

Faculté de Médecine

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 19 avril 2024

Par Pierre-Louis LEDOUX

Recherche de CMV par qPCR dans les différentes couches tissulaires de greffons cornéens après dissection

Thèse dirigée par Dr Maxime ROCHER

Examineurs :

M. le Professeur Pierre-Yves ROBERT, PU-PH, CHU Limoges

Mme le Professeur Sophie ALAIN, PU-PH, CHU Limoges

M. le Professeur Sébastien HANTZ, PU-PH, CHU Limoges

M. le Professeur Marc MURAINÉ, PU-PH, CHU Rouen

M. le Docteur Maxime ROCHER, CCA, CHU Limoges

Président et juge

Juge

Juge

Juge

Membre invité



Faculté de Médecine

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 avril 2024

Par Pierre-Louis LEDOUX

**Recherche de CMV par qPCR dans les différentes couches
tissulaires de greffons cornéens après dissection**

Thèse dirigée par Dr Maxime ROCHER

Examineurs :

M. le Professeur Pierre-Yves ROBERT, PU-PH, CHU Limoges

Mme le Professeur Sophie ALAIN, PU-PH, CHU Limoges

M. le Professeur Sébastien HANTZ, PU-PH, CHU Limoges

M. le Professeur Marc MURAINÉ, PU-PH, CHU Rouen

M. le Docteur Maxime ROCHER, CCA, CHU Limoges

Président et juge

Juge

Juge

Juge

Membre invité



Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur **Pierre-Yves ROBERT**

Assesseurs

Madame le Professeur **Marie-Cécile PLOY**

Monsieur le Professeur **Jacques MONTEIL**

Monsieur le Professeur **Laurent FOURCADE**

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
AUBRY Karine	O.R.L.
BALLOUHEY Quentin	CHIRURGIE INFANTILE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHRISTOU Niki	CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE D'ADULTES
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DELUCHE Elise	CANCEROLOGIE
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
DUCHESNE Mathilde	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
HOUETO Jean-Luc	NEUROLOGIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JACQUES Jérémie	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION
JOUAN Jérôme	CHIRURGIE THORACIQUE ET VASCULAIRE
LABROUSSE François	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
LY Kim	MEDECINE INTERNE
MAGNE Julien	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARCHEIX Pierre-Sylvain	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE

MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
OLLIAC Bertrand	PEDOPSYCHIATRIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
ROUCHAUD Aymeric	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
STURTZ Franck	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
TCHALLA Achille	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
TOURE Fatouma	NEPHROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
WOILLARD Jean-Baptiste	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE
YERA Hélène	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

Professeurs Associés des Universités à mi-temps des disciplines médicales

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE
KARAM Henri-Hani	MEDECINE D'URGENCE
MOREAU Stéphane	EPIDEMIOLOGIE CLINIQUE
VANDROUX David	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION

Maitres de Conférences des Universités – Praticiens Hospitaliers

COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
COUVE-DEACON Elodie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
FAYE Pierre-Antoine	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
FREDON Fabien	ANATOMIE/CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
GEYL Sophie	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
LALOZE Jérôme	CHIRURGIE PLASTIQUE
LE GUYADER Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE
LIA Anne-Sophie	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARGUERITTE François	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
PASCAL Virginie	IMMUNOLOGIE
RIZZO David	HEMATOLOGIE
SALLE Henri	NEUROCHIRURGIE
SALLE Laurence	ENDOCRINOLOGIE
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
TRICARD Jérémy	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO- VASCULAIRE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	ANGLAIS
-----------------------	---------

Maitre de Conférences des Universités associé à mi-temps

BELONI Pascale

SCIENCES INFIRMIERES

Professeur des Universités de Médecine Générale

DUMOITIER Nathalie

(Responsable du département de Médecine Générale)

Maitres de Conférences des Universités de Médecine Générale

RUDELLE Karen

Professeur associé des Universités à mi-temps de Médecine Générale

HOUDARD Gaëtan

(du 01-09-2019 au 31-08-2025)

LAUCHET Nadège

(du 01-09-2023 au 31-08-2026)

Maitres de Conférences associés à mi-temps de médecine générale

BAUDOT Pierre-Jean

(du 01-09-2023 au 31/08/2026)

BUREAU-YNIESTA Coralie

(du 01-09-2022 au 31-08-2025)

SEVE Léa

(du 01-09-2021 au 31-08-2024)

Professeurs Emérites

ALDIGIER Jean-Claude

du 01-09-2018 au 31-08-2022

DARDE Marie-Laure

du 01-09-2021 au 31-08-2023

MABIT Christian

du 01-09-2022 au 31-08-2024

MERLE Louis

du 01-09-2017 au 31-08-2022

NATHAN-DENIZOT Nathalie

du 01-09-2022 au 31-08-2024

TREVES Richard

du 01-09-2021 au 31-08-2023

VALLAT Jean-Michel

du 01-09-2019 au 31.08.2023

VIROT Patrice

du 01-09-2021 au 31-08-2023

Assistants Hospitaliers Universitaires

ABDALLAH Sahar	ANESTHESIE REANIMATION
BOYER Claire	NEUROLOGIE
HAZELAS Pauline	BIOCHIMIE
CUSSINET Lucie	ORL
FERRERO Pierre-Alexandre	CHIRURGIE GENERALE
FRAY Camille	PEDIATRIE
GRIFFEUILLE Pauline	IPR
HERAULT Etienne	PARASITOLOGIE
JADEAU Cassandra	HEMATOLOGIE BIOLOGIE
KHAYATI Yasmine	HEMATOLOGIE
LABRIFFE Marc	PHARMACOLOGIE
LAIDET Clémence	ANESTHESIOLOGIE REANIMATION
MEYER Sylvain	BACTERIOLOGIE VIROLOGIE HYGIENE
PERANI Alexandre	GENETIQUE
PLATEKER Olivier	ANESTHESIE REANIMATION
SERVASIER Lisa	CHIRURGIE OPTHOPEDIQUE

Chefs de Clinique – Assistants des Hôpitaux

ABDELKAFI Ezedin	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE
ADJOBIMEY Mênonli	MEDECINE DU TRAVAIL
AGUADO Benoît	PNEUMOLOGIE
ANNERAUD Alicia	HEPATOLOGIE GASTROENTEROLOGIE
AUBOIROUX Marie	HEMATOLOGIE
BAUDOIN Maxime	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE

BEAUJOUAN Florent	CHIRURGIE UROLOGIQUE
BERENGER Adeline	PEDIATRIE
BLANCHET Aloïse	MEDECINE D'URGENCE
BONILLA Anthony	PSYCHIATRIE
BOUTALEB Amine Mamoun	CARDIOLOGIE
BURGUIERE Loïc	SOINS PALLIATIFS
CAILLARD Pauline	NEPHROLOGIE
CATANASE Alexandre	PEDOPSYCHIATRIE
CHASTAINGT Lucie	MEDECINE VASCULAIRE
CHROSCIANY Sacha	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
COLLIN Rémi	HEPATO GASTRO ENTEROLOGIE
COUMES-SALOMON Camille	PNEUMOLOGIE ALLERGOLOGIE
DELPY Teddy	NEUROLOGIE
DU FAYET DE LA TOUR Anaïs	MEDECINE LEGALE
FESTOU Benjamin	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES
FRACHET Simon	NEUROLOGIE
GADON Emma	RHUMATOLOGIE
GEROME Raphaël	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
GOURGUE Maxime	CHIRURGIE CARDIOVASCULAIRE
LADRAT Céline	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
LAGOUEYTE Benoit	ORL
LAPLACE Benjamin	PSYCHIATRIE
LEMACON Camille	RHUMATOLOGIE
MEYNARD Alexandre	NEUROCHIRURGIE
MOI BERTOLO Emilie	DERMATOLOGIE
NASSER Yara	ENDOCRINOLOGIE

PAGES Esther	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE
PARREAU Simon	MEDECINE INTERNE
ROCHER Maxime	OPHTALMOLOGIE
SEGUY ép. REBIERE Marion	MEDECINE GERIATRIQUE
TALLIER Maïa	GERIATRIE
TRAN Gia Van	NEUROCHIRURGIE
VERNIER Thibault	NUTRITION

Chefs de Clinique – Médecine Générale

CITERNE Julien
HERAULT Kévin
VANDOOREN Maïté

Praticiens Hospitaliers Universitaires

DARBAS Tiffany	ONCOLOGIE MEDICALE
HARDY Jérémie	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
LAFON Thomas	MEDECINE D'URGENCE

Raku wa ku no tane, ku wa raku no tane

Proverbe japonais

Remerciements

**A notre Maître et Président du jury,
Monsieur le Professeur Pierre-Yves ROBERT,
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Chef du service d’Ophtalmologie du CHU de Limoges,**

Vous me faites l’honneur de présider ce jury et je vous en remercie.

Merci également pour la bienveillance et l’écoute que vous portez à tous dans le service, ainsi que pour votre inébranlable optimisme, qui permettent à chacun de vos internes de trouver sa voie dans notre belle spécialité.

Soyez assuré de ma grande reconnaissance et de mon profond respect.

A nos Maîtres et Juges,

**Madame le Professeur Sophie ALAIN,
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Service de Bactériologie-Virologie du CHU de Limoges,**

Je vous remercie de vous être portée avec enthousiasme sur ce travail et d'avoir accepté de le juger.

Il m'aura permis de partager quelques heures au laboratoire au sein de votre équipe. J'ai pu y recevoir un accueil chaleureux et entrevoir le monde de la recherche. Pour cela je vous remercie.

Soyez assurée de mon profond respect et de ma reconnaissance.

**Monsieur le Professeur Sébastien HANTZ,
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Service de Bactériologie-Virologie du CHU de Limoges,**

Vous avez accepté sans hésiter de juger ce travail et je vous en remercie.

Votre soutien a été précieux lors des moments de doute. Merci d'avoir pris de votre temps afin de nous guider au mieux au travers des pièges tendus par ce CMV.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**Monsieur le Professeur Marc MURAINÉ,
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Chef du service d'Ophtalmologie du CHU de Rouen,**

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail, auquel votre contribution a été essentielle et je vous en remercie.

J'ai eu la chance de suivre vos consultations et d'être votre aide opératoire dès mes plus jeunes années de médecine mais sans pouvoir en apprécier la valeur. Ayant désormais le socle nécessaire pour profiter au mieux de votre apprentissage, c'est avec grand intérêt que je vous retrouverai pour mon prochain semestre.

Soyez assuré de ma grande reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Maxime ROCHER,
Chef de Clinique,
Service d'Ophtalmologie du CHU de Limoges,

Merci Maxime d'avoir dirigé ce travail avec tout ton engagement.

Ton encadrement du début à la fin de mon travail de thèse reflète ta façon d'être au quotidien. Tu es disponible pour moi : avant même mon arrivée dans le service, je me rappelle avoir téléphoné au responsable des internes d'ophtalmologie qui m'a répondu le soir pendant son trajet en rentrant de stage, pas de temps à perdre... Malgré la somme de travail et de réunions que tu enchaînes chaque semaine, tu sais prendre le temps pour chacun de nous. Merci également pour tes conseils médicaux et chirurgicaux de qualité, qui font de toi un excellent chef. J'espère continuer à en profiter longtemps. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta vie personnelle et professionnelle, tu le mérites.

Sois assuré de ma profonde reconnaissance, de mon respect et de mon amitié.

