

Kératite herpétique expérimentale du lapin

Étude comparée du pouvoir pathogène des virus de type 1 et 2*

Durwagner Barros da Silveira **

INTRODUCTION

La kératite herpétique est une des principales causes de cécité cornéenne dans les pays européens (J. Lemire) (9). L'évolution de l'herpès oculaire reste imprévisible, soit bénigne et rapidement résolutive, soit compliquée de segmentites antérieures, d'uvéïtes et émaillée de récidives. Quels sont ces "imprévus" qui règlent le cours de la maladie? S'agit-il d'une modification de résistance de l'hôte, ou d'un changement de constitution de la souche virale? Plusieurs facteurs agissent directement sur la résistance du malade: traitements par corticoïdes ou immunodépresseurs, altérations de la flore conjonctivale normale par les antibiotiques, modification de l'environnement, présence d'un terrain allergique... Mais la nature de la souche virale infectante est-elle également en cause?

Il existe deux types de virus herpétique antigéniquement distincts (A. J. Nahmias et B. Roizman (12), G. Plummer et coll. (19)). Le virus de type 1 prédomine dans les lésions cutanées de la moitié supérieure du corps, sur la face et les yeux. Le virus de type 2 se localise au dessous de la ceinture dans les régions uro-génitales, se transmet par voie vénérienne, et un contage mère-enfant est à l'origine des infections du nouveau-né; enfin, ce virus semble favoriser l'apparition des cancers du col utérin. La répartition des territoires cutané-muqueux entre les deux types de virus n'est pas stricte (A. J. Nahmias et A. M. Visintine) (13). Des virus de type 1 sont signalés dans les lésions génitales et dans 30% des infections néo-natales herpétiques (A. J. Nahmias et coll.) (14). Inversement, des virus de type 2 ont été isolés de lésions faciales et oculaires (J. Colin et coll. (3), J. Denis et M. Langlois (4), L. Hanna et coll. (5), D. Neumann-Haefelin et coll. (15), J. O. Oh et coll. (16)). L'atteinte clinique de l'oeil par le virus de type 2 paraît plus souvent sévère tant en clinique humaine qu'expérimentalement (T. R. Stevens et J. O. Oh) (22).

Le but de ce travail est la comparaison clinique et anatomo-pathologique des herpès

oculaires expérimentaux de type 1 et 2 chez le lapin. Deux méthodes d'inoculation oculaire sont pratiquées en parallèle: scarifications cornéennes et instillations simples de la suspension virale.

MATERIEL ET METHODES

Les animaux utilisés sont 34 lapins femelles, Fauve de Bourgogne, de 2 kgs à 2.5 kgs.

Les souches virales herpétiques sont typées par séroneutralisation et étude de la thermosensibilité. La souche de Type 1 est isolée de la gorge d'un enfant, la souche de type 2 d'un herpès palpébral. Les suspensions virales utilisées sont les surnageants de cultures sur cellules KB:

— Deux suspensions de type 1, l'une de titre 10^{-3} , l'autre 10^{-4} ;

— Et deux suspensions de type 2, l'une de titre 10^{-1} , l'autre 10^{-4} .

L'inoculation est pratiquée à l'oeil droit, après examen du segment antérieur à la lampe à fente et observation du fond d'oeil, selon deux procédés, au cours de deux expériences séparées.

1.° — 12 lapins subissent, après instillation de novésine, des scarifications cornéennes au vaccinostyle, 3 traits horizontaux et 3 verticaux. Puis la cornée est frottée énergiquement avec un tampon de coton cardé trempé dans la suspension virale de type 1, titrant 10^{-3} , pour 6 animaux, et de type 2, titrant 10^{-1} , pour les 6 autres.

2.° — 22 lapins sont inoculés sans traumatisme préalable, par instillation simple de 0,1 ml de suspension virale, de titre 10^{-4} . Puis les paupières sont maintenues fermées pendant 10 à 20 secondes. 8 animaux sont inoculés avec la suspension de type 1 et 14 avec celle de type 2.

