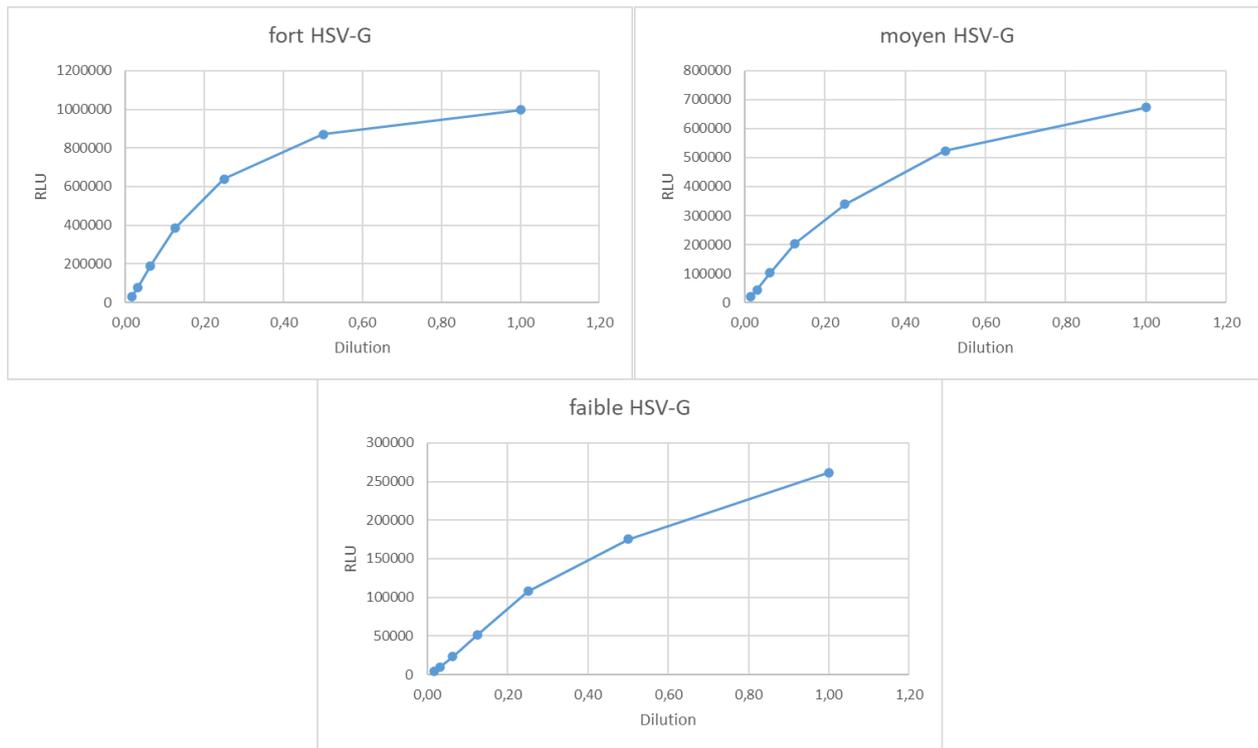


Figure 25 Représentation graphique du signal lumineux mesuré par l'automate (RLU) en fonction de la dilution de 3 sérums de concentrations différentes en HSV-G

Il semblerait qu'il soit de même pour le sérum fort en HSV-G, mesuré pur à 997 728 RLU (soit un index >30) est mesurée à 871 272 RLU au demi. Les sérums forts et moyen ne sont graphiquement pas linéaire. Mais suivent une courbe hyperbolique. Nous pouvons observer que dans les faibles valeurs, la concentration en index se rapproche d'une courbe linéaire. Et qu'un signal reste tout de même mesurable et cohérent en dessous du seuil (<0,5 index).

Tableau 14 Dilutions de 3 sérums positifs (fort, moyen et faible) en HSV-G dans du LCS

Dilution		Fort RLU	Fort (index)	Moyen RLU	Moyen (index)	Faible RLU	Faible (index)
Pur	1	997 728	>30	673 885	21	261 486	Pur
1/2	0,5	871 272	>30	523 881	14,6	175 566	1/2
1/4	0,25	640 063	19,4	338 458	7,84	107 973	1/4
1/8	0,125	384 313	9,44	204 136	3,76	51 756	1/8
1/16	0,066	189 612	3,36	102 105	1,4	23 252	1/16
1/32	0,031	78 642	0,943	44 305	<0 ,5	9 692	1/32
1/64	0,016	29 869	<0 ,5	19 088	<0 ,5	4 740	1/64

#### 4.2.2.3. Détermination de l'équation de la droite pour la technique VZV-G

205 résultats (LCS et sérums confondus) possédaient une valeur dans l'intervalle de mesure ( $10 < X < 4000$  mUI/mL) et ont permis de tracer la courbe hyperbolique utilisée par l'analyseur, puis de déterminer par la loi des logarithmes l'équation de la droite linéaire qui en découle. Ci-dessous le graphique de la courbe hyperbolique ainsi que le graphique de la droite linéaire avec l'équation de la droite.

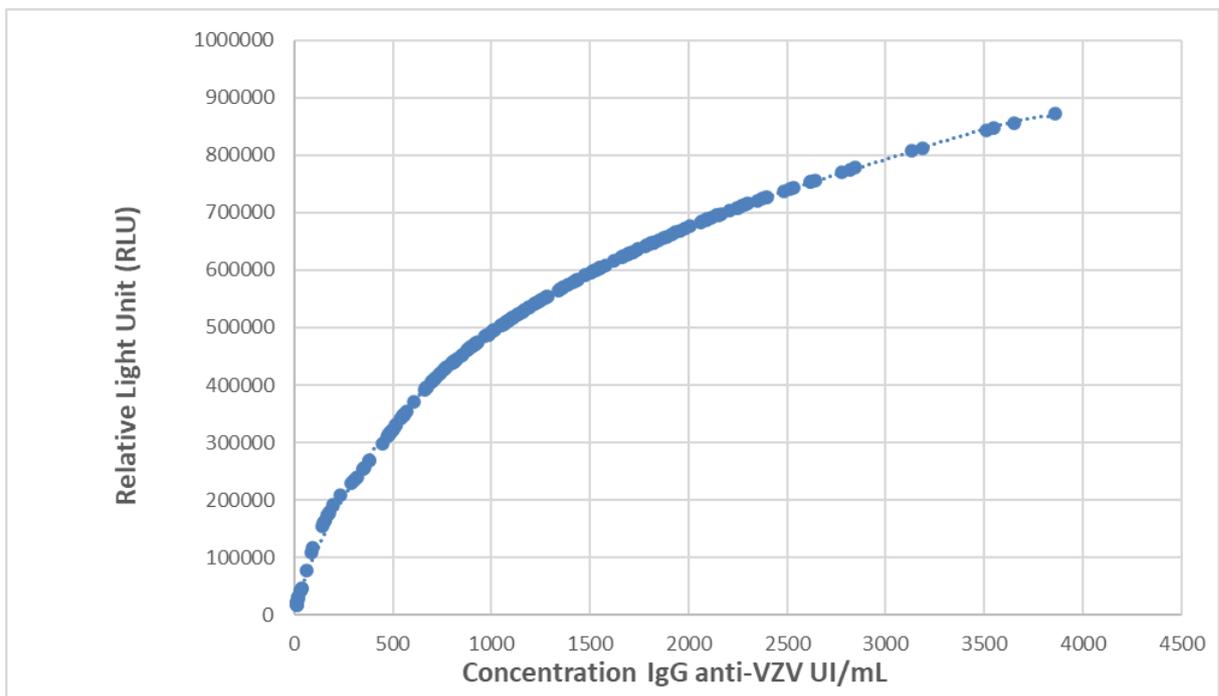


Figure 26 Représentation graphique de la concentration en IgG anti-VZV (x) en fonction du RLU (y) (n=205)

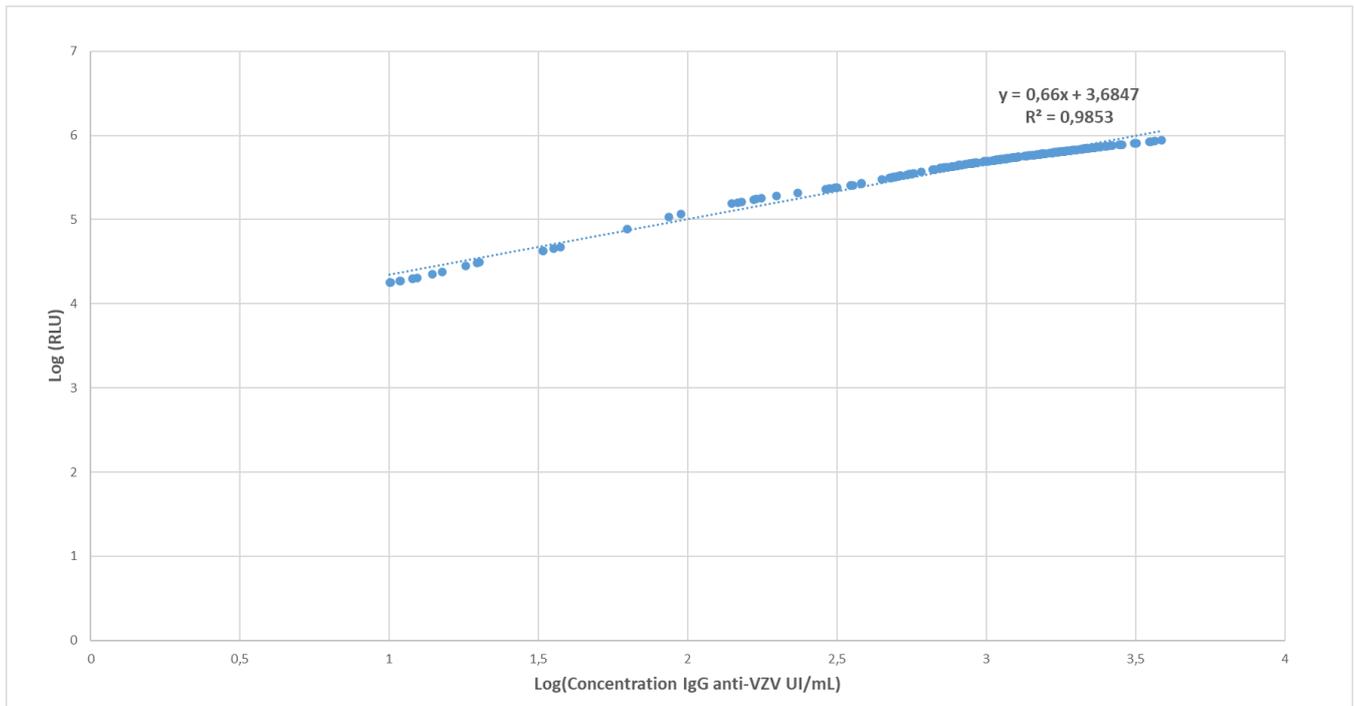


Figure 27 Représentation graphique du Log (concentration en IgG anti-VZV) (x) en fonction du Log(RLU) (y)

Nous déterminons ainsi l'équation de la droite :  $y = 0,66x + 3,6847$  qui permettra d'extrapoler la concentration des données inférieures au seuil de quantification de la technique.