A mes chefs et anciens chefs,

Au Docteur BRAKBI, merci pour votre accueil à Tulle, pour votre gentillesse et vos leçons.

Au Docteur DELMAS, merci pour ta rigueur et tes conseils expérimentés sur l'orbito-palpébral.

Au Docteur VIDAL, merci Thomas pour ton humour et tes avis bien tranchés.

Au Docteur DEMERLIAC, merci Maïlys pour ton encadrement au CHU et à Tulle, à la recherche de « nos plus belles années ». Merci pour ta sincérité.

Au Docteur SIDIBE, merci de m'avoir aidé à progresser dans mes premières années d'internat.

Au Docteur VERNAT-TABARLY, merci Odile pour tes explications et tes conseils avisés.

Au Docteur CURUMTHAULLEE, merci Faiz pour tes connaissances aussi vastes qu'incroyables, en ophtalmologie comme ailleurs. Arigato senpai.

Aux Docteurs BENAYOUN, LATHIERE et QUILBE, merci pour votre accueil à Guéret ainsi qu'à la clinique Chénieux.

Aux Docteurs SALOMON, PETELLAT et DETRE, merci pour votre formation chirurgicale.

A ma famille,

A Clarisse, mon amour. Merci pour ces 8 ans à tes côtés. De la P2 jusqu'à la thèse, tu m'as soutenu chaque jour et tu me pousses à m'améliorer encore. Ces années n'ont pas été les plus simples pour toi mais tu t'es accrochée pour continuer à avancer. Le plus dur est fait. J'ai hâte de poursuivre cette incroyable aventure avec toi. A notre vie future.

A mes parents, maman, papa, merci d'avoir fait tout votre possible pour me permettre d'accomplir mon vœu de petit garçon. Merci pour votre soutien indéfectible, votre éducation, vos valeurs et votre amour. Je sais la chance que j'ai de vous avoir. J'espère vous rendre fiers.

A Grégoire, mon frère. Ce n'est pas toujours facile de communiquer avec des caractères si différents mais je sais qu'on se comprend. Deux chemins différents mais on garde les mêmes racines. Je te souhaite de trouver le bonheur et de t'épanouir, et j'espère continuer de grandir avec toi.

A ma tante, merci de t'être occupée de tes petits neveux, pour ces sorties à accrobranches et de m'avoir accompagné pendant mes sorties hebdomadaires au lycée.

A mes grands-mères et leur cuisine d'antan. Merci mémé pour ton caractère, tes histoires, tes confidences et les balades à Ivry. Merci mamie pour ces semaines de vacances, les baignades à Saint Aubin et les journées au parc du Bocasse.

A mes grands-pères.

A ma belle-famille, Marithé, Claude, Amandine, David, Hugo, Edith, Marine, Boris et Gustave.

A mes amis

A Wesley, merci de m'accompagner depuis la maternelle. A tout ce temps passé ensemble, du weekend chez les scouts, aux fêtes d'anniversaires, aux simples après-midi, aux vacances à Sète et bien sûr sur le tatami. Merci de m'avoir fait découvrir et aimer le karate. Hâte de remettre le karategi avec toi et de poursuivre dans cette voie.

A Louis et Emma, la fine équipe du Bois Giguet. Aux soirées passées et aux prochaines.

A Camille, Tiffanie, Pauline, Maxime et Myriam, merci de m'avoir aidé à décompresser pendant cet enfer d'externat.

A mes co-internes,

A Cédric, mon presque jumeau d'ophtalmo. Merci pour toutes ces soirées de rires, ces restos (petite pensée pour les sashimi) et à ces escape games qui ne résistent pas aux Tortues Géniales. Merci de partager cette folie otaku de Paris à Toulouse, et de m'accompagner à devenir ~~le roi des pirates ... le prochain hokage...~~ docteur en ophtalmologie. A nos prochaines aventures.

A Sarah. Merci d'avoir pris sous ton aile ce petit oisillon à mon arrivée dans le service. Tu m'as beaucoup appris durant ces 3 ans, toujours là pour donner un avis à l'hospit, en consultation ou au bloc. Maintenant que tu es partie à Chambéry, j'essaie de voler de mes propres ailes. Malgré tout ça, je ne te laisserai pas passer la ligne la première.

A Maeva. Merci pour ta bonne humeur, ton sourire contagieux et le soutien que tu m'as apporté. Je profite de ces lignes pour te remercier sincèrement, c'est en grande partie grâce à tes encouragements que j'ai peu à peu pris confiance en moi lors de mon premier temps plein et la suite de mon internat. Je te souhaite le meilleur pour cette grande année.

A Théa pour ton efficacité, à Ilham pour ton envie de tout faire, à Léa pour ta gentillesse, à Amandine pour ta bonne humeur, à Rodolphe pour tes blagues, à Antoine pour tes anecdotes, à Paul pour tes conseils, à Léa pour ton énergie. Merci à chacun de m'avoir apporté un plus au cours de ces années. J'espère pouvoir continuer à en profiter.

A Paul et Jean-Marc. Quelle promotion insolite ! A nos retrouvailles en septembre pour la suite.

A Arnaud, Scott, Dino, Eléna, Emma, Amir et Vardges. Merci de la confiance que vous me portez. Je n'ai pas réponse à tout mais c'est avec plaisir que j'essaierais de vous aider à progresser si vous me le demandez.

A l'ensemble des membres du service de consultation d'Ophtalmologie, du bloc et du service d'hospitalisation, merci pour votre bonne humeur au quotidien.

A l'ensemble des membres de l'UMR 1092 que j'ai eu la chance de rencontrer, merci pour vos conseils et astuces.

A nos correspondants au sein des banques de cornées, Mme Julie DETRIEUX, Mme Sophie GLEIZE et Mr David TOUBEAU, merci pour votre engagement ayant permis la concrétisation de ce travail.

Au Docteur LABRIFFE pour son apport significatif à nos statistiques.

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
ARN(m)	Acide Ribonucléique (messenger)
CMV(H)	Cytomégalovirus (Humain)
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
Cq	Quantification Cycle
Ct	Cycle threshold
DCE	Densité Cellulaire Endothéliale
DMEK	Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty
HHV	Human HerpesVirus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ig	Immunoglobuline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPI (eau)	Pour Préparation Injectable (eau)
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
UMR	Unité Mixte de Recherche

Table des matières

Introduction	28
I. Généralités	29
I.1. Œil humain	29
I.1.1. Anatomie de l'œil et physiologie	29
I.1.2. La cornée	30
I.1.2.1. Limbe cornéen	31
I.1.2.2. Épithélium et lame basale	32
I.1.2.3. Couche de Bowman et stroma	33
I.1.2.4. Endothélium et membrane de Descemet	34
I.2. Cytomégalovirus	35
I.2.1. Généralités	35
I.2.2. Épidémiologie et transmission	36
I.2.3. Cycle viral	37
I.2.4. Symptomatologie	38
I.2.4.1. Manifestation chez les patients immunocompétents	38
I.2.4.2. Infection congénitale	39
I.2.4.3. Manifestation chez les patients immunodéprimés	39
I.3. Œil et CMV	39
I.3.1. Sujets immunocompétents	39
I.3.2. Sujets immunodéprimés	40
I.4. Polymerase Chain Reaction	42
I.4.1. Principe de la PCR	42
I.4.2. Étapes de la procédure	42
I.4.2.1. Cycles de température et mélange réactionnel	42
I.4.2.2. Première phase : la dénaturation	42
I.4.2.3. Deuxième phase : l'hybridation	42
I.4.2.4. Troisième phase : l'élongation	43
I.4.2.5. Les amorces	44
I.4.3. Détection des produits	44
I.4.4. qPCR	45
I.5. But de l'étude	46
II. Etude : Recherche du cytomegalovirus par qPCR dans les différentes couches tissulaires de greffons cornéens déclassés	47
II.1. Matériels et méthode	47
II.1.1. Obtention des greffons	47
II.1.2. Critères d'éligibilité	47
II.1.2.1. Critères d'inclusion	47
II.1.2.2. Critères d'exclusion	47
II.1.3. Nombre de greffons inclus	48
II.2. Procédures de l'étude	48
II.2.1. Sérologies	48
II.2.2. Dissection des greffons	48
II.2.3. PCR Multiplex CMV – Albumine	50
II.2.3.1. Extraction d'ADN	50
II.2.3.2. Evaluation de la pureté de l'ADN extrait	50

II.2.3.3. Matériel pour la qPCR	51
II.3. Statistiques	52
II.4. Résultats	52
II.4.1. Sérologies CMV	52
II.4.2. Spectrophotométrie	53
II.4.3. Recherche du CMV	54
II.4.3.1. Recherche du CMV dans le premier groupe.....	54
II.4.3.2. Recherche du CMV dans le second groupe	55
II.4.4. Cellularités tissulaires	56
II.4.4.1. Cellularités tissulaires du premier groupe.....	57
II.4.4.2. Cellularités tissulaires du second groupe	57
II.4.5. Comparaison des cellularités tissulaires	58
II.5. Discussion	62
II.5.1. Analyse de la recherche sur le CMV.....	62
II.5.1.1. Analyse des résultats du premier groupe	63
II.5.1.2. Analyse des résultats du second groupe.....	64
II.5.2. Discussion de la cellularité tissulaire	65
Conclusion	68
Références bibliographiques	69
Serment d'Hippocrate.....	74

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma en coupe de l'œil humain.....	29
Figure 2 : Représentation schématique d'une cornée saine	30
Figure 3 : Schéma d'une coupe histologique du limbe cornéo-scléral.....	31
Figure 4 : Représentation schématique de l'épithélium cornéen en coupe transversale	32
Figure 5 : Coupe histologique du stroma cornéen observée en microscopie électronique (grossissement x 70 000)	34
Figure 6 : Schématisation d'une réparation endothéliale par migration et élargissement	35
Figure 7 : Illustration de la structure du CMVH	36
Figure 8 : Histoire naturelle de l'infection à CMV	38
Figure 9 : Photographie d'une endothélite à CMV avec atteinte en pièce de monnaie.....	40
Figure 10 : Photographie couleur d'un fond d'œil montrant la distribution périvasculaire d'une rétinite à CMV.....	41
Figure 11 : Schéma du premier cycle de PCR.....	44
Figure 12 : Principe de l'électrophorèse	45
Figure 13 : Schématisation de la technique d'hydrolyse de sondes.....	46
Figure 14 : Diagramme de flux de l'étude	48
Figure 15 : Séparation de l'épithélium par grattage au scalpel sous loupe binoculaire	49
Figure 16 : Pelage de l'endothélium sous loupe binoculaire après coloration (Grossissement X 10)	49
Figure 17 : Séroprévalence pour le CMV (IgG) des patients donneurs de cornée	53
Figure 18 : Courbes d'amplification pour le CMV d'une plaque de qPCR du second groupe	55
Figure 19 : Critères de qualité des gammes d'étalonnage des qPCR.....	56
Figure 20 : Courbes d'amplification pour l'albumine d'une plaque de qPCR du second groupe	58
Figure 21 : Comparaison de la représentation graphique des médianes de cellularité des couches tissulaires à gauche, à une coupe histologique de cornée à droite	59
Figure 22 : Représentation graphique des médianes de cellularité des trois couches tissulaires des 75 greffons analysés	59
Figure 23 : Graphique en boîte à moustaches des médianes, premiers et troisièmes quartiles des cellularités tissulaires de l'ensemble des échantillons.....	60
Figure 24 : Représentation graphique de la cellularité des couches tissulaires (nombre de cellules médian) selon la provenance des greffons	61
Figure 25 : Représentation graphique des médianes de cellularité des greffons selon leur dissection ou non, lors du Wetlab de la SFO	61

Figure 26 : Représentation graphique des médianes de cellularité des greffons selon leur injection dans un œil de porc ou non, lors du Wetlab de la SFO.....62

Table des tableaux

Tableau 1 : Primers et sondes utilisés pour la qPCR multiplex	51
Tableau 2 : Ratio des réactifs pour la qPCR multiplex	52
Tableau 3 : Concentration et pureté de l'ADN des échantillons	53
Tableau 4 : Nombre de copies de CMV dans les échantillons positifs du premier groupe	54
Tableau 5 : Répartition des greffons cornéens du premier groupe selon leur sérologie CMV et qPCR.....	54
Tableau 6 : Nombre de cellules dans les échantillons du premier groupe.....	57
Tableau 7 : Nombre de cellules dans les échantillons du second groupe	57

Introduction

Les yeux font partie de nos organes les plus précieux, ils nous offrent un accès à la beauté du monde. Socialement, le contact visuel constitue souvent la première étape d'une communication entre individus et de nombreuses informations peuvent être transmises par un regard, un clignement de paupières, un larmoiement. De plus, nos yeux au travers de la vision, nous apportent une perception fine de l'environnement, ses mouvements, sa couleur, sa forme...