Surveillance clinique et traitement. A partir du 2^e jour après l'inoculation, une pommade antibiotique est appliquée quotidiennement, afin d'éviter les surinfections bactériennes — Les lapins inoculés par scarifications reçoivent de la terramycine, ceux

* Mémoire pour le Titre D'Assistant Etranger. Clinique de l'Ophthalmologie de Broussais (Pr. Y. Pouliquen), Ophthalmologie de l'Hôtel-Dieu (Dr. J. Denis) — 1980.

** Médico Assistente do Departamento de Oftalmologia do Hospital Getulio Vargas — CCS — F.U.F.Pi. — Serviço Ophthalmologique de l'Hôtel-Dieu (Pr. G. Offret), du Service et du Laboratoire de Virologie de la Clinique Ophtal-

inoculés par instillation de la gentamycine. Pour éviter les contaminations entre animaux, chacun d'eux possède son tube personnel de pomnade.

Examens à la lampe à fente et photos sont pratiqués tous les 2 jours pendant 20 jours, jusqu'à 30 jours pour les lapins inoculés avec le virus de type 2.

Lors de chaque examen, la surface épithéliale cornéenne retenant la fluorescéine et la surface cornéenne opacifiée sont évaluées de la façon suivante:

- 1: lésion minimale
- 2: lésion occupant 1/4 de la surface cornéenne
- 3: lésion occupant la moitié de la surface cornéenne
- 4: lésion occupant les 3/4 de la surface cornéenne
- 5: lésion de toute la cornée

Un **contrôle bactériologique** est pratiqué sur gélose au sang frais, le 2^e jour après l'inoculation, avant l'application de la pomnade à la terramycine aux 12 lapins ayant subi des scarifications.

L'**étude virologique** comporte un essai d'isolement de souche virale sur cellules diploïdes humaines Wi 38 tous les 2 ou 3 jours, au cours de la première expérience avec inoculations par scarifications. Les prélèvements cornéo-conjonctivaux sont effectués par écouvillonnage des lésions à l'aide d'un tampon de coton cardé monté sur une tige en bois. Les souches virales sont conservées congelées à -20°C ou -80°C. Les premières et dernières souches isolées de chaque lapin sont typées par neutralisation et étude de la thermosensibilité.

— **La réaction de neutralisation** est pratiquée selon la micro-méthode en plaques de F. P. Pauls et W. R. Dowdle (18), sur cellules Wi 38. Les souches sont neutralisées au moyen des antisérums spécifiques antitype 1 et antitype 2.

— **La réaction de thermosensibilité** (H. Ratcliffe) (20) met en évidence la capacité du virus de type 1 à se multiplier à 40°C, alors que le virus de type 2, thermosensible, ne se multiplie pas ou très peu. Le titrage des particules virales, effectué en parallèle après multiplication à 37°C et à 40°C, définit la souche étudiée.

En vue d'un examen **anatomopathologique**, les animaux sont sacrifiés à des jours bien définis tout au long de l'évolution. Les animaux scarifiés sont tués au nombre de 2 dans chacun des deux lots correspondant aux 2 types de virus, les 3^e, 10

Les lapins instillés sont tués également au nombre de 2 dans chacun des deux lots, les 3^e ou 4^e, 7^e et 10^e jours; les animaux inoculés avec le type viral 2 continuent à être

sacrifiés les 14^e, 20^e et 27^e jours. Les globes oculaires droits sont prélevés par énucléation, fixés dans la solution de Bouin, inclus en paraffine, coupés et colorés à l'hématéine-éosine. En cas d'atteinte du système nerveux, cerveau, tronc cérébral et moëlle cervicale sont également prélevés et fixés dans la solution de Bouin. C'est ainsi que 5 lapins ayant reçu des instillations de type 2 ont fait l'objet d'une étude anato-pathologique neurologique aux 10^e, 11^e, 14^e et 27^e jours.