#### 4.2.2.4. Détermination de l'équation de la droite pour la technique HSV-G

De même que précédemment, l'analyse des 187 couples LCS/Sérum en technique IgG HSV, soit 374 résultats d'IgG HSV toutes matrices confondues nous permet de tracer une courbe ainsi qu'une droite logarithmique afin de déterminer l'équation de la droite. Les valeurs de 84 échantillons se situaient dans l'intervalle de mesure ( $0,5 < X < 30$  index). Ci-dessous le graphique de la courbe hyperbolique ainsi que le graphique de la droite linéaire avec l'équation de la droite.

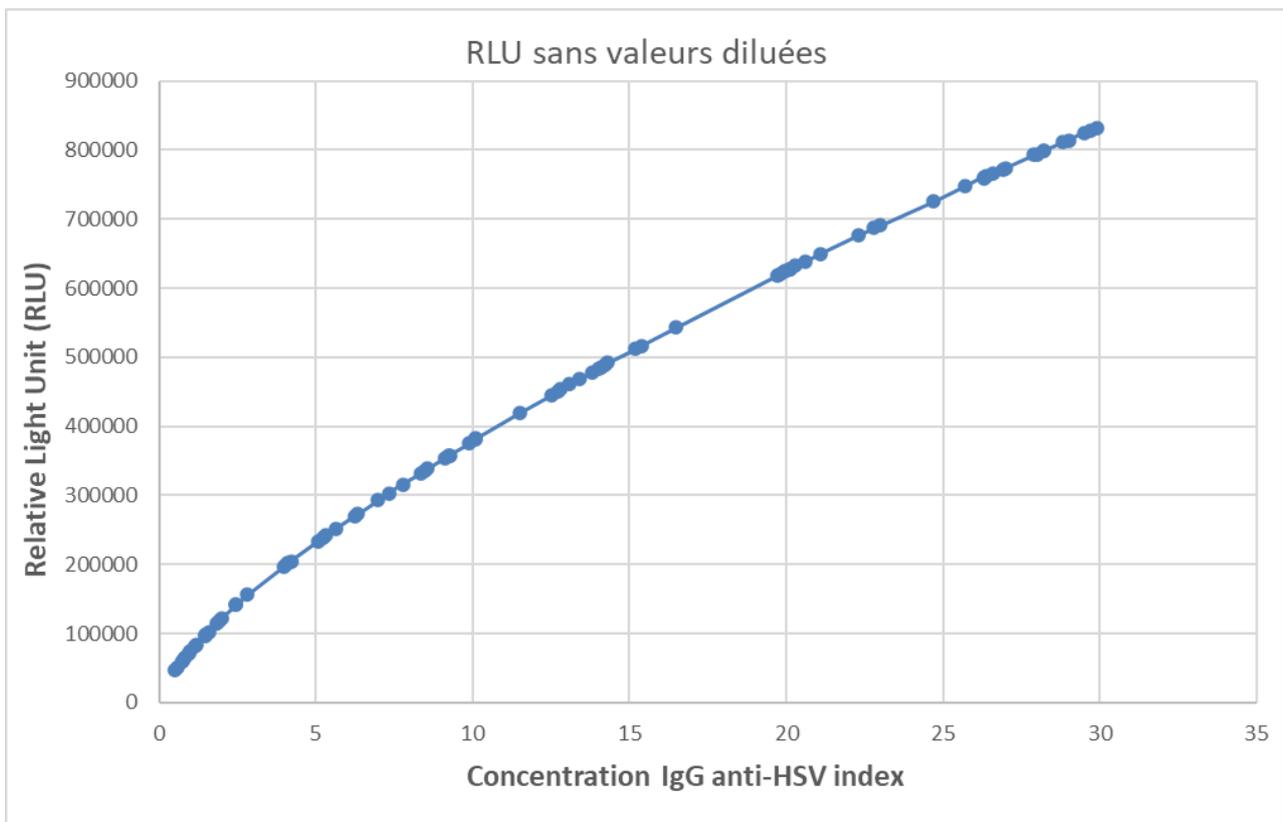


Figure 28 Représentation graphique de la concentration en IgG anti-HSV (x) en fonction du RLU (y) n=84

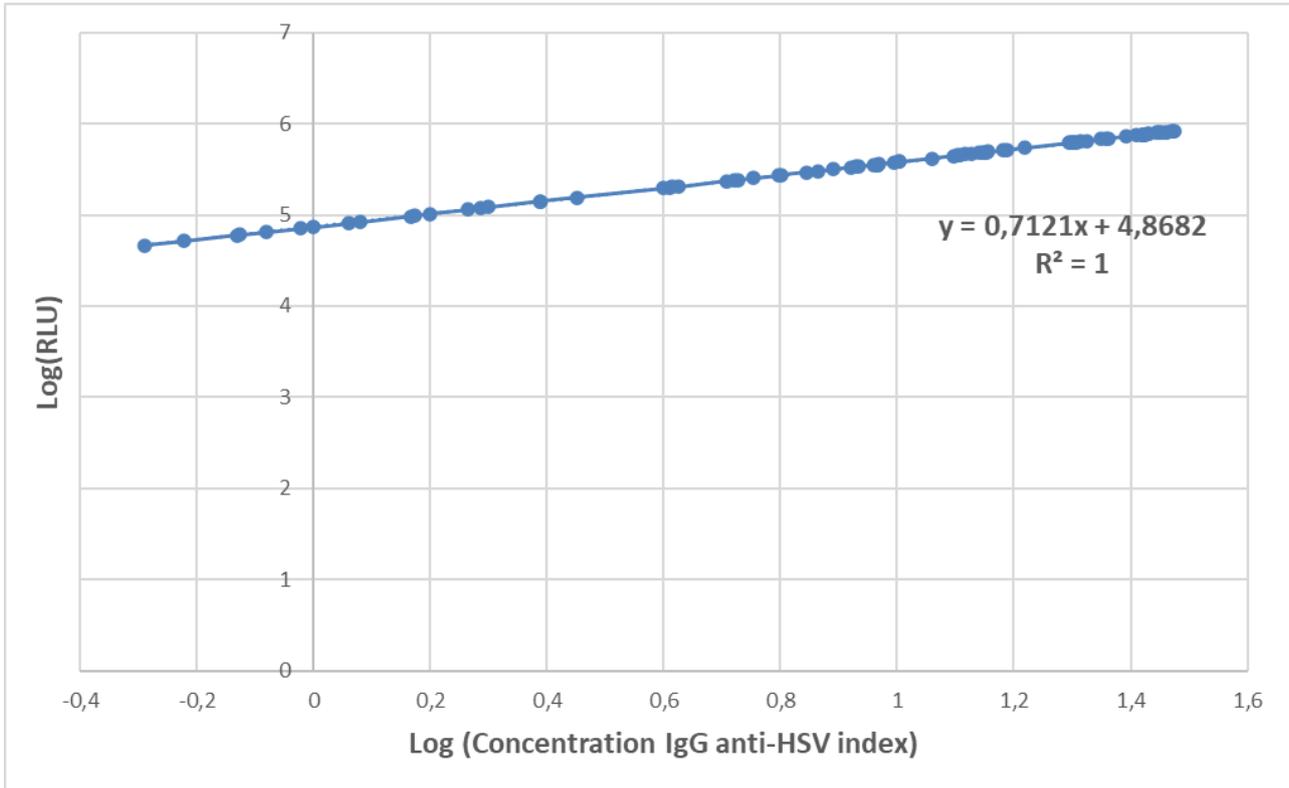


Figure 29 Représentation graphique du Log (concentration en IgG anti-HSV) (x) en fonction du Log(RLU) (y)

Nous déterminons ainsi l'équation de la droite :  $y = 0,7121x + 4,8682$  qui permet d'extrapoler la concentration des données inférieures au seuil de quantification de la technique.

### 4.2.3. Détermination de l'Antibody Index (AI) d'une cohorte de LCS – Sérums appariés

#### 4.2.3.1. Description de la population

187 sérums de 187 patients ont été analysés. La séroprévalence HSV est de 73,8% (n=138 sérums positifs en HSV-G), et la séroprévalence VZV est de 98,4% (n=184 sérums positifs en VZV-G). 44% des patients sont des femmes et l'âge moyen est de 58,7 ans (pour une médiane à 63 ans), allant de 5 à 95 ans.

#### 4.2.3.2. AI VZV

Après analyse de la cohorte de LCS – Sérums appariés (n=187) en IgG VZV DiaSorin®, 30 LCS se sont révélés supérieurs au seuil de 10 000 RLU d'après la détermination du bruit de fond de la technique et des tests de dilution. (n=157 LCS négatif en IgG VZV).

Parmi ces 30 patients, 10 patients présentent un AI (Antibody Index) > 1,4. L'ensemble des données biologiques de ces patients sont reportées dans le tableau. Un AI positif en VZV et en HSV a été retrouvé pour un seul couple LCS/sérum.