Ces fonctions sont d'autant plus précieuses que les yeux sont des organes fragiles. Ils peuvent être la cible de nombreuses pathologies, qu'elles soient congénitales, dégénératives, traumatiques, métaboliques, tumorales, inflammatoires mais aussi infectieuses.

Parmi les multiples pathogènes responsables de ces infections, nous pouvons citer les bactéries, les champignons, les parasites et les virus. Ces derniers sont des micro-organismes à la limite du vivant dont le nombre présent sur Terre est estimé à 10^{31} (1). Heureusement, seule une petite quantité possède la capacité de nous infecter.

Le cytomégalovirus (CMV), plus connu pour ses risques liés à une infection congénitale, peut également être responsable de plusieurs atteintes ophtalmologiques telles que les rétinites, certaines uvéites antérieures et les endothélites. Plusieurs travaux de recherche ont montré que le CMV est capable de rester latent plusieurs années dans les tissus humains et qu'il possède la compétence de se réactiver à la faveur d'un épisode d'immunodépression(2).

En effet, la présence de CMV a récemment été confirmée dans des iris et corps ciliaires de patients immunocompétents(3) ainsi que dans des cornées exemptes d'infection active. Au cours de ces différentes études(4–8), la mise en évidence d'ADN du CMV a été réalisée par PCR et/ou qPCR, cependant, celles-ci ont analysé des fragments ou des cornées entières de pleine épaisseur, sans dissocier ses différents tissus.

Afin de mieux comprendre la pathogénie des infections et inflammations liées au CMV touchant le segment antérieur de l'œil, nous avons recherché le CMV dans les différentes couches tissulaires de greffons cornéens : épithélium, stroma et endothélium.

Notre hypothèse est la présence du virus dans les tissus à faible taux de renouvellement que sont le stroma et l'endothélium chez les patients séropositifs.

La mise en évidence du virus et sa localisation plus précise dans la cornée permettraient d'approfondir nos connaissances dans plusieurs domaines : la recherche afin d'améliorer les modèles théoriques et pratiques sur la réactivation du CMV ; la thérapeutique afin d'optimiser l'administration des médicaments en ciblant plus précisément les tissus malades et en épargnant les tissus sains ; ou encore la sécurisation de greffe cornéenne afin de prévenir une endothélite à CMV qui pourrait compromettre le pronostic du greffon.

A notre connaissance, ce type de recherche n'a encore jamais été mené.

I. Généralités

I.1. Œil humain

I.1.1. Anatomie de l'œil et physiologie

L'œil est le premier organe à participer à la vision. Par l'intermédiaire de la cornée et du cristallin, il forme une image de l'environnement observé sur la rétine en réfractant les rayons lumineux. Il va ensuite convertir cette image en signaux nerveux. Ceux-ci vont être transmis par les nerfs optiques jusqu'au cortex occipital qui interprète cette image. Les deux yeux forment chacun une image et c'est le cerveau qui cumule les informations afin de constituer une image multidimensionnelle(9).

Vulnérable, cet organe est protégé par les cils, les sourcils et les paupières. Il se place au sein de la cavité osseuse qu'est l'orbite. Anatomiquement, trois tuniques se superposent de l'extérieur vers l'intérieur ; la sclérotique, tissu conjonctif qui donne sa forme au globe oculaire et se prolonge en avant par la cornée ; l'uvée qui correspond à la choroïde, l'iris et les corps ciliaires ; et la rétine prolongée en arrière par le nerf optique.

Pour que la lumière puisse atteindre la rétine, les milieux oculaires doivent être transparents. D'avant en arrière, se positionnent entre la cornée et la rétine ; l'humeur aqueuse, liquide ; le cristallin, solide ; le corps vitré, dont la texture se rapproche d'un gel.

L'œil est séparé en deux segments. Le segment antérieur est délimité en avant par la cornée et en arrière par le cristallin, il comprend également les corps ciliaires et l'iris. Le segment postérieur, délimité à l'extérieur par la sclère, comprend la choroïde, la rétine et le vitré.

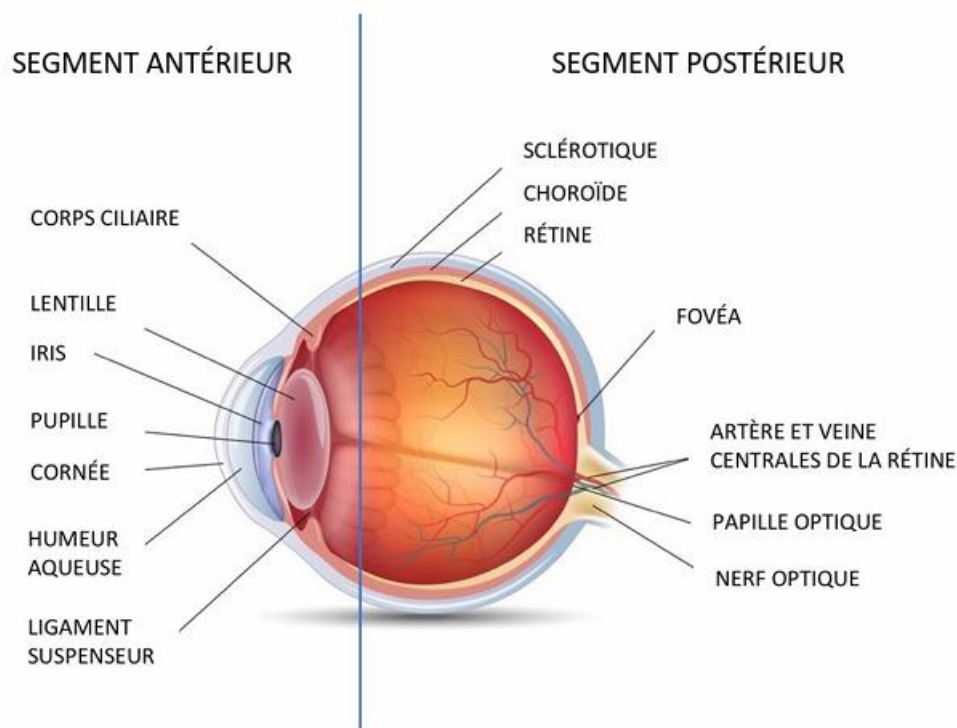


Figure 1 : Schéma en coupe de l'œil humain
Source : Kindsight – Eye Specialists who care

I.1.2. La cornée

La cornée constitue la partie la plus antérieure du globe oculaire, directement exposée au monde extérieur. Son tissu est avasculaire et transparent. Le film lacrymal recouvre sa face antérieure et l'humeur aqueuse sa face postérieure. Sa périphérie est en continuité avec la conjonctive semi-transparente à la surface du globe, et la sclère opaque en profondeur. La structure entre la sclère et la cornée forme le limbe, lit des cellules-souches épithéliales. Il s'agit d'une zone richement vascularisée.

La cornée possède une forme asphérique et convexe qui lui donne sa capacité réfractive. Chez un adulte, elle mesure entre 9 et 11 mm sur son axe vertical et entre 11 et 12 mm sur son axe horizontal. Son épaisseur est maximale en périphérie aux alentours de 0,7 mm et décroît progressivement vers son centre pour atteindre 0,5 mm(10).

La cornée possède trois grandes caractéristiques : il s'agit d'une paroi qui protège les tissus intra-oculaires, sa transparence permet la transmission lumineuse et son dioptre permet la focalisation des rayons lumineux. C'est la disposition des fibres de collagène stromales qui assure la transparence cornéenne. En effet, la distance inter-fibre ainsi que le diamètre moyen des fibres sont constants. Ceci permet à la lumière de ne pas être complètement réfléchi lors de son passage au travers de la cornée. Ainsi, les situations compromettant ces deux constantes entraînent un défaut de transparence cornéenne(11).

La composition anatomique de la cornée est représentée par cinq couches distinctes de l'avant vers l'arrière : épithélium, couche de Bowman, stroma, membrane de Descemet et endothélium. Deux entités s'y ajoutent : la lame basale située entre l'épithélium et la couche de Bowman, et la couche de Dua aussi nommée couche prédescemetique, en arrière du stroma.

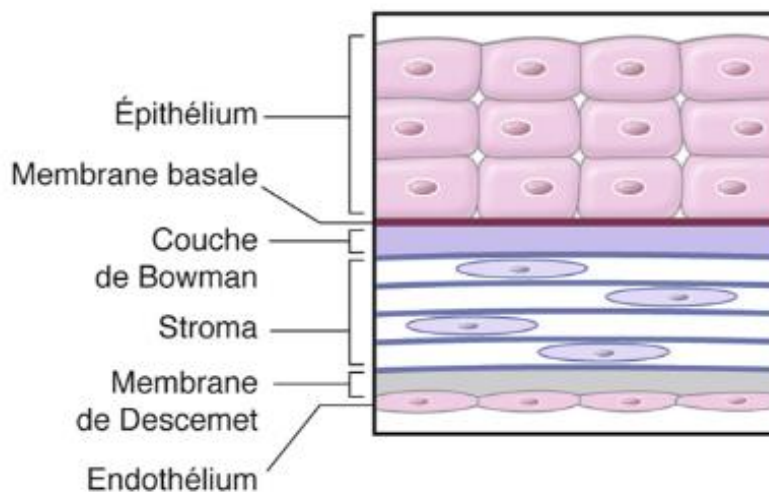


Figure 2 : Représentation schématique d'une cornée saine

Source : Rapport SFO 2015 Surface oculaire – Chapitre 12 Pathologies spécifiques – Surface oculaire et kératocône M. Cassagne, P. Fournié, F. Malecaze

I.1.2.1. Limbe cornéen

Le limbe correspond à la zone de jonction entre la cornée et la sclère.