RESULTATS

L'examen de 12 lapins inoculés par scarifications cornéennes et de 22 autres inoculés par simple instillation de suspensions virales de type 1 et 2 permet d'établir une double comparaison, entre les deux techniques d'inoculation d'une part, et d'autre part entre les deux types de virus.

L'**examen clinique** met en évidence la supériorité de l'inoculation par instillation de virus, plus proche de la réalité. Après scarifications, les kératites de type 2 sont plus graves et plus longues que celles de type 1 (Fig. 1 et 2). Les kératites de type 1 se pré-

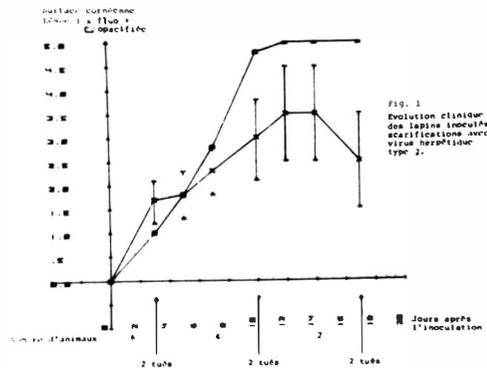
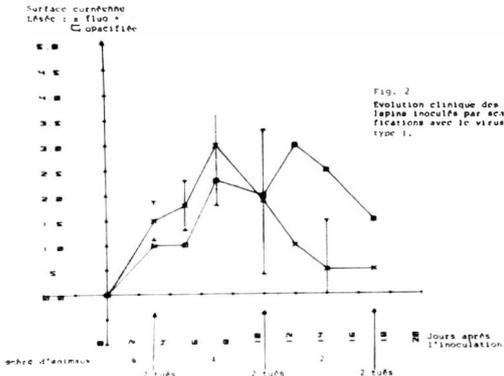


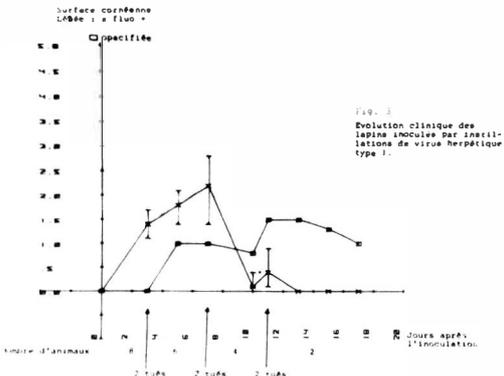
FIG. 1
Evolution clinique
des lapins inoculés par
scarifications avec le
virus herpétique
type 2.

sentent sous forme de dentrites, parfois compliquées de vastes ulcères ou d'oedème du stroma. Les altérations épithéliales sont maxima vers le 8^e jour et la guérison ou la stabilisation des lésions a lieu vers le 15^e ou le 17^e jour. Les ulcérations cornéennes de type 2 sont plus vastes, moins typiquement dentritiques, atteignant leur surface maximum plus tardivement vers le 12^e, 14^e jour, et s'accompagnent à peu près toujours d'un gros oedème du stroma, envahissant toute la cornée entre le 7^e et le 10

l'examen de la chambre antérieure. C'est à ce moment qu'apparaissent chez tous les animaux des signes neurologiques: paralysie du train postérieur ou hémiplégie du côté inoculé.