Concernant l'application des calculs de *Reiber et al* ainsi que de sa correction de l'AI par le Qlim, tous les AI VZV des couples LCS – sérums ayant un QIgG > Qlim ont été calculés par la formule  $AI\ VZV = QIgG_{spé} : Qlim$ . (Voir formules exactes chapitre I.2.4 : Les travaux de Hans Otto Reiber et Klaus Flegenhauer)

Rang	Sexe	Age	Isoélectrofoocalisation	PCR triplex	Aspect LCS	Polynucléaires (%)	Lymphocytes	Cell Indiff	Cellule/mm3	LCS VZV RLU	LCS VZV (mUI/mL)	Sérum VZV (mUI/mL)	Rqalb	AI VZV	AI HSV
3	Male	5	Profil oligoclonal	VZV+	clair	-	-	-	1	42857	32,79	2620	0,56	8,31	NEG
14	Female	79	Absence	NEG	Hémorragique	prédominance	-	-	19	172772	165,9	2818	2,13	3,51	POS
23	Male	85	Profil oligoclonal	NEG	clair	-	-	-	2	30695	19,7	2269	1,10	1,90	NEG
64	Male	60	Absence	NEG	Hémorragique	90%	7%	3%	135	20315	12,4	557,2	3,21	2,13	NEG
78	Male	53	Profil oligoclonal	NEG	clair	2%	98%	0	270	159670	146,6	1890	4,94	2,35	NEG
107	Male	14	Profil oligoclonal	NEG	clair	0	85%	15%	90	23671	15,03	1172	1,77	2,15	NEG
124	Male	60	Profil oligoclonal	NEG	clair	-	-	-	<1	42811	32,73	2399	0,75	3,14	NEG
127	Female	34	Absence	NEG	clair	-	-	-	1	17746	10,04	1006	1,03	2,75	NEG
146	Male	62	Profil oligoclonal	NEG	Légèrement xanthochromique.	-	prédominance	-	55	672086	1980	29520	2,45	3,96	NEG
163	Male	58	Absence	NEG	clair	-	-	-	1	45159	35,61	2093	0,95	5,43	NEG

Figure 30 Tableau récapitulatif des 10 couples LCS-sérum dont l'AI VZV est positif (>1,4). (POS : Positif ; NEG : Négatif ; Absence : absence de bande supplémentaire entre le LCS et le sérum en isoélectrofocalisation)



Les dossiers cliniques de ces 10 patients positifs en Index Anticorps VZV ont été étudiés : le diagnostic neurologique principal retenu par le clinicien pour chacun d'eux est répertorié dans le tableau ci-dessous.

# Patient	AI VZV	Diagnostic principal
3	8,31	Vascularite aiguë transitoire au décours d'un varicelle
14	3,51	Hémiballisme sans étiologie
23	1,90	Troubles neurologiques, pathologie neurodégénérative, SEP ou hydrocéphalie à pression normale
64	2,13	Etat de mal épileptique sans étiologie retrouvée, répondant aux benzodiazépines
78	2,35	AVC ischémiques multiples dans un contexte athéromateux
107	2,15	Encéphalite auto-immune à anticorps anti-NMDA
124	3,14	Hypothèse d'une SEP
127	2,75	Polyradiculonévrite dans le cadre d'un syndrome de Guillain-Barré
146	3,96	Hématome profond fronto-temporal droit responsable d'une paralysie faciale et d'une dysarthrie pas d'étiologie franche retenue pour le moment. Anisocorie avec chute de la paupière connue secondaire au zona ophtalmique 2 mois avant
163	5,43	Neuropathie sensitivo-motrice des membres inférieurs sans étiologie



#### 4.2.3.3. AI HSV

Concernant l'analyse des 187 couples LCS – sérum avec la technique IgG HSV DiaSorin®, 30 LCS se sont révélés supérieurs au seuil de 10 000 RLU d'après la détermination du bruit de fond de la technique et des tests de dilution (n=157 LCS négatif en IgG HSV). Les sérums présentant une valeur supérieure au seuil de la technique (>30 index) ont été dilués au 20<sup>ème</sup>.

Le calcul de l'AI retrouve chez ces 30 patients 5 couples LCS-sérum avec un AI supérieur à 1,4. Un seul est positif (AI HSV = 2,6) de façon concomitante avec un AI VZV à 5,8.

Concernant l'application des calculs de Reiber et al ainsi que de sa correction de l'AI par le Qlim, tous les AI VZV des couples LCS – sérums ayant un QIgG > Qlim ont été calculés par la formule  $AI\ VZV = QIgG_{spé} : Qlim$ .

Rang	Sexe	Age	Isoélectroforescence	PCR triplex	Aspect LCS	Cellule/mm <sup>3</sup>	LCS HSV RLU	LCS HSV calculée avec équation (index)	LCS HSV MESURE	SÉRUM HSV RLU	Sérum HSV (index)	Rqalb	AI VZV	AI HSV
14	Female	79	Absence	NEG	Hémorragique	19	204716	4,19	4,21	4307140	90,40	2,13	POS	2,60
12	Male	48	Profil oligoclonal	NEG	clair	1	60290	0,75	0,75	3323700	62,80	1,76	NEG	1,72
173	Male	81	Absence	NEG	clair	1	16209	0,12	<0,500	121305	1,99	0,70	NEG	19,73
141	Female	77	Profil oligoclonal	NEG	clair	3	13424	0,09	<0,500	477457	13,80	0,89	NEG	1,82
72	Female	88	Profil oligoclonal	NEG	clair	1	11974	0,08	<0,500	627371	20,10	0,52	NEG	1,59

Figure 31 Tableau récapitulatif des 5 couples LCS-sérum dont l'AI HSV est positif (>1,4). (NEG : Négatif Absence : absence de bande supplémentaire entre le LCS et le sérum)



L'étude des dossiers cliniques de ces 5 patients positifs en Index Anticorps HSV a été réalisée. Le diagnostic neurologique principal retenu par le clinicien pour chacun d'eux est répertorié dans le tableau ci-dessous.

# Patient	AI HSV	Diagnostic principal
14	2,60	Hémiballisme sans étiologie
12	1,72	AVC ischémiques multifocaux de mécanisme embolique toujours indéterminé
173	19,73	Troubles de la marche et de l'équilibre, sensation de faiblesse des membres inférieurs et acouphènes, sans étiologies
141	1,82	Dossier médical non accessible
72	1,59	Névrite isolée du nerf III



#### 4.2.3.4. Corrélation entre l'antibody index et l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique

##### Lien de corrélation AI VZV et RQalb

Nous avons analysé la valeur de l'AI pour le VZV (AI VZV) en fonction du rapport relatif de l'albumine (RQalb) à l'aide de test de corrélation de Pearson. Seuls les AI dont le LCS a une valeur d'IgG VZV significative selon notre seuil (RLU > 10 000) ont été comparés au RQalb (n=30). Un couple LCS-sérum parmi les 30 n'a pas été intégré à cette corrélation car il présentait une valeur extrême de RQalb (= 47,5). Par ailleurs son AI VZV était négatif.

L'analyse de corrélation porte donc sur 29 couples LCS-sérum. On ne retrouve pas de corrélation entre les variables AI VZV et RQalb ( $r = -0,33$  ; intervalle de confiance 95% [-0,62 ; 0,047]).

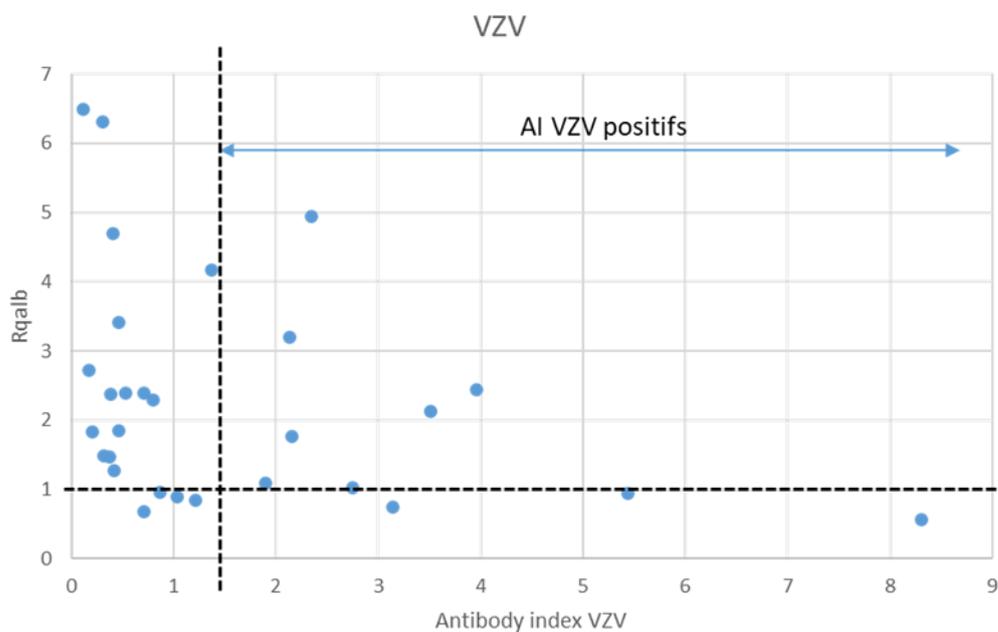


Figure 32 Valeur de l'Antibody index VZV en fonction du RQalb qui représente l'atteinte de la barrière hémato-méningée

### Lien de corrélation AI HSV et RQalb

En ce qui concerne la corrélation entre barrière hémato-méningée et index anticorps HSV (AI HSV), nous avons analysé la valeur de l'index anticorps en fonction du rapport relatif de l'albumine (RQalb) à l'aide de test de corrélation de Pearson. Seuls les AI dont le LCS a une valeur d'IgG HSV significative selon notre seuil (RLU > 10 000) ont été comparés au RQalb

Un couple LCS-serum parmi les 30 n'a pas été intégré à cette corrélation car il présentait une valeur extrême de RQalb (= 47,5). Par ailleurs son AI HSV était négatif. L'analyse de corrélation porte donc sur 29 couples LCS-sérum. On ne retrouve pas de corrélation entre les variables AI HSV et RQalb ( $r = -0,16$  ; intervalle de confiance 95%  $[-0,50;0,22]$ ).

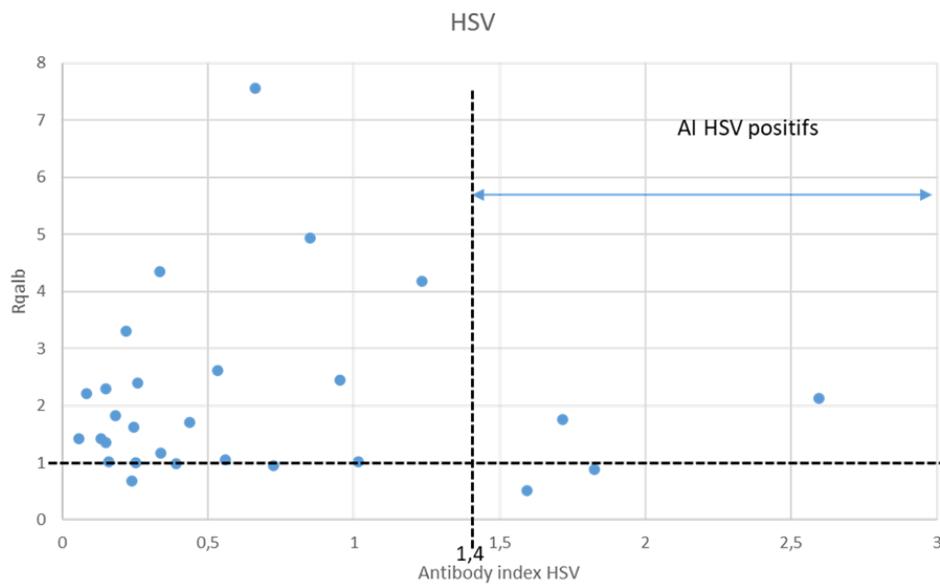


Figure 33 Valeur de l'Antibody index HSV en fonction du RQalb qui représente l'atteinte de la barrière hémato-méningée

#### 4.2.3.5. Isoélectrofocalisation et index anticorps

Sur les 5 AI HSV positifs, 3 présentaient un profil oligoclonal dans le LCS.