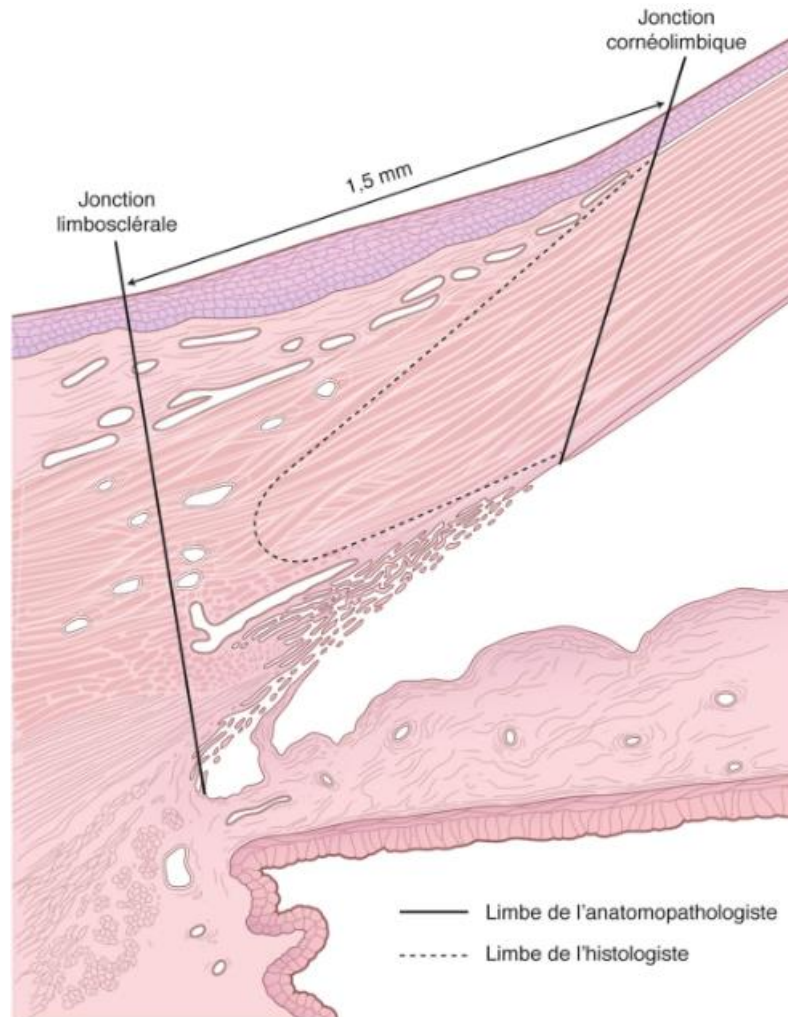


Figure 3 : Schéma d'une coupe histologique du limbe cornéo-scléral

Source : Rapport SFO 2015 Surface oculaire – Chapitre 1 Le concept de surface oculaire – Le limbe
F. Majo, T. Hoang-Xuan

Il joue un rôle important dans le renouvellement et la cicatrisation de l'épithélium. En effet, afin de maintenir une structure en couches stratifiées, les cellules épithéliales doivent se renouveler de façon continue et rapide. Les cellules souches épithéliales qui permettent ce renouvellement sont localisées au niveau des cryptes limbiques épithéliales et des palissades de Vogt. Initialement indifférenciées, c'est au cours de leur migration qu'elles vont acquérir leur phénotype spécifique. Ces migrations se font selon deux directions, de la profondeur vers la surface et du limbe vers le centre(12).

La vascularisation du limbe est dite terminale et possède une richesse en cellules inflammatoires et médiateurs de l'inflammation expliquant un nombre important de mécanismes à l'origine des kératites inflammatoires. C'est également par cette voie que certains pathogènes comme les virus peuvent atteindre la cornée.

I.1.2.2. Épithélium et lame basale

Représentant un dixième de l'épaisseur cornéenne, soit 50 µm environ, l'épithélium cornéen est pavimenteux, pluristratifié et non kératinisé. Afin de maintenir une régularité de surface, son épaisseur varie en cas d'irrégularité stromale. A l'aplomb d'une zone bombée, il devient hypoplasique et à l'inverse, hyperplasique en regard d'un aplatissement de courbure ou d'un creux(13).

Il est divisible en trois parties ; la première dite basale car reposant sur la lame basale formée d'une couche unistratifiée ; la deuxième dite intermédiaire constituée de deux à trois couches cellulaires ; la troisième dite superficielle formée de deux à trois couches cellulaires plates desquamantes. Son adhérence au film lacrymal et la surface disponibles pour les échanges métaboliques sont augmentées grâce aux microvillosités superficielles.

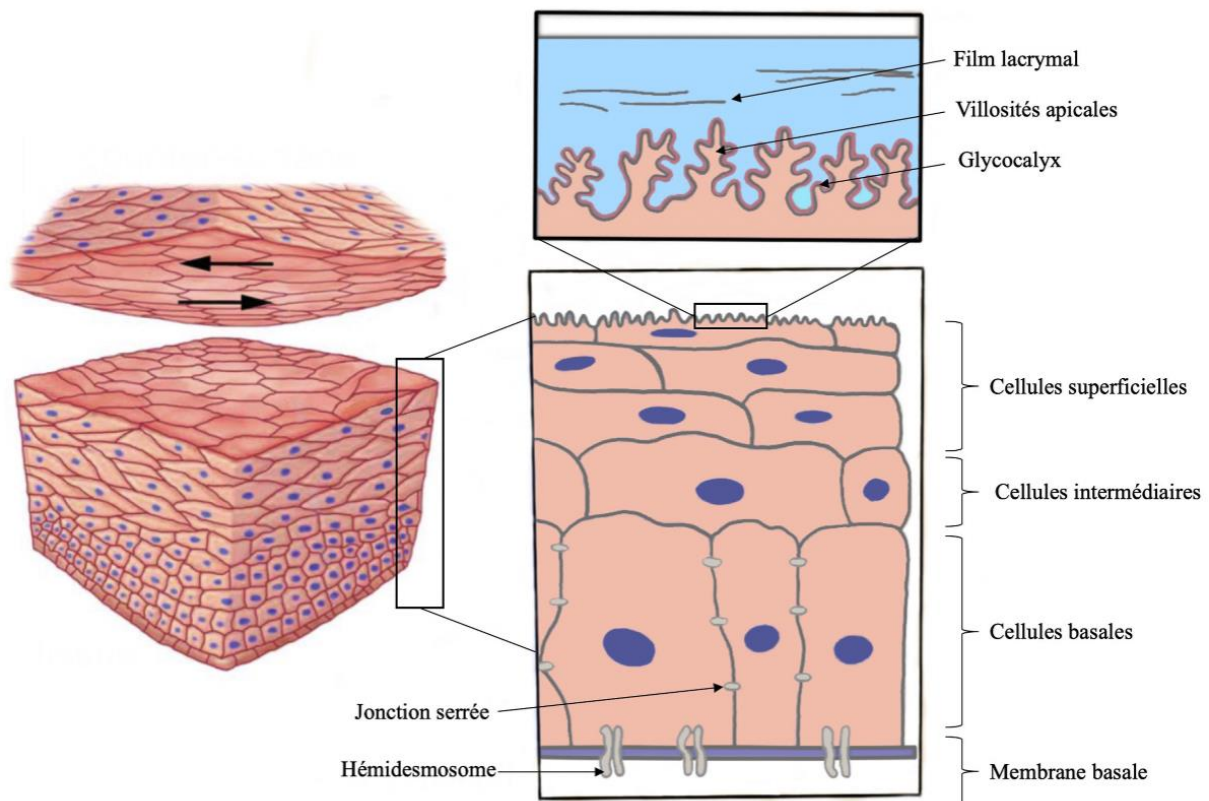


Figure 4 : Représentation schématique de l'épithélium cornéen en coupe transversale

Source : Journal Français d'Ophtalmologie mars 2023, Biomécanique de l'épithélium cornéen : résistance au stress et implications dans la cicatrisation et le remodelage. Amatu JB, Baudouin C, Trinh L, Labbé A, Buffault J.

L'épithélium est renouvelé en 7 à 14 jours à partir des cellules basales qui remontent jusqu'à desquamer dans le film lacrymal. Les jonctions intercellulaires de l'épithélium sont solides et sont de plusieurs types : gap junctions, desmosomes et hémidesmosomes et tight junctions. Elles jouent un rôle de barrière vis-à-vis de la diffusion de l'eau et des microorganismes mais aussi un rôle de protection mécanique.

L'association de deux structures que sont la lamina lucida, côté cellulaire, et la lamina densa, du côté de la couche de Bowman, forme la lame basale épithéliale. Elle est essentiellement composée de laminine et de collagène IV. Elle possède des microfibrilles qui permettent d'ancrer l'épithélium sur la couche de Bowman(14). Ainsi, un défaut de cicatrisation de la lame basale va entraîner une mauvaise adhérence épithéliale conduisant à des érosions spontanées. Cette lame basale possède également un rôle de support aux cellules basales, et son absence est à l'origine d'un doublement du temps nécessaire à la réépithélialisation cornéenne.

I.1.2.3. Couche de Bowman et stroma

La couche de Bowman est acellulaire car composée de protéoglycanes et de fibres de collagène condensées. Elle mesure une douzaine de microns et ne possède pas la capacité de se régénérer après un traumatisme.

Le stroma compose 90% de la cornée. Il est formé de kératocytes, de matrice extracellulaire ainsi que de fibres nerveuses. Ses cellules ne représentent que 3% de son volume, ce qui le rend presque acellulaire, le reste étant représenté par la matrice extracellulaire.

Le collagène stromal est essentiellement de type I et, en moindre mesure, on retrouve du collagène de type III, V et VI. Les fibres de collagènes sont composées d'un assemblage de fibrilles d'un diamètre de 10 à 300 nm, elles-mêmes formées par les molécules de collagène. Les fibres mesurent 2 µm d'épaisseur et se superposent sur 250 à 300 lamelles. Les lamelles traversent la cornée d'un bord à l'autre de façon parallèle à la surface. C'est la régularité du diamètre et l'espacement des fibrilles entre elles, à l'intérieur des fibres de collagène, qui donnent sa transparence au stroma et donc à la cornée(15).

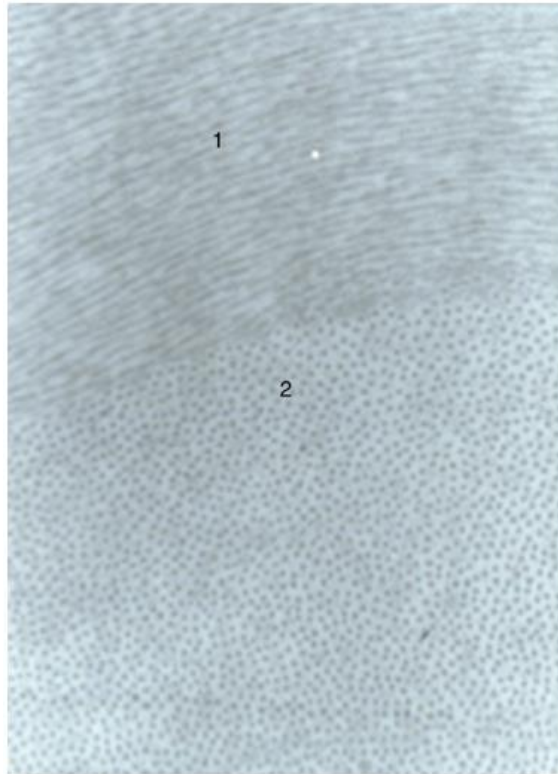


Figure 5 : Coupe histologique du stroma cornéen observée en microscopie électronique (grossissement x 70 000)

Source : Rapport SFO 2015 Surface oculaire – Chapitre 1 Le concept de surface oculaire – Histologie et anatomie de la surface oculaire B. Kantelip, E. Frouin

Les cornées adultes sont également composées de protéoglycanes à dermatane sulfate et kératane sulfate. Ces protéoglycanes jouent un rôle d'absorption et de stockage des molécules d'eau qui détermine l'hydratation stromale. Cela leur octroie une pression de gonflement qui est utilisée pour maintenir constant l'espacement entre les fibrilles de collagène(11).