L'inoculation par instillation permet d'obtenir des lésions moins importantes. Les ulcérations, souvent denticritiques, dues au virus de type 1 sont moins étendues, guérissent plus rapidement (Fig. 3) et les opacités du stroma apparaissent plus tardivement qu'après scarifications et restent moins importantes. L'instillation du virus de type 2 est suivie d'altérations éminemment variables selon chaque lapin. L'évolution de la maladie est en général plus longue (Fig. 4), un mois



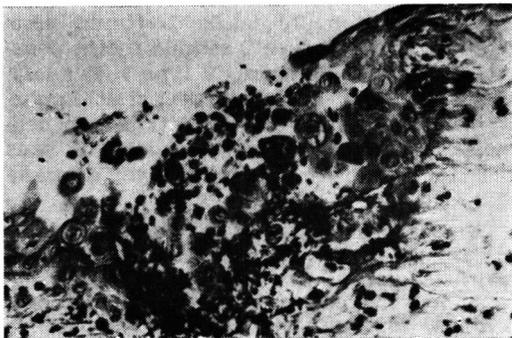


Fig. 5 — Lapin scarifié avec du virus herpétique de type 2. 10^e jour. Persistance d'ulcère cornéen et altérations nucléaires des cellules des bords de l'ulcération.

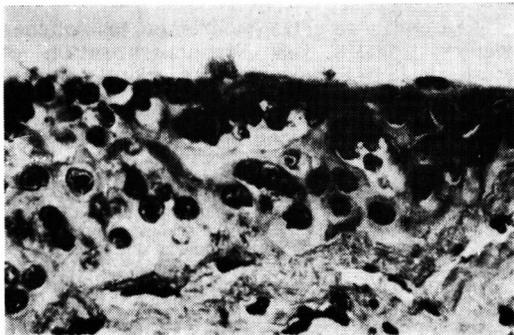


Fig. 6 — Lapin instillé avec du virus herpétique type 1. 3^e jour. Infection cellulaire à tous les étages de l'épithélium et présence d'inclusions intranucléaires du type A de COWDRY. Constatation de conglomérats de noyaux avec disparition des cytoplasmes.

eux, les prélèvements sont pratiqués entre le 10^e et le 14^e jour. Les lésions inflammatoires prédominent au niveau de la substance grise de la base du cerveau, mais surtout du tronc cérébral et de la moëlle cervicale. Parfois une méningite est associée, touchant de préférence la base du cerveau. Un animal, tué le 27^e jour, alors que les paralysies ont régressé, montre une prédominance des lésions inflammatoires dans le tronc cérébral et le bulbe, comparée à une inflammation discrète de la base du cerveau. Au niveau de la moëlle, il existe un foyer récent de ramollissement avec corps granuleux, situé unilatéralement dans le faisceau pyramidal.

DISCUSSION

L'étude comparée de la kératite herpétique expérimentale du lapin de type 1 et 2 montre la supériorité de la technique d'inoculation par instillations. La pratique des scarifications cornéennes ne permet pas d'obtenir un lot homogène d'animaux, car la

profondeur des traits est inégale, comme le prouve l'examen anatomo-pathologique. Si un traumatisme cornéen préalable doit être effectué, il faut utiliser une méthode instrumentale très codifiée du type de celle de B. R. Jones et coll. (7).

La kératite expérimentale du lapin de type 2 est plus inflammatoire que celle de type 1, avec oedème cornéen interstitiel important, uveïte antérieure. L'évolution est plus longue, 1 mois environ. Les constatations sont en accord avec celles décrites par d'autres auteurs (1, 2, 8, 11, 12, 17, 19). Les lapins instillés avec du virus herpétique de type 2, présentent classiquement un retard dans l'apparition des premiers signes cliniques jusqu'au 5^e ou 7^e jour. En fait au cours de notre expérience les animaux instillés avec du virus de type 2 peuvent être grossièrement divisés en 2 groupes. Les uns ont des ulcérations cornéennes précoces et une évolution toujours grave, superposable à celle des lapins scarifiés. On peut se poser la question de l'existence de microtraumatisme cornéen préalable, passé inaperçu. Les autres animaux présentent une atteinte oculaire plus tardive, très variable d'un lapin à l'autre dans sa gravité. Les ulcérations peuvent être fugaces et l'oedème du stroma, sans relation avec l'étendue des altérations épithéliales, ne survient que dans la moitié des cas. L'affinité pour l'oeil du virus de type 2 semble moins constante que celle du virus de type 1. En clinique humaine, le virus herpétique de type 1 est l'agent contaminant essentiel de l'oeil, et le virus de type 2, génital, ne reste le plus souvent qu'un contaminant occasionnel, comme le prouvent les différentes études statistiques (1, 3, 4, 5, 6, 15, 16, 21).