Concernant les 10 AI VZV positifs, 6 présentaient un profil oligoclonal en isoélectrofocalisation.

##### Isoélectrofocalisation – HSV

	AI HSV +	AI HSV -	Total
IEF +	3	43	46
IEF -	2	139	141
Total	5	182	187

*P-value* = 0,096 au risque alpha 5%. Les variables X (Isoélectrofocalisation) et Y (Index anticorps HSV) semblent donc indépendantes l'une de l'autre.

##### Isoélectrofocalisation – VZV

	AI VZV +	AI VZV -	Total
IEF +	6	40	46
IEF -	4	137	141
Total	10	177	187

*P-value* = 0.016 au risque alpha 5%. Les variables X (Isoélectrofocalisation) et Y (Index anticorps VZV) semblent donc indépendantes l'une de l'autre.

## Discussions

---

### 5.1. Évaluation de 2 trousse automatisées permettant la détection des anticorps IgG spécifiques de type HSV-1 et HSV-2

Dans le contexte des infections à herpès simplex, la sérologie est un outil indispensable pour définir le statut d'une femme enceinte ou d'un patient immunodéprimé. L'évaluation des trousse utilisées dans ces situations est indispensable afin de définir leurs performances respectives. En effet, des erreurs dans la définition du statut sérologique peuvent conduire à des modifications de stratégies thérapeutiques aux conséquences potentiellement graves.

Nous avons comparé 2 techniques de chimiluminescence automatisées de 2 fournisseurs différents, Abbott et DiaSorin, sur automates Alinity i et Liaison XL respectivement pour le dosage des immunoglobulines de type G (IgG) dirigées contre les virus de l'herpès simplex de type 1 et 2.

Pour la technique HSV-1 IgG Abbott®, les sensibilité et spécificité sont respectivement de 97,8% et 97,4%. Pour DiaSorin®, elles sont de 99,3% et 87,2%. La concordance entre les techniques HSV-1 IgG était de 0,87. La technique DiaSorin est plus sensible mais beaucoup moins spécifique que celle de Abbott dans la détection des IgG anti-HSV-1. Les techniques ont une excellente concordance entre elle (Kappa > 0,81).

Pour la technique HSV-2 IgG Abbott®, les sensibilité et spécificité sont respectivement de 100% et 92,1%. Pour DiaSorin®, elles sont de 93,9% et 99,3%. La concordance entre les 2 techniques est de 0,77. Pour le dosage des IgG HSV2, la technique Abbott est la plus sensible, mais moins spécifique. Les techniques ont une bonne concordance entre elle (Kappa = 0,76).

Nous retrouvons sur notre panel de 24 sérums négatifs en technique HSV IgG totaux (DiaSorin®), 2 sérums positifs en HSV-1 confirmés en immunoblot, soit plus de 8% des échantillons faussement négatifs. L'échantillon étant assez restreint, une étude sur davantage de sérums négatifs pour explorer la sensibilité de notre test actuel de routine pourrait être envisagé.

Nous indiquons dans notre travail à titre indicatif la sérologie IgG VZV pour chaque sérum. Il pourrait être intéressant de comparer nos données avec le titre d'IgG afin d'évaluer le risque de réactions croisés chez les sérums faux positif (FP), faux négatif (FN). Nous retrouvons effectivement que les réactions croisées sont fréquentes entre les virus HSV et VZV, entre autres parce que le virus entier du VZV est utilisé dans la plupart des tests diagnostiques. Les kits utilisant un antigène spécifique au VZV sont en cours d'études et certains sont déjà sur le marché, ils utilisent la glycoprotéine E, plus sensible et spécifique (58) (59).

Notre évaluation met en évidence une meilleure concordance pour les trousse de détection des IgG anti-HSV-1 que celles détectant les IgG anti-HSV-2. La technique DiaSorin est la plus sensible (99,3% contre 97,4%) pour la détection d'IgG anti-HSV-1, tandis que la technique Abbott est la plus sensible (100% contre 93,9%) pour la détection d'IgG anti-HSV-2 au détriment d'une plus faible spécificité. Notre échantillonnage de 173 sérums ne comprenant que 33 sérums positifs à l'HSV-2, les performances des trousse pourraient être réanalysées sur un plus grand effectif.

Les tests de sérologie spécifique de type sont réalisés en utilisant des anticorps dirigés contre des glycoprotéines spécifiques des virus HSV-1 et HSV-2, qui peuvent être utilisées sous

formes natives, purifiées ou recombinantes (60). En pratique quotidienne, il existe plusieurs kits sérologiques commerciaux pour rechercher les anticorps spécifiques anti-HSV-1 et/ou anti-HSV-2, dont la plupart repose sur la méthode ELISA. Les IgG spécifiques de type deviennent détectables en deux semaines à trois mois (fenêtre sérologique) après la survenue des symptômes et persistent toute la vie. Elles peuvent par conséquent donner des résultats faussement négatifs en début d'infection, nécessitant donc de répéter l'analyse plusieurs semaines plus tard (61).

Un article espagnol (55) compare 3 tests diagnostiques de type pour HSV-1 et HSV-2 (CLIA BIO-FLASH, Biokit, Espagne) (ELISA : HerpesSelect®, Focus, USA) (Immunoblot : Virotech, Allemagne) et montre une excellente concordance, sensibilité, et spécificité pour chaque technique. Les 3 méthodes de dosages utilisent toutes les mêmes antigènes (gG1 et gG2). Cette étude retrouve des sensibilités et spécificités supérieures à 98% pour tous les tests. Les études présentées dans les notices des kits HSV-1 et HSV-2 Abbott et DiaSorin retrouvent aussi des sensibilités et spécificités supérieures à 98%. C'est la spécificité du test Abbott HSV-2 qui est retrouvée plus basse dans notre étude (92,1%). Une étude compare les méthodes basées sur les glycoprotéines gG1 et gG2 aux autres techniques commerciales basées sur des antigènes bruts, en fonction des épisodes symptomatiques des patients (génitaux récurrents, labiaux etc.), et montre effectivement une meilleure performance pour les tests basés sur les glycoprotéines spécifiques (62).

Le choix d'une technique sensible permet d'éviter au maximum les faux négatifs, mais si elle n'est pas spécifique nous risquons de donner des faux positifs. Dans le contexte de l'herpès simplex, la sérologie est utilisée pour connaître le statut sérologique d'une femme enceinte, ou bien d'un patient greffé avant une instauration du traitement immunosuppresseur. En cas de résultat faussement négatif nous privons un patient de traitement antiviral prophylactique et l'exposons à un risque de réactivation de son HSV, souvent grave et étendue chez le patient immunodéprimé, ou un risque de transmission néonatal chez la femme enceinte (herpès néonatal). En cas de résultat faussement positif, il y aura instauration d'un traitement antiviral prophylactique non utile au patient, pouvant interagir avec ces traitements ou encore être responsable d'effets indésirables.

Les techniques de détection des IgG HSV-1 et HSV-2 des 2 fabricants ont donc des performances relativement similaires qu'il conviendrait de pouvoir vérifier sur un échantillon plus large de patients séropositifs vis-vis d'HSV2.

## 5.2. Mise en place d'une technique de détection de synthèse intrathécale alphaherpèsvirus (HSV et VZV)

La première étape de mise en place de la méthode de détection d'une synthèse intrathécale était de quantifier le bruit de fond des techniques de dosages des IgG anti-HSV et anti-VZV sur des liquides cérébro-spinaux (LCS).

Ces techniques ont été développées pour des dosages dans le sérum. La première technique, IgG VZV DiaSorin®, est une technique dite quantitative par le fournisseur, et nous rend un résultat en mUI/mL. La seconde, IgG HSV DiaSorin®, est quant à elle qualitative. L'enjeu est donc de transposer ces techniques initialement destinées au sérum, à une mesure dans le LCS. La dilution utilisée par l'automate nous étant inconnue et considérée confidentielle par le fabricant des 2 trousseaux.

La détermination du bruit de fond de ces 2 techniques sur LCS était donc une étape préliminaire obligatoire pour une détermination sur LCS avec calcul de la synthèse intrathécale.

En partant du postulat qu'un LCS est un liquide très pauvre en immunoglobulines comparé à un sérum, et que, par conséquent, l'automate effectue une dilution pour le sérum qui pourrait être excessive pour le LCS, le risque de perte de sensibilité sur un LCS dilué de la même façon qu'un sérum semble important.

Nous avons donc décidé dans un premier temps d'écarter la valeur rendue par l'automate (mUI/mL pour VZV-G et index pour HSV-G) et de s'intéresser à la mesure qu'il effectue en unité relative lumineuse (RLU). Car il pourrait, en effet, exister un signal significatif reflétant la présence de l'IgG dosée, malgré un résultat rendu négatif par l'automate car inférieur au seuil qui est prédéfini pour le sérum.

L'analyse de 30 LCS sélectionnés de façon aléatoire (dont 17 négatifs en PCR triplex HSV/VZV), tous négatifs en culture bactérienne, nous permet d'établir un seuil arbitraire à 10 000 RLU en dessous duquel le signal lumineux ne semble pas spécifique de l'immunoglobuline recherchée pour les 2 techniques. L'analyse de la répartition des valeurs de LCS négatifs (figure 22) montre tout de même des valeurs supérieures à 10 000 RLU (4 en HSV et 2 en VZV). Nous avons fait le choix de ne pas en tenir compte afin de garder un seuil bas afin d'être le plus sensible possible avec un impact modéré sur la spécificité.