Les kératocytes sont liés à leurs voisins par des gap junctions pour former un réseau en trois dimensions. Ce réseau permet de communiquer et de fonctionner comme une entité unique. À la suite d'une agression, les kératocytes au contact du site altéré perdent leurs liens et sont remplacés par des fibroblastes pour se consacrer à la restauration stromale.

Le rôle premier des kératocytes est de conserver une matrice extracellulaire intègre. A cette fin, ils synthétisent des glycosaminoglycanes et des molécules de procollagène. Parallèlement, ils synthétisent des métalloprotéases qui sont des enzymes dégradant le collagène. Une fine régulation de la balance synthèse/dégradation permet à l'architecture stromale de se maintenir constante(15).

I.1.2.4. Endothélium et membrane de Descemet

La membrane de Descemet représente la lame basale endothéliale. Elle est composée de laminine et de collagène IV. Son épaisseur tend à augmenter avec l'âge, passant de 3 μm à la naissance pour atteindre 9 μm à l'âge adulte. Elle résiste aux métalloprotéinases mais ne possède pas de capacité régénérative. En cas de déchirure descémétique, les cellules

endothéliales vont migrer le long du stroma afin de couvrir la zone lésée et prévenir l'œdème cornéen(16). Elle peut être dissociée du stroma chirurgicalement, permettant la réalisation de greffes cornéennes endothéliales.

L'endothélium cornéen est accolé à la membrane de Descemet sur sa face postérieure. Il s'agit d'une monocouche de cellules mesurant 20 μm de large pour 5 μm d'épaisseur et de forme hexagonale. Chez un jeune adulte sain, la densité cellulaire endothéliale (DCE) moyenne est de 3500 cellules/ mm^2 et va diminuer régulièrement au cours de la vie.

Chez l'homme, les cellules de l'endothélium ne peuvent se diviser. Ainsi en cas de lésion endothéliale, les cellules voisines vont s'étaler en augmentant de taille, pour combler l'espace, diminuant ainsi la densité cellulaire(17). Cette augmentation de taille correspond au polymégatisme qui s'accompagne généralement de la perte de la forme hexagonale de la cellule, c'est le pléomorphisme.

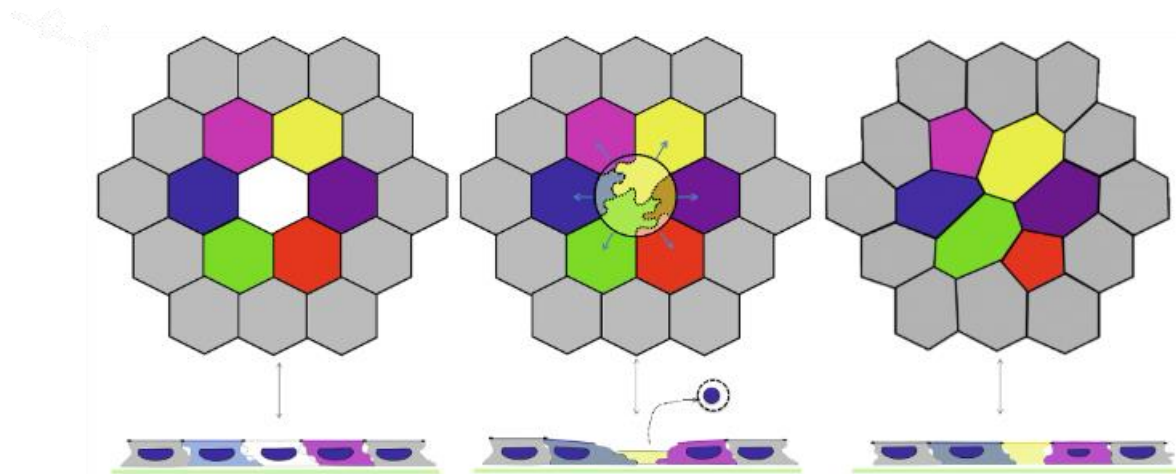


Figure 6 : Schématisation d'une réparation endothéliale par migration et élargissement

Source : Rapport SFO 2020 L'endothélium cornéen – Partie 1 Endothélium normal – Cicatrisation d'une lésion ponctuelle Z. He, C. Perrache, G. Thuret

Entre-elles, les cellules endothéliales sont reliées par des tight junctions et des gap junctions mais pas de desmosomes. Ceci explique la perméabilité endothéliale aux petites molécules et aux électrolytes, et en partie, à l'eau(18). La principale fonction endothéliale est de contrôler l'hydratation cornéenne en maintenant constante la part d'eau dans le stroma aux alentours de 80%.

I.2. Cytomégalovirus

I.2.1. Généralités

Le cytomégalovirus humain (CMVH) aussi connu sous le nom d'Human Herpesvirus 5 (HHV-5) appartient à la sous-famille des β -herpesvirinae des *Herpesviridae*, ou virus du groupe Herpès.

La forme extra-cellulaire du virus, le virion, mesure entre 150 et 200 nm. Il est constitué d'une enveloppe externe recouverte de glycoprotéines. A l'intérieur de celle-ci se trouve une couche nommée tégument, composée de nombreuses protéines et qui semble même abriter des ARNm (Acides Ribonucléiques messagers)(19). Ces protéines jouent un rôle dans les différentes étapes du cycle viral. Le tégument sépare l'enveloppe externe de la capside icosaédrique qui elle, protège le génome du CMVH. Ce génome est codé par l'ADN (Acide Désoxyribo-Nucléique) qui se trouve sous une forme bicaténaire (double-brin) linéaire(20).

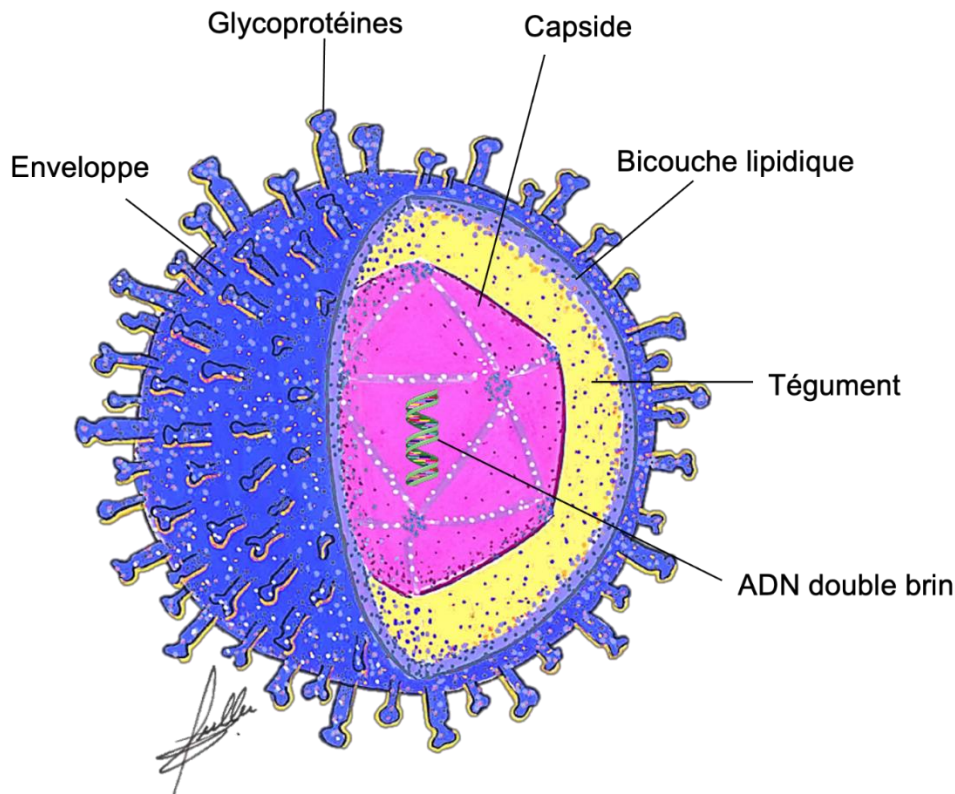


Figure 7 : Illustration de la structure du CMVH

Source : Clotilde MULLER pour le Centre National de Référence des Herpèsvirus

I.2.2. Épidémiologie et transmission

Au cours de la primo-infection, le virus est excrété dans de nombreux liquides biologiques : les larmes, la salive, le lait maternel, les sécrétions respiratoires, le sperme, les urines et les sécrétions cervico-vaginales(21). Il perd rapidement sa capacité infectieuse dans le milieu extérieur car il est sensible à la chaleur, aux ultra-violets ou encore à la dessiccation, ce pourquoi sa transmission nécessite un contact intime ou étroit.

On distingue deux voies naturelles de transmission : une première dite verticale de la mère à l'enfant, pouvant se faire par voie transplacentaire, au cours de l'accouchement ou lors de l'allaitement, et une seconde dite horizontale en cas de contact direct avec les liquides biologiques contaminés précédemment cités.

Il existe des situations au cours desquelles de grandes quantités de virus sont excrétées : lors d'une primo-infection, lors d'une immunodépression, et dans la salive et les urines produites par des enfants précédemment infectés au cours de leur vie intra-utérine(22).

La transmission est possible lors d'une réactivation virale sans manifestation symptomatique. Par ailleurs, une transmission iatrogène après greffe de cellules souches hématopoïétiques ou transplantation d'organe peut survenir alors que le virus est en phase de latence dans les organes du donneur(23).

Le CMVH est présent dans le monde entier et ses infections ne suivent pas de rythme saisonnier. Il peut toucher une population dès le plus jeune âge. Sa séroprévalence, qui est la trace d'une infection passée par le CMVH, s'étend de 40 à 100% selon les populations à travers le monde(24). Elle est la plus faible dans les pays développés et augmente dans les situations de précarité socio-économique. En France, elle s'approche des 50%(25). Cette séroprévalence est liée aux modes de vie qui entraînent une contamination par liquide corporel. Ceci explique sa distribution selon deux pics : un premier dans la petite enfance en lien avec la transmission verticale et entre jeunes enfants, et un second chez les jeunes adultes probablement en lien avec une transmission sexuelle.

Au niveau mondial, le CMVH est le premier responsable des infections virales congénitales. Les chercheurs estiment que le CMVH infecte environ 1% des enfants in utero. Il représente la première cause mondiale de surdité congénitale infectieuse et peut entraîner des séquelles neuro-sensorielles à la suite d'une transmission materno-fœtale(26).

L'infection à CMVH est également la virose la plus fréquente chez les patients transplantés, à l'origine d'une grande morbidité. En effet, les traitements immuno-suppresseurs indispensables pour limiter le rejet de greffe, favorisent à la fois une primo-infection chez les patients séronégatifs, mais aussi une réactivation endogène chez les patients précédemment infectés.

I.2.3. Cycle viral

Le cycle viral du CMVH peut être divisé en deux phases : une phase active et une inactive. La première correspond à l'infection et à la dissémination du virus, la seconde à son état latent dans l'organisme.