L'étude anatomo-pathologique oculaire confirme celle de T. R. Stevens et J. O. Oh (22).

Les troubles neurologiques observés chez les lapins sont très différents selon le type viral en cause. Le virus de type 1 entraîne parfois une encéphalite mortelle. Avec le virus de type 2, des paralysies du train postérieur et des hémiplegies surviennent entre les 10^e et 13^e jours, le plus souvent en même temps que l'oedème du stroma cornéen, et évoluent vers une encéphalite fatale ou vers une régression des troubles. Cette différence entre les 2 types de virus est connue depuis longtemps (C. Levaditi et coll — 1938) (10).

L'étude anatomo-pathologique montre que les lésions postérieures sont prédominantes dans le tronc cérébral, dans les noyaux gris, et dans la moëlle, au niveau du tissu gris ou des cordons blancs latéraux. L'atteinte basale des hémisphères cérébraux est plus variable. Le rôle des virus herpétiques en neurologie humaine est souvent évo-

qu'é sans que l'on puisse avoir généralement de preuves formelles.

L'étude virologique montre que l'isolement des souches virales est plus facile tant qu'il persiste des ulcérations cornéennes. Les souches virales testées par neutralisation et étude de la thermosensibilité ne se sont pas modifiées au cours de l'expérience. En effet des changements dans le comportement des souches ont été parfois signalées (J. Denis et M. Langlois) (4) chez un même malade, soit au cours de deux prélèvements successifs, soit à la suite de deux prélèvements simultanés, oculaire et cutané.

Soulignons la fréquence des surinfections bactériennes au cours des kératites herpétiques expérimentales du lapin, qui nécessite un traitement prophylactique précoce par une pommade ophtalmique antibiotique. *Staphylococcus aureus* est la principale bactérie en cause. La pommade à la gentamycine nous paraît la meilleure thérapeutique.

RESUME ET CONCLUSIONS

L'étude comparée de la kératite expérimentale de type 1 et 2, pratiquée sur 34 lapins Fauve de Bourgogne, montre la supériorité de la technique d'inoculation par instillations sans scarifications cornéennes préalables. L'usage précoce d'une pommade antibiotique est indispensable à la prévention des surinfections bactériennes. La pommade à la gentamycine paraît efficace.

Les kératites après instillations de virus herpétique de type 1 se présentent sous forme de dendrites, parfois compliquées de vastes ulcères ou d'oedème du stroma. L'intensité maximale des lésions se situe vers le 8^e jour et la guérison ou la stabilité vers le 15^e ou le 17^e jour. Parfois une encéphalite mortelle apparaît aux environs du 10^e jour.

Les kératites dues au virus herpétique de type 2 sont en règle générale, plus inflammatoires que celles de type 1, avec oedème cornéen interstitiel important, uvéite antérieure et évolution plus longue, d'un mois. Elles se présentent grossièrement sous deux formes, possibles. Les unes suivent un schéma évolutif semblable à celui obtenu après scarifications cornéennes; ces animaux ont peut-être subi un microtraumatisme cornéen préalable, passé inaperçu. Le plus souvent, le début de la kératite est retardée jusqu'au 5^e ou 7^e jour et l'atteinte oculaire est très variable d'un lapin à l'autre. Les ulcérations cornéennes, moins typiquement dendritiques, sont parfois fugaces. L'oedème du stroma apparaît dans la moitié des cas et précède le plus souvent l'apparition de troubles paralytiques qui évoluent vers une régression ou

vers une encéphalite fatale. L'affinité pour l'oeil du virus de type 2 semble moins constante que celle du virus de type 1. Par contre, son action neurologique paraît importante. Le rôle des virus herpétiques en neurologie humaine est souvent évoqué, sans que l'on puisse avoir généralement de preuves formelles.