Une perte de l'intégrité de la barrière hémato-méningée (BHM) peut faciliter un passage passif (transsudation) d'immunoglobulines de type G (IgG) contre le virus recherché (HSV ou VZV) dans le liquide cérébro-spinal, et ainsi créer un index anticorps faussement positif et conclure à tort à une synthèse intrathécale. L'intégrité de la BHM s'estime grâce au dosage de l'albumine dans le LCS et dans le sérum. Pour rappel l'albumine est une protéine exclusivement synthétisée dans le foie. Sa présence dans le LCS traduit donc un passage passif, et en cas d'altération de la BHM, son taux intrathécal augmente. *Reiber et al* déterminent donc le quotient relatif de l'albumine par rapport à l'âge du sujet. Si ce rapport est supérieur à 1 il existe donc une altération de la BHM. Le passage d'albumine augmente dans le LCS mais celui des autres protéines sériques aussi (comme les IgG entre autres). *Reiber* prévoit donc une correction du quotient des IgG par la formule Qlim qui prend en compte l'albumine du sérum et du LCS en cas de BHM altérée.

Afin de déterminer s'il existe un lien entre l'intégrité de la BHM et l'index anticorps (AI) calculé pour un virus, nous avons comparé les 29 couples LCS – sérum pour lesquels le calcul de l'AI pour le VZV a été réalisé, ainsi que les 29 couples LCS – sérum (distincts de ceux pour lesquels l'AI VZV a été calculé) au RQalb. Il n'existe a priori aucune corrélation entre l'intégrité de la BHM et les index anticorps HSV ou VZV calculés par les formules de *Reiber et al.*

Nous pouvons donc conclure qu'il est inutile de calculer le quotient relatif de l'albumine (RQalb) dans le cadre d'une demande de calcul de synthèse intrathécale alphaherpèsvirus.

Concernant les différentes courbes de dilution des IgG HSV et VZV (figures 23 et 25), nous observons que la relation entre la concentration et le signal mesuré en RLU par l'automate ne suit pas une cinétique linéaire. Elle semble hyperbolique. Un signal lumineux reste mesuré et cohérent même dans les valeurs inférieures à 10 000 RLU. Si on prend pour exemple les dilutions du sérum à titre « Faible » en IgG VZV dans du LCS, les valeurs de RLU sont respectivement 128 936 ; 65 223 ; 30 360 ; 14 278 ; 6 974 ; 4 743 pour les dilutions  $\frac{1}{2}$  ;  $\frac{1}{4}$  ;  $\frac{1}{8}$  ;  $\frac{1}{16}$  ;  $\frac{1}{32}$  ;  $\frac{1}{64}$ . Les dilutions du sérum à titre « faible » en HSV-G donnent des résultats similaires (voir tableau 14). Il semble donc envisageable que le signal soit significatif même aux alentours de 4 000 RLU, mais nous avons montré que le bruit de fond des 30 LCS en HSV-G et VZV-G présente des valeurs médiane et moyenne de 3 à 5000 RLU. Nous ignorons en revanche si ces 30 LCS sont réellement négatifs en IgG HSV et VZV. La confirmation par une technique spécifique comme l'immunoblot pourrait répondre à cette question. L'analyse des 30 LCS en immunoblot pourrait être envisagée secondairement pour valider définitivement nos résultats. Une PCR triplex sur l'ensemble des 30 LCS serait également un élément complémentaire pour finaliser le profil de nos LCS. A ce jour seuls 17 LCS ont été analysés et retrouvés négatifs en PCR triplex HSV/VZV, le volume d'échantillon disponible étant un facteur limitant pour envisager cette stratégie.

Devant ces différents arguments techniques le seuil de 10 000 RLU était donc le meilleur choix pour le calcul des index anticorps de notre cohorte de sérums – LCS appariés.

Les courbes de mesures en RLU de HSV-G et VZV-G nous ont permis de déterminer les équations de droite qui en découlent, pour déterminer la valeur d'un échantillon inférieur au seuil défini par l'automate. Cette détermination possède effectivement plusieurs biais. Tout d'abord, analyser un résultat en dehors de la gamme de mesure d'un automate n'est pas recommandé, mais nous avons déterminé le bruit de fond des techniques sur plusieurs LCS pour apprécier numériquement les valeurs de RLU d'un LCS a priori sans synthèse intrathécale. Nous avons aussi mesuré différents sérums positifs dilués dans du LCS (liquide de dérivation de neurochirurgie) pour suivre les valeurs des dilutions et définir la limite de détection. Ces étapes préalables nous ont conforté dans l'utilisation de valeurs inférieures au seuil de détection de l'automate. Un autre biais de nos équations est la variabilité de la formule d'une calibration à l'autre. L'automate trace sa courbe de contrôle (figures 19 et 20) en fonction de 2 étalons qu'il mesure chacun 3 fois, et fait une moyenne. L'équation de la courbe de contrôle de l'automate change donc à chaque étalonnage, mais il nous est impossible d'apprécier ce changement car l'équation est à la discrétion du fabricant. Il aurait pu être intéressant de mesurer un LCS avec une valeur faible sur différents jours et différentes calibrations.

L'isoélectrofocalisation du LCS comparé au sérum est une technique utilisée par les biochimistes pour déterminer s'il existe une synthèse intrathécale non spécifique. Elle est appréciée par la présence de bandes supplémentaires dans le LCS par rapport au sérum, et met en évidence un phénomène inflammatoire ou auto-immun du système nerveux central (encéphalite à anticorps anti-NMDA, sclérose en plaque, etc.)

6 patients sur les 10 positifs en AI VZV présentaient un profil oligoclonal dans le LCS par rapport au sérum, c'est-à-dire des bandes supplémentaires dans le LCS uniquement. Pour les 5 patients avec un AI HSV positif, 3 présentaient un profil oligoclonal dans le LCS. Nous nous sommes interrogé si un échantillon présentant un index positif à VZV correspondant à une synthèse intrathécale d'IgG anti-VZV ou HSV, présentait également une bande supplémentaire dans le LCS par rapport au sérum détectable en isoélectrofocalisation.

Nos analyses statistiques ne montrent pas de corrélation entre la présence de bandes supplémentaires dans le LCS par rapport au sérum pour nos échantillons positifs en AI HSV ou VZV.

Cette approche doit être investiguée avec un échantillonnage plus important d'Index anticorps positifs en HSV et VZV, mais pour le moment d'après nos résultats l'isoélectrofocalisation n'est pas une technique intéressante dans l'étude de la synthèse intrathécale HSV et VZV.

D'après les définitions de la barrière hémato-méningée et les calculs de synthèse intrathécale de Hansotto Reiber et Klaus Flegenhauer, nous avons déterminé l'index anticorps (AI) pour les virus de l'herpès simplex ainsi que de la varicelle et du zona pour 187 liquides cérébro-spinaux associés à un sérum prélevé de façon concomitante. Nous avons exclu tous les LCS ayant un signal <10 000 RLU en VZV-G et HSV-G, ce qui nous a permis de trouver 10 AI VZV positifs (>1,4) ainsi que 5 AI HSV positif chez 187 patients différents présentant des tableaux neurologiques variés. Seuls les patients présentant un AI positif ont bénéficié d'une étude du dossier médicale clinique. Une confirmation de la positivité de nos index anticorps (et de la négativité de certains index) avec une autre technique, ELISA par exemple est à envisager avant une mise en routine.

## Interprétation d'un index anticorps positif à VZV

Le virus de la varicelle-zona est responsable d'une multitude d'atteinte du système nerveux central, pouvant être à l'origine d'une synthèse intrathécale IgG anti-VZV. Les différentes atteintes sont les suivantes : encéphalite varicelleuse, méningite, syndrome de Ramsay Hunt, atteinte cérébelleuse, myélite, syndromes liés à un AVC (accident vasculaire cérébral). La plupart de ces manifestations sont associées à un taux important de mortalité et morbidité en l'absence de thérapie antivirale (63,64).

Il a été démontré dans la littérature que l'ADN viral présent dans le LCS diminue de façon progressive en fonction du temps et la PCR devient négative 1 à 3 semaines après le début des symptômes neurologiques. La détection d'une synthèse intrathécale devient donc indispensable lorsque la PCR s'est négativée (65). (figure 34)

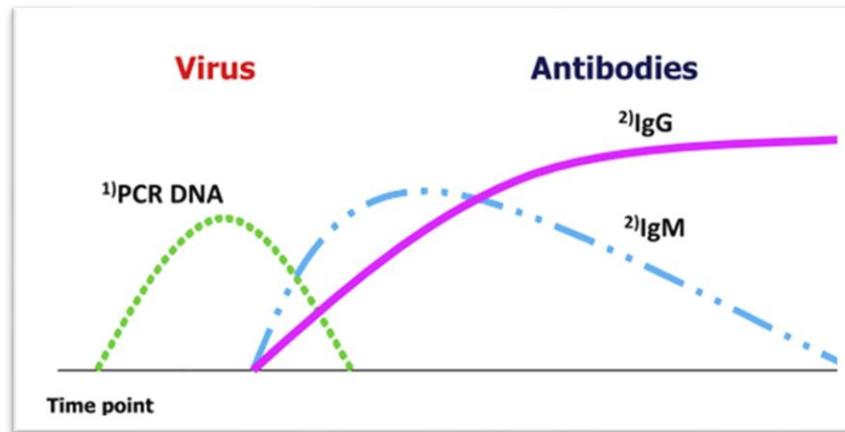


Figure 34 Cinétique de l'ADN et des anticorps anti-HSV dans le liquide cérébro-spinal.

Les manifestations neurologiques attribuées au VZV en l'absence d'atteintes cutanées sont rares (66) (67) (68), mais possible tel que ces 2 cas de synthèses intrathécales chez des patients présentant une méningite « aseptique » sans lésions cutanées (69).

Devant un AI positif à VZV chez un patient, c'est tout le contexte clinique qui doit être étudié : Imageries IRM à la recherche de signes d'encéphalites, lésions cutanées varicelleuses ou de récurrence d'un zona. Une activation polyspécifique auto-immune peut aussi être responsable d'une synthèse intrathécale, c'est le cas de la sclérose en plaque.

*A propos des 10 patients avec un AI VZV positif :*

Le premier patient (#3) avec un AI à 8,31, présente une PCR VZV positive dans le LCS, et un tableau de vascularite aiguë transitoire au décours d'une varicelle. Ce premier patient peut donc servir de témoin positif. Il a été montré dans la littérature que les vasculopathies post-encéphalite varicelleuse sont communes (26). Une PCR VZV négative dans le LCS n'exclut pas une vasculopathie varicelleuse, seule une PCR négative et l'absence de synthèse intrathécale VZV permet de l'exclure.