Le CMVH est connu pour pouvoir infecter de nombreux types cellulaires : les hépatocytes, les macrophages, les léiomyocytes, les cellules dendritiques, les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales. Il est ainsi retrouvé dans de nombreux tissus et organes. Au cours de la primo-infection, la dissémination se déroule par voie sanguine puis, lorsque les cellules cibles sont infectées, la diffusion s'effectue de cellule en cellule(27).

Les fibroblastes sont des cibles majeures du CMVH dans les organes que sont l'intestin, le poumon et le placenta. Ce sont des cellules dites « permissives » qui permettent la poursuite de la réplication virale. A l'inverse, lorsque le CMVH infecte les cellules souches hématopoïétiques (CSH), cela entraîne une inhibition de l'hématopoïèse, c'est-à-dire la production des cellules sanguines, et cela inhibe également le cycle viral et permet au CMVH de rester latent(28).

Le CMVH se réplique fortement dans les cellules endothéliales sanguines. Cela lui permet de disséminer des particules virales dans la circulation sanguine. Les monocytes circulants et les polynucléaires présents dans le sang vont être infectés par ces particules virales et transmettre le virus à d'autres cellules non infectées. Les cellules dendritiques et les macrophages vont quant à eux faire pénétrer le virus dans les tissus des organes.

A l'occasion d'une infection bactérienne ou virale ultérieure, ces cellules du système immunitaire s'activent et avec elles, la réplication du CMVH reprend. Les particules virales vont ainsi être retrouvées sur les surfaces épithéliales de la sphère ORL, du tractus génital et du système galactophorique(28).

A l'instar de tous les autres herpèsvirus, le CMVH persiste dans l'organisme à l'état latent. L'ADN du CMVH a déjà été retrouvé dans des cellules sanguines périphériques chez des patients séropositifs mais également séronégatifs(29), dans des cornées(6) ainsi que dans des cellules épithéliales et endothéliales. De nombreux organes peuvent ainsi être impliqués dans la transmission virale par transplantation, du fait de la présence latente du CMVH dans leurs tissus. Par ailleurs, même chez le sujet immunocompétent, le CMVH peut se réactiver, être excrété dans les différents liquides biologiques et reprendre sa transmission(27).

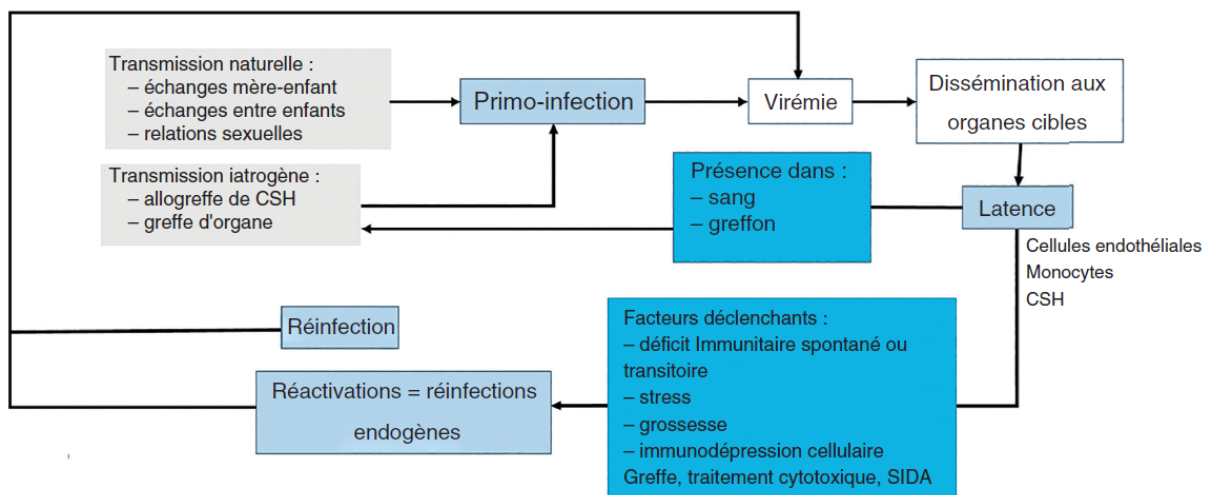


Figure 8 : Histoire naturelle de l'infection à CMV

Source : Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de Pharmacie

I.2.4. Symptomatologie

L'infection à CMVH se manifeste différemment selon l'immunité du sujet. Alors qu'elle est souvent asymptomatique chez un sujet immunocompétent, ses conséquences sont graves en cas d'atteinte materno-fœtale ou chez les immunodéprimés.

I.2.4.1. Manifestation chez les patients immunocompétents

Dans 90% des cas, l'infection est asymptomatique. En cas d'atteinte symptomatique, la forme prépondérante correspond à une fièvre isolée ou l'association de fièvre persistante, d'asthénie, de myalgies et d'adénopathies cervicales définissant le syndrome pseudo-grippal. Plus rarement, en cas de primo-infection, il est possible de rencontrer des myocardites, des méningites aseptiques, des pneumopathies, des colites ulcérales, des arthrites et arthralgies ainsi que des syndromes de Guillain-Barré(30).

Biologiquement, la primo-infection entraîne régulièrement un syndrome mononucléosique, une cytolysé hépatique et parfois une thrombopénie.

I.2.4.2. Infection congénitale

La primo-infection à CMVH représente un risque maximal pour le fœtus si elle survient au cours du premier trimestre de la grossesse. Le diagnostic de maladie congénitale associée au CMVH n'est pas toujours posé car celle-ci est difficile à identifier.

L'atteinte néonatale est potentiellement sévère lorsqu'elle prend la forme de la maladie des inclusions cytomégaliqes. Cette forme particulière comprend un purpura, une insuffisance hépato-cellulaire et une atteinte neurologique sévère. Elle représente moins de 5% des infections néonatales et entraîne le décès du nouveau-né dans 30% des cas. En cas de survie, la maladie laisse des séquelles neuro-sensorielles importantes telles qu'une chorioretinite, une surdité bilatérale ou un retard mental.

Heureusement, les manifestations li es à une atteinte néonatale sont généralement plus limit es, avec des séquelles neuro-sensorielles dans un tiers des cas et des manifestations cliniques moins lourdes. Certains nouveau-nés présentent des atteintes neurologiques ou des séquelles auditives dans 10% des cas après une infection asymptomatique(31).

Lorsque le nouveau-né est infecté au moment de l'accouchement ou après, les symptômes rejoignent ceux de la population générale.

I.2.4.3. Manifestation chez les patients immunodéprimés

La situation d'immunodépression prolong e, par exemple en cas de thérapie immunosuppressive prescrite dans le cadre d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques ou d'organe solide, ou de co-infection par le VIH, favorise l'infection par une souche exogène mais également la réactivation du CMVH latent(27).

De nombreuses atteintes organiques peuvent être rencontr es lors d'une infection à CMVH au cours d'une immunodépression mais certaines manifestations cliniques sont plus fréquemment retrouv es. Ainsi, la rétinite à CMV est fréquente chez des patients au stade SIDA présentant un taux de lymphocytes TCD4 inférieur à 100/mm³(32). Chez les patients avec transplantation d'organe solide, la survenue d'un tableau clinique associant fièvre et leucopénie(33) n'est pas rare alors qu'une manifestation de type pneumonie interstitielle sera plutôt l'apanage des patients ayant bénéficié d'une allogreffe de CSH.

I.3. Œil et CMV

I.3.1. Sujets immunocompétents

Deux principales atteintes inflammatoires du segment antérieur peuvent être retrouv es après infection par le CMV : l'endothélite et l'uvéite antérieure. Leur physiopathologie n'est pas complètement comprise à ce jour. La réactivation virale pourrait être la conséquence de l'activation des cellules dendritiques et macrophages faisant suite à un autre processus, ou bien la réactivation virale serait elle-même à l'origine de cette inflammation(34).

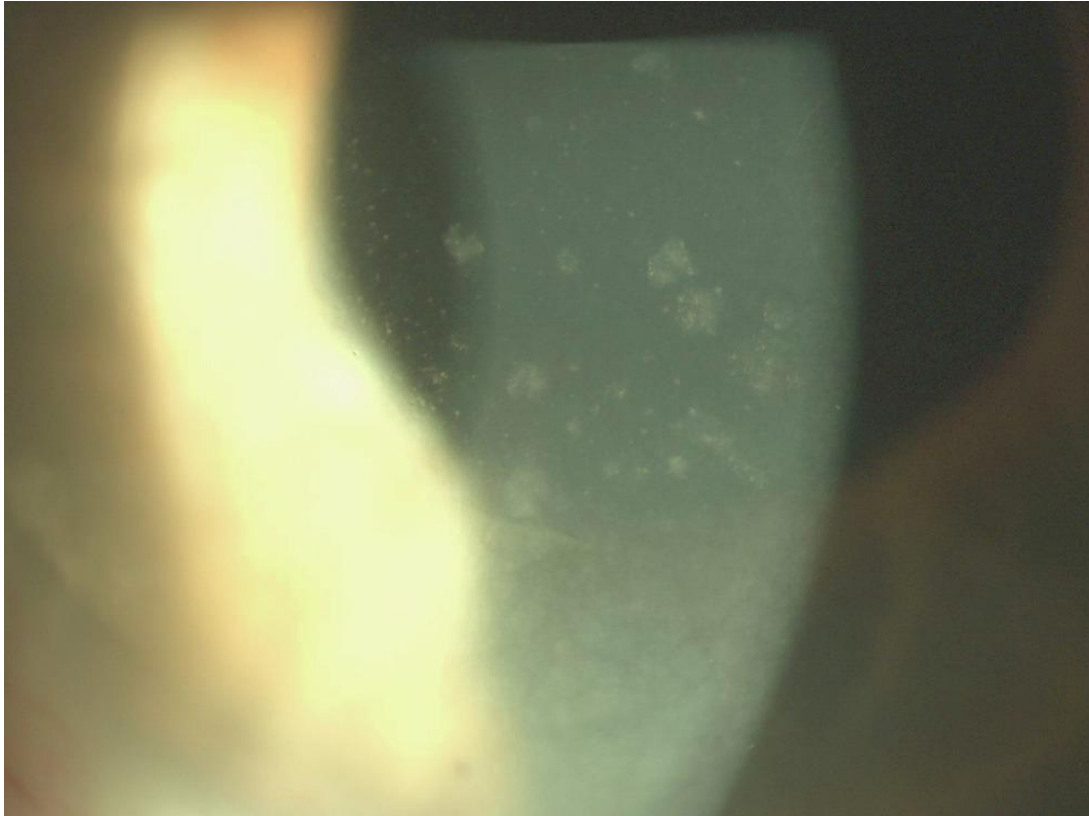


Figure 9 : Photographie d'une endothélite à CMV avec atteinte en pièce de monnaie

Source : Rapport SFO 2020 L'endothélium cornéen – Partie 2 Pathologies endothéliales – Endothélites virales M. Labetoulle, A. Rousseau, W. Ben Hadj Salah, M. M'Garrech, E. Barreau, A.-L. Best, J. Benichou, T. Bourcier

Le CVMH donne des uvéites classiquement antérieures, unilatérales et hypertones pouvant être aiguës, récidivantes, voire chroniques. Elles répondent peu aux traitements par corticoïdes. A l'examen, on retrouve des précipités rétro-cornéens granulomateux et une atrophie irienne sectorielle communs avec les autres uvéites herpétiques. La certitude du diagnostic ne peut être apportée que par la réalisation d'une PCR sur l'humeur aqueuse ou mesure du calcul du coefficient de Goldmann-Witmer. Ce coefficient correspond au rapport des IgG anti-CMV sur les IgG totales de l'humeur aqueuse, divisé par le rapport des IgG anti-CMV sur les IgG totales du sérum.