L'étude anatomo-pathologique oculaire confirme l'ampleur des phénomènes inflammatoires dus au virus de type 2, avec souvent, dans ces cas, présence de nodules choroïdiens périphériques.

Les lésions neurologiques de type 2 sont essentiellement postérieures et prédominent dans le tronc cérébral et la moëlle. L'atteinte basale des hémisphères cérébraux est variable.

Au cours de cette expérience, les souches virales, testées par séroneutralisation et étude de la thermosensibilité, n'ont subi aucune modification.

RESUMO

O estudo comparado da ceratite experimental do tipo 1 e 2, praticado sobre 34 coelhos amarelo-tostados de Borgonha, mostra a superioridade da técnica de inoculação por instilação sem escarificações corneanas prévias. O uso precoce de uma pomada antibiótica é indispensável para prevenir infecções bacterianas. A pomada de gentamicina parece eficaz.

As ceratites após instalações do vírus herpético tipo 1 se apresentam sob formas dendríticas, às vezes complicadas por extensas úlceras ou por edema do estroma. A intensidade máxima das lesões são verificadas no 8.^o dia e a cura ou a estabilidade em torno do 15.^o ou do 17.^o dia. Às vezes uma encefalite mortal aparece em torno do 10.^o dia.

As ceratites ocasionadas pelo vírus herpético do tipo 2 são geralmente mais inflamatórias do que aquelas do tipo 1, com importante edema corneano intersticial, uveíte anterior e de evolução mais longa, de um mês. Elas se apresentam grosseiramente sob duas formas possíveis. Um segundo uma evolução semelhante àquela que se observa após escarificações corneanas; os animais talvez tenham sofrido um microtraumatismo corneano prévio que passou despercebido. Na maioria das vezes, o início da ceratite retardou-se até o 5.^o ou 7.^o dia e a lesão ocular bastante variável de um coelho a outro. As ulcerações corneanas, menos tipicamente dendríticas, são às vezes fugazes. O edema do estroma aparece na metade dos casos e precede na maioria das vezes o aparecimento de alterações paralíticas que evoluem para uma regressão ou para uma encefalite fatal. A afinidade para o olho pelo vírus do tipo 2 parece menos constante que pelo vírus do tipo 1. Pelo contrário, sua ação neurológica parece importante. O papel do vírus do herpes em neurologia humana foi muitas vezes lembrado, mas não se tem formas gerais concretas.

O estudo anatômico-patológico ocular confirma a amplitude dos fenômenos inflamatórios pelo vírus do tipo 2, na maioria das vezes, nestes casos, pela presença de nódulos coroideanos periféricos.

As lesões neurológicas pelo tipo 2 são essencialmente posteriores localizando-se no tronco cerebral e na medula. A lesão basal dos hemisférios cerebrais é variável.

No decorrer desta experiência, as cepas virais testadas por soroneutralização e testadas pelo estudo da termossensibilidade, não sofreram nenhuma modificação.