Le patient #146 présente un trouble neurologique (paralysie faciale et dysarthrie secondaire à un hématome profond), sans étiologie franche retenue, avec un antécédent de zona ophtalmique 2 mois auparavant. La PCR VZV dans le LCS est négative chez ce patient. L'encéphalite varicelleuse est une complication possible du zona ophtalmique, déjà décrite

(70), la proportion d'encéphalite post zona ophtalmique n'étant pas connue (71). Dans la littérature on retrouve un tableau de zona ophtalmique avec PCR VZV positive dans le LCS (70), pour lequel il a été montré que l'ADN disparaît rapidement dans le LCS pour laisser la place aux IgG anti VZV, ce qui pourrait expliquer que notre patient ait une PCR négative et un AI VZV positif.

Le patient #107 présente une encéphalite auto-immune avec anticorps anti-NMDA, pouvant être la conséquence d'une encéphalite à VZV. Le patient #124 est suspecté de présenter une sclérose en plaque (SEP), une synthèse intrathécale VZV est un argument supplémentaire pour une SEP (synthèse intrathécale polyclonale auto-immune imputable à la SEP).

Les autres patients ont des atteintes neurologiques sans étiologie.

### **Interprétation d'un index anticorps positif à HSV**

L'encéphalite herpétique (EH) à HSV-1 est la première cause d'encéphalite. Son diagnostic de référence est la PCR sur LCS, réitérée à 4 jours si négative. Des cas d'EH à PCR négative sont largement décrits dans la littérature. Une alternative diagnostic semble donc utile.

Notre étude met en évidence 5 patients présentant un index anticorps HSV positif, dont 1 avec un index VZV positif aussi. Les 5 patients ont des troubles neurologiques variés sans étiologie déterminée, sans spécificité particulière vis-à-vis de l'herpès simplex virus. Il serait intéressant de reprendre les imageries cérébrales pour déterminer si des signes d'encéphalites sont présents.

3 index HSV positifs ont des valeurs de RLU dans le LCS supérieures au seuil de 10 000 RLU mais inférieures au seuil de mesure rendu par l'automate ( $<0,5$ ) (Figure 31). Nous avons pu les déterminer grâce à l'équation de la courbe qui a permis le calcul de leur concentration en index HSV. Il serait intéressant de disposer d'arguments cliniques supplémentaires pour confirmer la vraie positivité de ces échantillons. Concernant les 2 autres échantillons avec un AI HSV positif (# 14 et #19), les valeurs mesurées dans le LCS sont supérieures au seuil de détection de l'automate ce qui permet d'affirmer le diagnostic avec plus de certitude.

## Protocole pour une demande de synthèse intrathécale à VZV ou HSV

### Recherche de SIT anti-VZV et anti-HSV

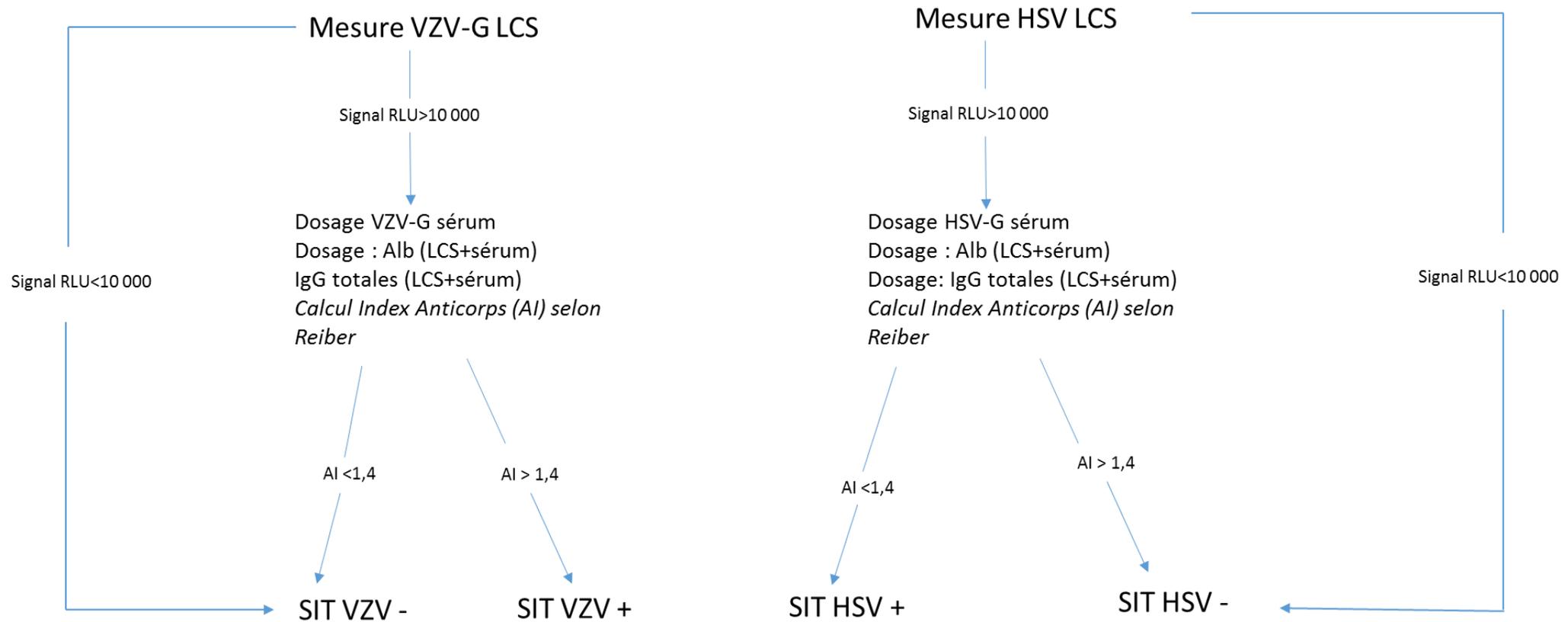


Figure 35 Algorithme suggéré pour une demande de SIT HSV-G et VZV-G. En cas de valeur rendu inférieur au seuil par l'automate mais supérieur à 10 000 RLU, utilisé l'équation de la droite de



## Conclusion

---

Notre première étude sur 173 sérums met en évidence une meilleure concordance pour les trousse de détection des IgG anti-HSV-1 que celles détectant les IgG anti-HSV-2. La technique DiaSorin® est la plus sensible (99,3% contre 97,4%) pour la détection d'IgG anti-HSV-1, tandis que la technique Abbott est la plus sensible (100% contre 93,9%) pour la détection d'IgG anti-HSV-2 au détriment d'une plus faible spécificité. Les 2 trousse HSV-1 et HSV-2 Abbott® et DiaSorin® ont dans l'ensemble des performances équivalentes pour l'évaluation de la sérologie spécifique de type.

Notre second travail nous a permis de mettre en place une méthode simple et rapide de détection de synthèse intrathécale anti-VZV et anti-HSV, ainsi qu'un algorithme de prise en charge d'un prélèvement pour recherche de synthèse intrathécale VZV ou HSV. Les résultats de cette étude devront être confirmés sur de nouveaux échantillons en prospectif et dans une comparaison inter-laboratoire utilisant des trousse diagnostiques différentes.



## Références bibliographiques

---

1. Mailles A, Stahl JP, Steering Committee and Investigators Group. Infectious encephalitis in France in 2007: a national prospective study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 déc 2009;49(12):1838-47.
2. Chodosh J, Ung L. Adoption of Innovation in Herpes Simplex Virus Keratitis. *Cornea.* 24 juill 2020; Publish Ahead of Print.
3. Foulon T. Herpesviridae: Classification et structure en 1991. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1 janv 1992;15(1):13-29.
4. Mori I, Nishiyama Y. Herpes simplex virus and varicella-zoster virus: why do these human alphaherpesviruses behave so differently from one another? *Rev Med Virol.* 2005;15(6):393-406.
5. PAPHYRUS EBERS. *Calif State J Med.* mai 1912;10(5):219.
6. Roizman B, Whitley RJ. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes J IHMF.* mars 2001;8(1):23-7.
7. Garzetti A. *From Tiberius to the Antonines: A History of the Roman Empire, AD 14-192.* Methuen; 1974. 884 p.
8. Sharma OP. Robert Willan remembered. *J Am Acad Dermatol.* 1 déc 1983;9(6):971-6.
9. Burnet FM, Williams SW. Herpes Simplex: A New Point of View. *Med J Aust.* 1939;1(17):637-42.
10. Schneeweis KE, Nahmias AJ. Antigens of Herpes simplex virus type 1 and 2-immunodiffusion and inhibition passive hemagglutination studies. *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol.* juin 1971;141(5):471-87.
11. Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* mars 1998;26(3):541-53; quiz 554-5.
12. WHO (World health organization). Herpès (virus de l'herpès) [Internet]. 2022. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
13. Mandal BK, Mukherjee PP, Murphy C, Mukherjee R, Naik T. Adult susceptibility to varicella in the tropics is a rural phenomenon due to the lack of previous exposure. *J Infect Dis.* nov 1998;178 Suppl 1:S52-54.
14. GAUSSORGUES P, ROBERT D, PEYRAMOND D. Syndrome de détresse respiratoire aiguë au cours d'une varicelle chez trois adultes sains. *Syndr Détresse Respir Aiguë Au Cours Une Varicelle Chez Trois Adultes Sains.* 1987;138(4):289-90.
15. Mohsen AH, McKendrick M. Varicella pneumonia in adults. *Eur Respir J.* 1 mai 2003;21(5):886-91.
16. Boucher A, Herrmann JL, Morand P, Buzelé R, Crabol Y, Stahl JP, et al. Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016. *Med Mal Infect.* mai 2017;47(3):221-35.