Le CMV a été retrouvé dans deux tableaux cliniques spécifiques : le syndrome de Posner-Schlossman et l'uvéite de Fuchs(35,36). Il peut également, dans de rares cas, entraîner un syndrome de nécrose rétinienne aiguë chez le sujet immunocompétent(37).

I.3.2. Sujets immunodéprimés

Chez ces patients, le CMV va principalement engendrer des rétinites nécrosantes qui sont des urgences fonctionnelles absolues. En effet, le pronostic visuel est mis en danger avec un risque d'atteinte bilatérale.

Comme expliqué précédemment, les rétinites à CMV étaient principalement retrouvées chez les patients infectés par le VIH au stade SIDA dont le taux de lymphocytes T4 était inférieur à

100/mm³. Désormais elles surviennent dans des situations d'immunodépression entraînées par les traitements immunomodulateurs ou supprimeurs instaurés après transplantation de moelle osseuse ou d'organe solide. Elles peuvent également se présenter après une baisse de l'immunité locale notamment dans les suites d'injections intravitréennes de corticoïdes(38).

Une des hypothèses physiopathologiques explique que les cellules endothéliales vasculaires seraient infectées par le CMV avant de migrer vers l'épithélium pigmentaire rétinien et infecteraient les cellules gliales sur leur passage. Les anomalies vasculaires causées par la rétinopathie au VIH prédisposeraient à l'apparition de la rétinite à CMV.

Si elles débutent en périphérie rétinienne, les rétinites peuvent être initialement asymptomatiques, d'où le besoin d'un dépistage régulier et systématique des patients à risque. Après-cela, les patients rapportent l'apparition de myodésopsies avec baisse de l'acuité visuelle sans douleur. Les atteintes peuvent toucher toutes les parties de la rétine d'un ou des deux yeux. Au fond d'œil, il existe un ou plusieurs foyers aux bords granulaires, blanchâtres, au contact des vaisseaux. Des foyers punctiformes satellites sont le témoin de la progression de l'infection en rétine saine. Des hémorragies sont fréquemment retrouvées. La réponse inflammatoire en segment antérieur et dans le vitré est nulle ou minimale en raison de l'immunodépression. Rarement, une uvéite associée à la restauration immunitaire, objectivée par une hyalite, une papillite, un œdème maculaire ainsi qu'une inflammation du segment antérieur peut être retrouvée après la restauration d'une immunité suffisante chez les patients souffrants de rétinite à CMV(39). La réalisation d'une PCR sur l'humeur aqueuse permet de confirmer le diagnostic.

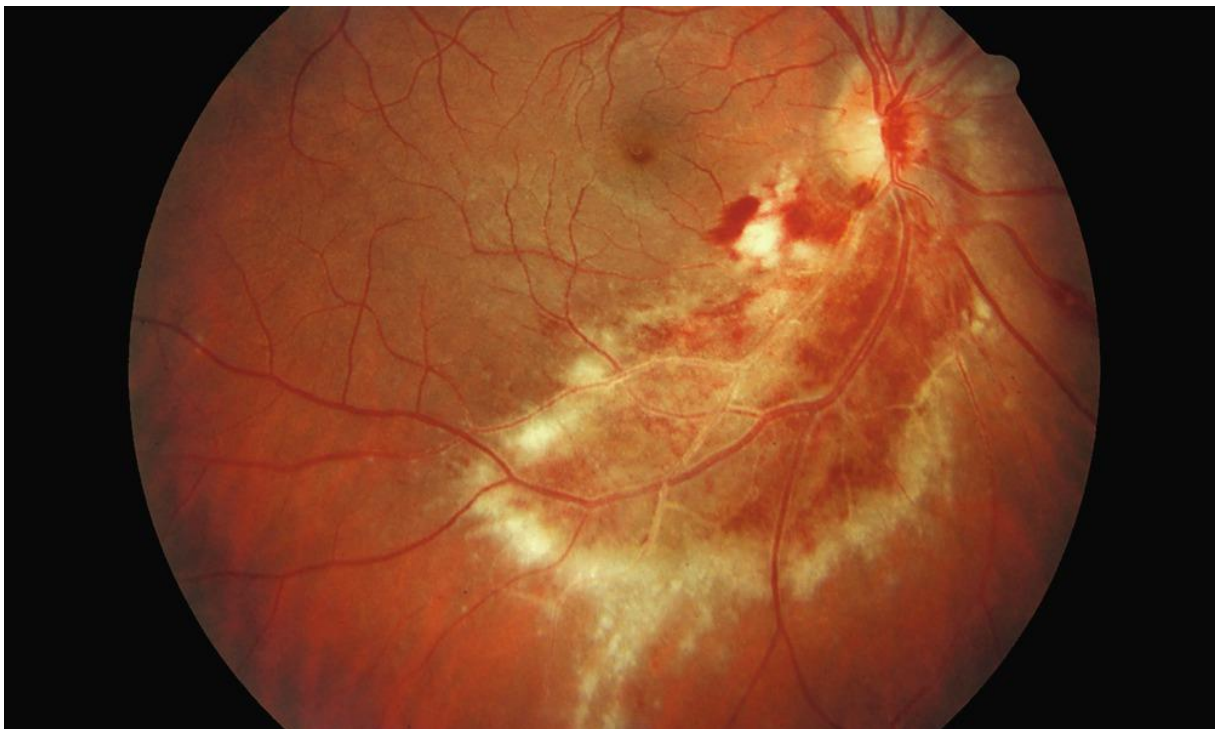


Figure 10 : Photographie couleur d'un fond d'œil montrant la distribution périvasculaire d'une rétinite à CMV.

Source : Rapport SFO 2018 Rétine et vitré – Chapitre 10 Inflammations choroïdiennes et rétiniennes focales et diffuses – Infections rétiniennes et choroïdiennes inflammatoires, photographie du Dr Mark W. Johnson

I.4. Polymerase Chain Reaction

I.4.1. Principe de la PCR

La Réaction de Polymérisation en Chaîne, RCP, ou Polymerase Chain Reaction, PCR en anglais, se base sur l'action de l'ADN polymérase, une enzyme intervenant dans la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire. La PCR permet in vitro de répliquer des séquences d'ADN spécifiques. Elle génère des milliards d'exemplaires d'un fragment d'ADN appelé ADN cible, ADN d'intérêt ou encore séquence d'intérêt. Cette séquence est extraite de l'ADN dit matriciel. Si l'ADN matriciel présente la séquence d'intérêt, la PCR va répliquer sélectivement cette séquence en grande quantité, c'est l'amplification. Un des intérêts de la PCR est de pouvoir répliquer des séquences de nucléotides à partir de très faibles quantités d'ADN(40). L'ADN matriciel peut correspondre à l'ADN total extrait d'un fragment tissulaire ou bien à une séquence nucléotidique correspondant à un gène.

La PCR peut jouer un rôle de clonage ou de purification(40). En effet, l'ADN matriciel représente souvent une importante masse de séquences et la PCR va sélectionner une ou plusieurs séquences définies et réaliser une amplification de milliards de copies appelées amplicons. A la fin de la réaction, la faible quantité d'ADN matriciel présente dans l'échantillon est la même qu'au début, cependant la quantité des séquences d'intérêt sera très élevée. Ainsi la PCR peut être utilisée afin de mettre en évidence une séquence d'ADN spécifique d'un organisme dans un tissu ou liquide biologique.

I.4.2. Étapes de la procédure

I.4.2.1. Cycles de température et mélange réactionnel

La PCR se réalise au sein d'un mélange réactionnel composé de grande quantité des quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP), c'est-à-dire les quatre nucléotides de base de l'ADN, des amorces, de la Taq polymérase et de l'ADN matriciel qui n'est autre que l'échantillon à analyser. Ce mélange est déposé dans des plaques de puits qui vont être soumis à une répétition de plusieurs dizaines de cycles de température au sein d'un thermocycleur. Cet appareil programme la succession et la durée des cycles. Chaque cycle est composé de trois phases de quelques secondes : dénaturation, hybridation et élongation.

I.4.2.2. Première phase : la dénaturation

Cette étape s'effectue à haute température, autour de 95°C. Les liaisons hydrogène de l'ADN ne pouvant se maintenir à cette température, l'ADN matriciel perd sa structure double-brin pour former l'ADN monocaténaire ou simple-brin.

I.4.2.3. Deuxième phase : l'hybridation

L'étape suivante se déroule sous une température comprise entre 40 et 70°C. La baisse de température permet de reformer les liaisons hydrogène et donc l'hybridation des brins complémentaires. Cependant, les amorces qui sont de petites séquences simple-brin complémentaires des séquences d'intérêt, ont plus de facilité à s'hybrider que les longs brins

de l'ADN matriciel. Lors de cette phase, plus la température sera élevée, plus l'hybridation sera sélective et plus elle sera spécifique(41).

Chaque fragment d'ADN de séquence donnée possède une température de fusion notée T_m , définie par la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme simple-brin et l'autre moitié sous forme double-brin. La connaissance de la T_m d'un fragment d'ADN est importante à déterminer afin de bien choisir les amorces et les sondes ainsi que la température d'hybridation retenue pour la PCR.

I.4.2.4. Troisième phase : l'élongation

Cette dernière étape s'effectue grâce à la Taq polymérase. Cette enzyme permet la réplication de l'ADN au cours de la PCR. Elle est clonée ou purifiée à partir de *Thermus aquaticus*, une bactérie dite extrêmophile vivant dans des sources chaudes et capable de résister à des températures dépassant les 100°C. La température optimale pour l'activité de la Taq polymérase est de 72°C(42).

A cette température, la Taq polymérase va se lier aux ADN simple-brin amorcés et catalyser la réplication en mobilisant les désoxyribonucléosides triphosphates du mélange réactionnel. Les séquences de l'ADN matriciel situées en aval des primers sont ainsi synthétisées sélectivement.

Au prochain cycle, les fragments précédemment synthétisés vont à leur tour servir de matrice et après quelques cycles, la séquence d'ADN comprise entre les zones où se sont hybridés les primers devient l'espèce prédominante. Il est nécessaire d'effectuer plusieurs dizaines de cycles afin d'obtenir une quantité d'ADN analysable sachant que chaque cycle doit en théorie doubler la quantité d'ADN obtenue lors du cycle précédent.