BIBLIOGRAPHIE

1. BINDER S. PERRY — Review herpes simplex keratitis. *Survey of Ophthalmology*, 1977, 21: 313-331.
2. BROWN, D. C. — Ocular herpes simplex. *Invest. Ophthalmol.*, 1971, 10: 210-213.
3. COLIN, J.; CHASTEL, C.; RENARD, G. & QUERE, M. A. — L'herpès oculaire: relations possibles entre la gravité clinique et le type antigénique du virus. *Soc. Ophtal. Paris*, 8 avril 1978. *Bull. Soc. Ophtal. Fr.* (in press).
4. DENIS, J. & LANGLOIS, M. — L'herpès oculaire: variations cliniques et type antigénique viral. *J. Fr. Ophtalmol.*, 1978, 1: 655-660.
5. HANNA, L.; OSTLER, H. B. & KESHISHYAN, H. — Observed relationship between herpetic lesions and antigenic type of herpes virus hominis. *Surv. Ophthalmol.*, 1976, 21: 110-114.
6. HOLLENBERG, M. J.; WILKIE, J. S.; HUDSON, J. B. & LEWIS, B. J. — Lesions produced by human herpes viruses 1 and 2. Morphologic features in rabbit corneal epithelium. *Arch. Ophthalmol.*, 1976, 94: 127-134.
7. JONES, B. R.; WISE, J. B. & PATTERSON, A. — Evaluation of Drug effects on the Eye. F. J. Parsons Ltd., London, 1969, 83-98.
8. KAUFMAN, H. E.; BROWN, D. C. & ELLISON, E. M. — Recurrent herpes in the rabbit and man. *Science*, 1967, 156: 1628-1629.
9. LEMIRE, J. — Infection herpétique en Ophtalmologie. *L'union Médicale du Canada*, 1976, 105, 1560-1563.
10. LEVADITI, C. & LEPINE, P. — Les ultravirus des maladies humaines, 1938. Librairie Maloine. Paris.
11. NAHMIAS, A. J. & DOWDLE, W. R. — Antigenic and biologic differences in herpes virus hominis. *Prog. Med. Virol.*, 1968, 10: 110-159.
12. NAHMIAS, A. J. & ROIZMAN, B. — Infection with herpes simplex virus 1 and 2. *New England J. Med.*, 1973, 289: 667-674, 719-725, 781-789.
13. NAHMIAS, A. J. & VISINTINE, A. M. — Type 2 herpes simplex virus infections. *Surv. Ophthalmol.*, 1976, 21: 115-120.
14. NAHMIAS, A. J.; VISINTINE, A. M.; CALDWELL, D. R. & WILSON, L. A. — In neonates. *Surv. Ophthalmol.*, 1976, 21: 100-105.
15. NEUMANN-HAEFLELIN, D.; SUNDMACHER, R.; WOCHNIK, G. & BABLOCK, B. — Herpes simplex virus types 1 and 2 in ocular disease. *Arch. Ophthalmol.*, 1978, 96: 64-69.
16. OH, J. O.; KIMURA, S. J. & OSTLER, H. B. — Acute ocular infection by type 2 herpes simplex virus in adults. *Arch. Ophthalmol.*, 1975, 93: 1127-1129.
17. OH, J. O.; MOSCHINI, G. B.; OKUMOTO, M. & STEVENS, T. R. — Ocular pathogenicity of types 1 and 2 herpes-virus hominis in rabbits. *Infection and Immunity*, 1972, 5: 412-413.
18. PAULS, F. P. & DOWDLE, W. R. — A serologic study of herpes virus hominis strains by microneutralization tests. *J. Immunol.*, 1967, 98: 941-947.
19. PLUMMER, G.; WANER, J. L.; PHUANGSAB, A. & GOODHEART, C. R. — Type 1 and 2 herpes simplex viruses: serological and biological differences. *J. Virol.*, 1970, 5: 51-59.
20. RATCLIFFE, H. — The differentiation of herpes simplex virus type 1 and 2 by temperature markers. *J. gen. Virol.*, 1971, 13: 181-183.
21. SAWANONORI, S.; TANAKAN & GOTO, E. — Classification of herpes virus isolates from ocular lesion. *Acta. Soc. Ophtal. Jap.*, 1973, 77: 521-530.
22. STEVENS, T. R. & OH, J. O. — Comparaison of types 1 and 2 herpes virus hominis infection of rabbit eyes. *Arch. Ophtal.*, 1973, 90. Clinical manifestations, 473-476. Histopathologie and virologic studies, 477-480.