17. Modi S, Mahajan A, Dharaiya D, Varelas P, Mitsias P. Burden of herpes simplex virus encephalitis in the United States. *J Neurol.* juin 2017;264(6):1204-8.
18. Lee SH, Atiya N, Wang SM, Manikam R, Raju CS, Sekaran SD. Loss of Transfected Human Brain Micro-Vascular Endothelial Cell Integrity during Herpes Simplex Virus Infection. *Intervirol.* 2018;61(4):193-203.
19. Lakeman FD, Whitley RJ. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis.* avr 1995;171(4):857-63.
20. Mendez AA, Bosco A, Abdel-Wahed L, Palmer K, Jones KA, Killoran A. A Fatal Case of Herpes Simplex Encephalitis with Two False-Negative Polymerase Chain Reactions. *Case Rep Neurol.* août 2018;10(2):217-22.
21. Albert E, Alberola J, Bosque M, Camarena JJ, Clari MÁ, Domínguez Márquez MV, et al. Missing Cases of Herpes Simplex Virus (HSV) Infection of the Central Nervous System When the Reller Criteria Are Applied for HSV PCR Testing: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol.* févr 2019;57(2):e01719-18.
22. Armangue T, Spatola M, Vlasea A, Mattozzi S, Cárceles-Cordon M, Martinez-Heras E, et al. Frequency, symptoms, risk factors, and outcomes of autoimmune encephalitis after herpes simplex encephalitis: a prospective observational study and retrospective analysis. *Lancet Neurol.* 1 sept 2018;17(9):760-72.
23. Stahl JP, Azouvi P, Bruneel F, De Broucker T, Duval X, Fantin B, et al. Guidelines on the management of infectious encephalitis in adults. *Med Mal Infect.* mai 2017;47(3):179-94.
24. Harris KD. Herpes Simplex Virus Keratitis. *Home Healthc Now.* oct 2019;37(5):281-4.
25. Renesme L. Herpès néonatal : épidémiologie, manifestations cliniques et prise en charge. Recommandations pour la pratique clinique du Collège national des gynécologues obstétriciens français (CNGOF). *Gynécologie Obstétrique Fertil Sénologie.* 1 déc 2017;45(12):691-704.
26. Gilden D, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA. Varicella zoster virus vasculopathies: diverse clinical manifestations, laboratory features, pathogenesis, and treatment. *Lancet Neurol.* août 2009;8(8):731.
27. Wijesinghe VN, Farouk IA, Zabidi NZ, Puniyamurti A, Choo WS, Lal SK. Current vaccine approaches and emerging strategies against herpes simplex virus (HSV). *Expert Rev Vaccines.* sept 2021;20(9):1077-96.
28. Infection par le virus Varicella zoster chez l'adulte : au-delà du zona ? [Internet]. *Revue Médicale Suisse.* [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2016/revue-medicale-suisse-514/infection-par-le-virus-varicella-zoster-chez-l-adulte-au-dela-du-zona>
29. Legoff J, Aymard M, Braig S, Ramel F, Dreno B, Bélec L, et al. Quelle place pour la sérologie herpétique dans l'herpès genital ? *Presse Médicale.* 1 sept 2008;37(9):1251-60.
30. Saiag P, Lorette G. [Herpes consensus meeting]. *Ann Dermatol Venereol.* sept 2001;128(8-9):867-9.

31. The Immunoassay Handbook - 4th Edition [Internet]. [cité 13 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.elsevier.com/books/the-immunoassay-handbook/wild/978-0-08-097037-0>
32. Sindic CJM, Antwerpen MPV, Goffette S. The Intrathecal Humoral Immune Response: Laboratory Analysis and Clinical Relevance. 25 avr 2001;39(4):333-40.
33. Herpes Simplex Encephalitis. Br Med J. 18 juin 1966;1(5502):1497-8.
34. Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. Scand J Clin Lab Invest. sept 1977;37(5):385-90.
35. Tourtellotte WW, Potvin AR, Baumhefner RW, Potvin JH, Ma BI, Syndulko K, et al. Multiple sclerosis de novo CNS IgG synthesis. Effect of CNS irradiation. Arch Neurol. oct 1980;37(10):620-4.
36. Schuller E, Sagar HJ. Central nervous system IgG synthesis in multiple sclerosis. Application of a new formula. Acta Neurol Scand. juin 1983;67(6):365-71.
37. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 30 mars 1987;163(3):319-28.
38. Luxton RW, McLean BN, Thompson EJ. Isoelectric focusing versus quantitative measurements in the detection of intrathecal local synthesis of IgG. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 15 mars 1990;187(3):297-308.
39. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)--a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. J Neurol Sci. avr 1994;122(2):189-203.
40. Association des Collèges des Enseignants d'Immunologie des Universités de Langue française. Item 125 : Sclérose en plaques [Internet]. [cité 24 juin 2022]. Disponible sur: [http://campus.cerimes.fr/immunologie/enseignement/immuno\\_125/site/html/4.html](http://campus.cerimes.fr/immunologie/enseignement/immuno_125/site/html/4.html)
41. Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. Restor Neurol Neurosci. 2003;21(3-4):79-96.
42. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 20 août 2001;310(2):173-86.
43. Reiber H, Otto M, Trendelenburg C, Wormek A. Reporting Cerebrospinal Fluid Data: Knowledge Base and Interpretation Software. EJIFCC. août 2004;15(3):74-81.
44. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. J Neurol Sci. 1 mars 2001;184(2):101-22.
45. Reiber H. Cerebrospinal fluid - physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. Mult Scler J. 1 juin 1998;4(3):99-107.
46. Schubert J, Weissbrich B. Detection of virus-specific intrathecally synthesised immunoglobulin G with a fully automated enzyme immunoassay system. BMC Neurol. 29 mai 2007;7:12.

47. Vandvik B, Sköldenberg B, Forsgren M, Stiernstedt G, Jeansson S, Norrby E. Long-term persistence of intrathecal virus-specific antibody responses after herpes simplex virus encephalitis. *J Neurol.* 1985;231(6):307-12.
48. Sköldenberg B, Kalimo K, Carlström A, Forsgren M, Halonen P. Herpes simplex encephalitis: A serological follow-up study. Synthesis of herpes simplex virus immunoglobulin M, A, and G antibodies and development of oligoclonal immunoglobulin G in the central nervous system. *Acta Neurol Scand.* mai 1981;63(5):273-85.
49. Puel J, Gayet C, Averous S, Brochier B. Synthèse intrathécale des anticorps viraux au cours des encéphalites virales. *Médecine Mal Infect.* 1 oct 1985;15(10, Part 2):616-9.
50. Arnason BGW, Antel JP, Reder AT. IMMUNOLOGY OF MULTIPLE SCLEROSIS: Immunoregulation in Multiple Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* déc 1984;436(1 Multiple Scl):133-9.
51. Thompson EJ, Keir G. Laboratory Investigation of Cerebrospinal Fluid Proteins. *Ann Clin Biochem.* 1 sept 1990;27(5):425-35.
52. Schuller EA, Benabdallah S, Sagar HJ, Reboul JA, Tömpe LC. IgG synthesis within the central nervous system. Comparison of three formulas. *Arch Neurol.* juin 1987;44(6):600-4.
53. Rose AS, Ellison GW, Myers LW, Tourtellotte WW. Criteria for the clinical diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology.* 1 juin 1976;26(6 Part 2):20-2.
54. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 30 mars 1987;163(3):319-28.
55. F de O, Me G, P B, Jc S. Comparison of commercial methods of immunoblot, ELISA, and chemiluminescent immunoassay for detecting type-specific herpes simplex viruses-1 and -2 IgG. *J Clin Lab Anal [Internet].* janv 2018 [cité 7 juin 2022];32(1). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28332725/>
56. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas.* 1960;20:37-46.
57. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* mars 1977;33(1):159-74.
58. Kombe Kombe AJ, Xie J, Zahid A, Ma H, Xu G, Deng Y, et al. Detection of Circulating VZV-Glycoprotein E-Specific Antibodies by Chemiluminescent Immunoassay (CLIA) for Varicella-Zoster Diagnosis. *Pathogens.* 5 janv 2022;11(1):66.
59. Grahn A, Studahl M, Nilsson S, Thomsson E, Bäckström M, Bergström T. Varicella-Zoster Virus (VZV) Glycoprotein E Is a Serological Antigen for Detection of Intrathecal Antibodies to VZV in Central Nervous System Infections, without Cross-Reaction to Herpes Simplex Virus 1 ▽. *Clin Vaccine Immunol CVI.* août 2011;18(8):1336-42.
60. James SH, Sheffield JS, Kimberlin DW. Mother-to-Child Transmission of Herpes Simplex Virus. *J Pediatr Infect Dis Soc.* sept 2014;3 Suppl 1:S19-23.
61. Patel R, Alderson S, Geretti A, Nilsen A, Foley E, Lautenschlager S, et al. European guideline for the management of genital herpes, 2010. *Int J STD AIDS.* janv 2011;22(1):1-10.

62. Morrow RA, Friedrich D. Inaccuracy of certain commercial enzyme immunoassays in diagnosing genital infections with herpes simplex virus types 1 or 2. *Am J Clin Pathol*. déc 2003;120(6):839-44.
63. Persson A, Bergström T, Lindh M, Namvar L, Studahl M. Varicella-zoster virus CNS disease--viral load, clinical manifestations and sequels. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. nov 2009;46(3):249-53.
64. De Broucker T, Mailles A, Chabrier S, Morand P, Stahl JP, steering committee and investigators group. Acute varicella zoster encephalitis without evidence of primary vasculopathy in a case-series of 20 patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. août 2012;18(8):808-19.
65. Gregoire SM, van Pesch V, Goffette S, Peeters A, Sindic CJM. Polymerase chain reaction analysis and oligoclonal antibody in the cerebrospinal fluid from 34 patients with varicella-zoster virus infection of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. août 2006;77(8):938-42.
66. Easton HG. ZOSTER SINE HERPETE CAUSING ACUTE TRIGEMINAL NEURALGIA. *The Lancet*. 21 nov 1970;296(7682):1065-6.
67. Peters ACB, Versteeg J, Bots GTHAM, Lindeman J, Smeets REH. Nervous system complications of herpes zoster: immunofluorescent demonstration of varicella-zoster antigen in CSF cells. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. mai 1979;42(5):452-7.
68. Gershon A, Steinberg S, Greenberg S, Taber L. Varicella-zoster-associated encephalitis: detection of specific antibody in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. déc 1980;12(6):764-7.
69. Martínez-Martín P, García-Sáiz A, Rapún JL, Echevarría JM. Intrathecal synthesis of IgG antibodies to varicella-zoster virus in two cases of acute aseptic meningitis syndrome with no cutaneous lesions. *J Med Virol*. juin 1985;16(2):201-9.
70. Jain S, Khera R. Herpes zoster ophthalmicus complicated by encephalitis. *CMAJ Can Med Assoc J*. 1 mars 2016;188(4):E74.
71. Yawn BP, Wollan PC, St Sauver JL, Butterfield LC. Herpes zoster eye complications: rates and trends. *Mayo Clin Proc*. juin 2013;88(6):562-70.

## Annexes

---

Annexe 1. Tableau caractéristique des 30 échantillons de LCS pour étude du bruit de fond .....	101
Annexe 2. Tableau récapitulatif des caractéristiques de tous les échantillons discordants .....	102

**Annexe 1. Tableau caractéristique des 30 échantillons de LCS pour étude du bruit de fond**

#	Sexe	Âge	Éléments	Hématies	Culture	PCR HSV/VZV
1	M	0	3	<1	NEG	NF
2	F	84	3	1	NEG	NEG
3	M	0	1	<1	NEG	NEG
4	F	74	8	10	NEG	NEG
5	M	69	20	<1	NEG	NF
6	M	79	2	3	NEG	NF
7	M	70	<1	<1	NEG	NEG
8	F	43	2	<1	NEG	NEG
9	M	44	2	4	NEG	NEG
10	F	52	3	12	NEG	NEG
11	F	39	12	184	NEG	NF
12	F	83	1	<1	NEG	NEG
13	M	0	3	5	NEG	NEG
14	M	69	<1	<1	NEG	NEG
15	M	0	<1	420	NEG	NEG
16	M	51	4	1530	NEG	NF
17	M	71	<1	1	NEG	NF
18	F	79	4	1	NEG	NEG
19	M	78	1	<1	NEG	NEG
20	M	20	1	<1	NEG	NF
21	F	71	<1	<1	NEG	NEG
22	M	69	9	22	NEG	NF
23	M	70	1	141	NEG	NF
24	F	85	1	4	NEG	NEG
25	M	70	<1	2	NEG	NEG
26	M	62	<1	1	NEG	NEG
27	f	70	3	11	NEG	NF
28	M	0	4	7	NEG	NF
29	M	76	11	1	NEG	NEG
30	F	70	3	1	NEG	NF

NF = Non fait ; NEG = Négative

## Annexe 2. Tableau récapitulatif des caractéristiques de tous les échantillons discordants

En jaune les sérums discordants en HSV-1 Abbott/DiaSorin (#100 à 107) ; En orange les sérums discordant en HSV-2 Abbott/DiaSorin (#108 à 119) ; les sérums #120 et 121 sont des sérums concordants entre DiaSorin et Abott (HSV-1), mais pas en HSV total (négatif) ; Les sérums #122 à 124 sont concordants entre les 2 techniques Abbott/DiaSorin (négatif), mais pas en HSV total (positif). Les résultats des immunoblots sont présentés dans les 3 dernières colonnes.

#	Sexe	Âge	IgG HSV1+2	IgGHSV1+2 (index)	IgGVZV (mUI/mL)	Abbott HSV-1	Abbott HSV-1 interprétation	Abbott HSV-2	Abbott HSV-2 interprétation	DiaSorin HSV-			TOTAL	Immunoblot HSV-1	Immunoblot HSV-2		
										DiaSorin 1 interprétation	DiaSorin HSV-1 interprétation	DiaSorin HSV-2 interprétation					
100	Male	19	+	3,75	+	>4000	0,73	-	0,12	-	2,56	HSV+1	0,5	-	-	-	
101	Male	35	+	>30.0	+	194,6	0,29	-	0,11	-	22,5	HSV+1	0,5	-	-	-	
102	Male	36	+	1,87	+	1098	0,64	-	2,3	HSV2 +	1,52	HSV+1	0,5	-	-	-	
103	Female	57	-	<0.9	+	2205	0,15	-	2,17	HSV2 +	9,63	HSV+1	0,5	-	-	-	
104	Female	65	+	26,7	+	1611	0,63	-	20,17	HSV2 +	3,59	HSV+1	8,88	HSV2+	HSV-1 + 2	+	+
105	Male	33	+	3,57	+	1009	0,19	-	11,75	HSV2 +	1,52	HSV+1	1,96	HSV2+	HSV-2	-	+
106	Male	56	+	5,37	+	1657	0,7	-	3,93	HSV2 +	6,27	HSV+1	2,15	HSV2+	HSV1+2	+	+
107	Male	66	+	13,4	+	1646	28,86	HSV1 +	0,17	-	0,215	-	0,5	-	HSV-2	-	+
108	Male	28	+	1,16	+	1279	0,18	-	2,3	HSV2 +	0,102	-	0,5	-	-	-	-
109	Female	26	-	<0.9	+	705,1	0,14	-	1,79	HSV2 +	0,0377	-	0,5	-	-	-	-
110	Female	50	-	<0.9	+	909,2	0,2	-	1,79	HSV2 +	0,388	-	0,65	-	-	-	-
111	Female	37	-	<0.9	+	1397	0,09	-	1,71	HSV2 +	0,188	-	0,601	-	-	-	-
102	Male	36	+	1,87	+	1098	0,64	-	2,3	HSV2 +	1,52	HSV+1	0,5	-	-	-	-
103	Female	57	-	<0.9	+	2205	0,15	-	2,17	HSV2 +	9,63	HSV+1	0,5	-	-	-	-
112	Female	80	+	19,1	+	1658	13,53	HSV1 +	1,92	HSV2 +	18,7	HSV+1	0,5	-	HSV-1	+	-
113	Female	77	+	22,9	+	1373	26,37	HSV1 +	1,63	HSV2 +	39,1	HSV+1	0,5	-	HSV-1	+	-
114	Male	54	+	23,7	+	3166	33,18	HSV1 +	1,32	HSV2 +	50	HSV+1	0,5	-	HSV-1	+	-
115	Male	69	+	>30.0	+	1057	33,37	HSV1 +	1,1	HSV2 +	51,1	HSV+1	0,5	-	HSV-1	+	-
116	Female	53	+	20,9	+	766,2	4,8	HSV1 +	6,29	HSV2 +	15,6	HSV+1	0,5	-	HSV-1	+	-
117	Female	65	+	28,1	+	2158	22,85	HSV1 +	20,05	HSV2 +	34,6	HSV+1	0,5	-	HSV-1 + 2	+	+
118	Male	69	+	>30.0	+	1005	33,65	HSV1 +	1,03	HSV2 +	49,6	HSV+1	0,5	-	HSV-1	+	-
119	Female	44	+	20,8	+	1443	8,82	HSV1 +	0,79	-	15,2	HSV+1	24,8	HSV2+	HSV-1	+	-
120	Female	51	-	<0.9	+	351,5	1,94	HSV1 +	0,05	-	3,35	HSV+1	0,5	-	HSV-1	+	-
121	Male	27	-	<0.9	+	927,4	2,02	HSV1 +	0,13	-	10,2	HSV+1	0,5	-	HSV-1	+	-
122	Male	36	+	1,87	+	1505	0,38	-	0,52	-	0,556	-	0,5	-	-	-	-
123	Female	36	+	4,85	+	3241	0,96	-	0,17	-	0,265	-	0,5	-	HSV-1	+	-
124	Male	66	+	3,16	+	1091	0,81	-	0,1	-	0,882	-	0,5	-	HSV-1	+	-





## Serment De Galien

---

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Attention, ne supprimez pas le saut de section suivant (page suivante non numérotée)

## **Outils diagnostics pour les infections à alphaherpèsvirus – Mise au point d'une méthode de détection de synthèse intrathécale d'IgG anti-HSV et anti-VZV**

---

Dans le contexte des infections à herpès simplex, la sérologie est un outil indispensable pour définir le statut d'une femme enceinte ou d'un patient immunodéprimé. L'évaluation des trousseaux utilisés dans ces situations est indispensable afin de définir leurs performances respectives. En effet, des erreurs dans la définition du statut sérologique peuvent conduire à des modifications de stratégies thérapeutiques aux conséquences potentiellement graves. Le premier objectif de cette étude est de comparer les performances de 2 trousseaux de dosage des IgG anti-HSV-1 et HSV-2 de Abbott® et DiaSorin®, le second est la mise au point d'une technique permettant de déterminer la synthèse intrathécale d'un patient à partir d'outil de mesure des IgG anti-alphaherpèsvirus développé initialement pour le sérum. La détermination d'une synthèse intrathécale avec production d'immunoglobulines de type G (IgG) anti-HSV ou anti-VZV permet le diagnostic rétrospectif d'encéphalite ou méningo-encéphalite herpétique, ou d'encéphalite varicelleuse, mais aussi le diagnostic étiologique de vasculopathies neurologique post-varicelleuse.

Notre évaluation met en évidence une meilleure concordance pour les trousseaux de détection des IgG anti-HSV-1 que celles détectant les IgG anti-HSV-2. La technique DiaSorin® est la plus sensible (99,3% contre 97,4%) pour la détection d'IgG anti-HSV-1, tandis que la technique Abbott® est la plus sensible (100% contre 93,9%) pour la détection d'IgG anti-HSV-2 au détriment d'une plus faible spécificité.

Après plusieurs étapes préliminaires permettant de valider les trousseaux HSV-G et VZV-G dans le LCS nous retrouvons 10 index anticorps VZV ainsi que 5 index anticorps HSV positifs sur un échantillonnage de 187 LCS – sérums. Des équations de droites pour la détermination des concentrations inférieure au seuil de détection et un algorithme de prise en charge d'un prélèvement sont proposés.

---

**Mots-clés :** [Synthèse intrathécale, herpès simplex virus, varicelle-zona virus]

## **Diagnostic tools for alphaherpesvirus infections - Development of a detection method for intrathecal IgG synthesis of anti-HSV and anti-VZV**

---

In the context of herpes simplex infections, serology is an indispensable tool to define the status of a pregnant woman or an immunocompromised patient. Evaluation of the kits used in these situations is essential to define their respective performances. Indeed, errors in the definition of the serological status can lead to modifications of therapeutic strategies with potentially serious consequences. The first objective of this study is to compare the performances of 2 assay kits for anti-HSV-1 and HSV-2 IgG from Abbott® and DiaSorin®, the second is the development of a technique to determine the intrathecal synthesis of a patient from the anti-alphaherpesvirus IgG measurement tool initially developed for serum.

Our evaluation shows a better concordance for anti-HSV-1 IgG detection kits than for anti-HSV-2 IgG detection kits. The DiaSorin® technique is the most sensitive (99.3% vs. 97.4%) for the detection of anti-HSV-1 IgG, while the Abbott® technique is the most sensitive (100% vs. 93.9%) for the detection of anti-HSV-2 IgG at the expense of a lower specificity.

After several preliminary steps to validate the HSV-G and VZV-G kits in the CSF, we found 10 positive VZV antibody indexes and 5 positive HSV antibody indexes on a sample of 187 CSF-sera. Equations of lines for the determination of concentrations below the detection threshold and an algorithm for the management of a sample are proposed.

---

**Keywords :** [intrathecal synthesis, herpesvirus, varicella zoster virus]