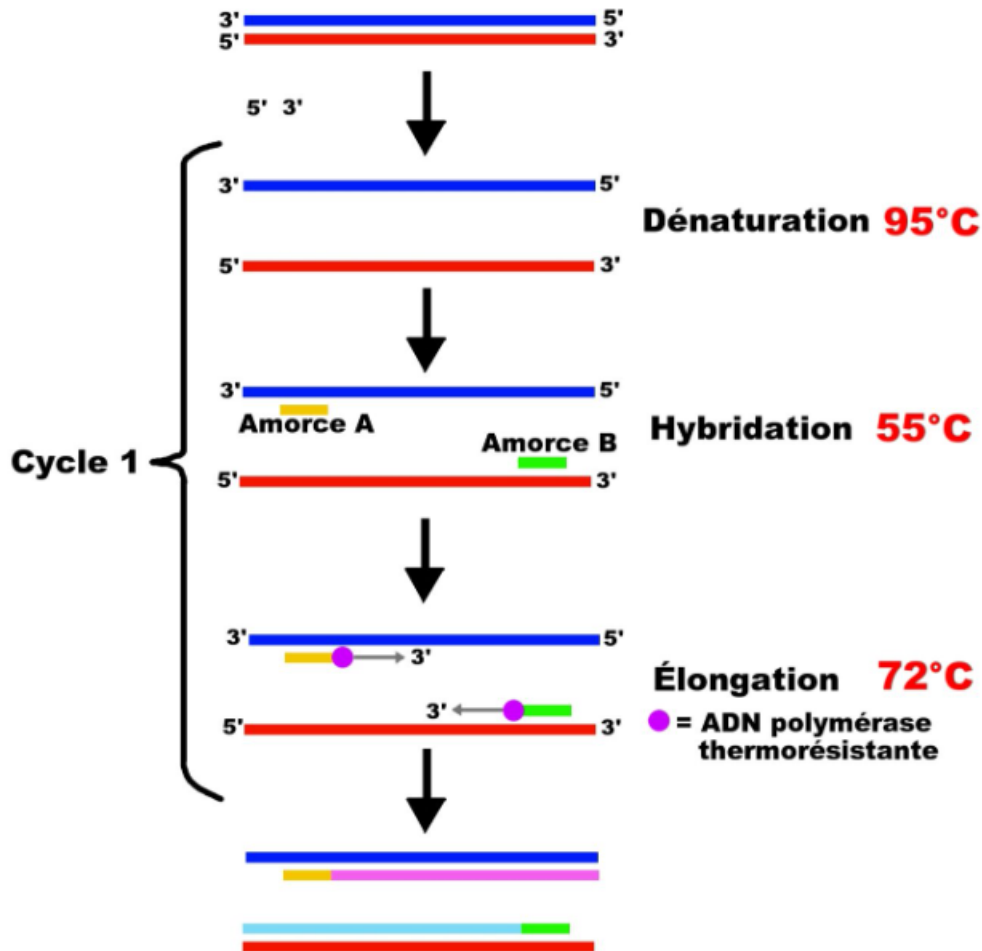


Figure 11 : Schéma du premier cycle de PCR

Source : microbiologiemedicale.fr, Pascal FRAPERIE

I.4.2.5. Les amorces

Afin de réaliser une amplification sélective des séquences d'intérêt à partir de l'ADN matriciel, il est nécessaire de posséder au moins une paire de courts enchainements de nucléotides monocaténares, appelée amorces ou primers. Ces amorces sont synthétisées chimiquement et doivent être le plus complémentaire possible aux deux extrémités de la séquence cible à amplifier. La première amorce est complémentaire d'une séquence située au commencement du brin 5'-3' du fragment d'ADN cible. La seconde est complémentaire d'une séquence située au commencement du brin 3'-5' du même fragment. Les primers ont une taille de 10 à 30 nucléotides pour pouvoir garantir suffisamment de spécificité à l'hybridation sur les séquences d'intérêts(43).

I.4.3. Détection des produits

Les produits d'une PCR sont constitués des fragments d'ADN représentant la séquence d'intérêt. La détection des produits est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette technique permet de séparer les protéines, les ARN ou les ADN en fonction de leur poids

moléculaire. Sous l'effet d'un champ électrique, les acides nucléiques chargés négativement se séparent dans le gel d'agarose, les molécules de grandes tailles se déplaçant moins vite et moins loin que celles de petites tailles.

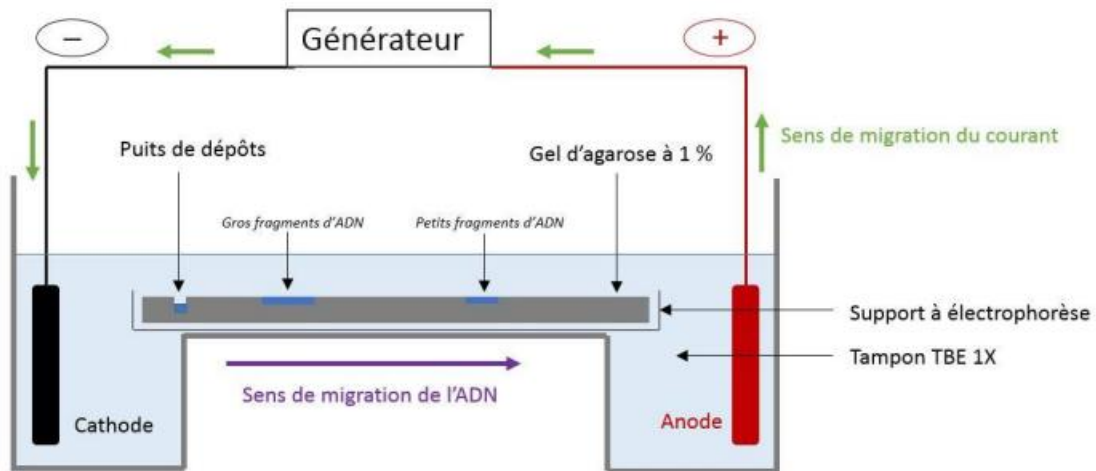


Figure 12 : Principe de l'électrophorèse

Source : Solene Perrin. Test de validation d'un kit de purification d'ADN génomique de sols. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. fihal-02785639

Après avoir séparé les différentes espèces obtenues par PCR, les acides nucléiques vont être révélés par un marquage au bromure d'éthidium qui devient fluorescent à la suite d'une exposition aux rayonnements ultra-violets.

I.4.4. qPCR

La qPCR, ou PCR en temps réel, permet la quantification du produit de la PCR. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent. Ce signal fluorescent est directement proportionnel à la quantité d'amplicons générés au cours de la PCR. Il devient ainsi possible de suivre la réaction à chaque cycle en temps réel. Aujourd'hui, ce processus est complètement automatisé et réalisé dans des tubes fermés au sein d'un thermocycleur(44). Deux grands principes permettent une détection quantitative : les sondes fluorescentes et les agents intercalants se liant à l'ADN bicaténaire.

Parmi les différentes procédures utilisant des sondes fluorescentes se trouve la technique par hydrolyse de sondes ou Taqman Assay. Les sondes correspondent à des séquences de nucléotides complémentaires de la séquence cible, auxquelles sont fixés un fluorochrome émetteur ou reporter, et un fluorochrome suppresseur ou quencher. La proximité entre le suppresseur et l'émetteur empêche l'émission de fluorescence. Les sondes sont initialement libres dans la solution de PCR, puis au cours de la phase d'hybridation, elles se fixent à leurs séquences complémentaires. Ensuite, la Taq polymérase débute l'élongation de l'amplicon à partir des amorces jusqu'à ce qu'elle rencontre la sonde. A cet instant, la sonde est déplacée et hydrolysée, séparant l'émetteur du suppresseur, ce qui permet l'émission de fluorescence. Celle-ci augmente donc à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse des sondes.

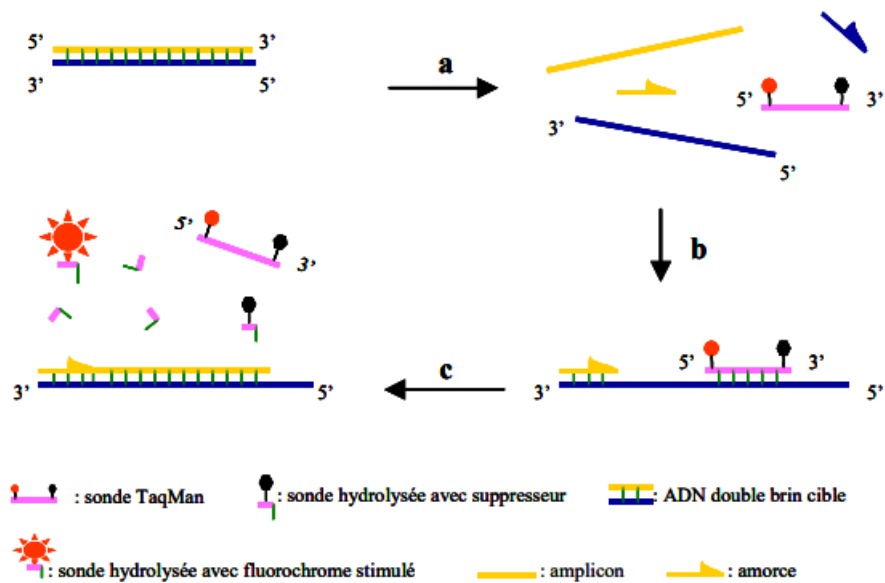


Figure 13 : Schématisation de la technique d'hydrolyse de sondes
 Source : La PCR en temps réel : principes et applications, Elyse Poitras et Alain Houde

L'étude des courbes d'amplification renseigne sur la quantité d'ADN présente au début de la réaction. Cela se fait par comparaison aux courbes obtenues avec des gammes de calibration. Ces gammes de plasmides portant le gène cible sont composés de plusieurs points, dont chacun possède un nombre de copies connu, et sont réalisées sur la même plaque de PCR que l'échantillon analysé(45).

I.5. But de l'étude

L'objectif principal de notre étude était de rechercher, par qPCR, la présence de CMVH dans des greffons de cornées déclassés après dissection anatomique individualisant l'épithélium, le stroma et l'endothélium.

Les objectifs secondaires étaient d'estimer la prévalence du CMVH dans les tissus cornéens chez des donneurs séropositifs et de déterminer la ou les couches cornéennes qui seraient préférentiellement réservoir de ce virus. Nous avons également cherché à évaluer le nombre de cellules présentes dans chaque couche tissulaire et à les comparer selon l'origine du greffon.

II. Etude : Recherche du cytomégalo­virus par qPCR dans les différentes couches tissulaires de greffons cornéens déclassés

II.1. Matériels et méthode

II.1.1. Obtention des greffons

Cette étude a nécessité l'utilisation de tissus humains prélevés sur des donneurs décédés, à des fins thérapeutiques ou scientifiques.

Le calcul du nombre de greffons nécessaires pour démontrer une différence significative de présence du CMV entre les différentes couches cornéennes n'a pas été réalisé.

En effet, devant la rareté du matériel d'étude et les différentes prévalences du CMV retrouvées dans la littérature(4–8), nous avons décidé d'inclure le plus de greffons possible sur une période s'étalant de mai 2023 à février 2024.

Pour ce faire, nous avons fait appel à la Banque Française des Yeux (BFY), la banque de cornées de Rouen et la banque de cornées de Bordeaux qui nous ont gracieusement cédé respectivement 30, 12 et 35 greffons.

Les greffons issus de la banque de cornées de Rouen et une partie de ceux de la Banque Française des Yeux ont été utilisés au cours d'un entraînement chirurgical à la DMEK au cours du congrès annuel de la Société Française d'Ophtalmologie de mai 2023 avant leur utilisation dans notre étude.

II.1.2. Critères d'éligibilité

II.1.2.1. Critères d'inclusion

Tous les greffons cédés par les 3 banques de tissus ont été inclus. Tous étaient des greffons « déclassés », c'est-à-dire ne remplissant pas les critères nécessaires à leur utilisation pour une greffe cornéenne (DCE inférieure à 2000/mm², mauvaise transparence, proportion de polymégatisme et de pléomorphisme trop élevée...).

II.1.2.2. Critères d'exclusion

16 greffons avaient précédemment été utilisés dans des sessions d'entraînement chirurgical. Lors de ces entraînements, les endothéliums ont été disséqués et pour certains, injectés dans des yeux de porc.

Lors de leur réception, 2 cornées contenues dans des flacons dont le liquide de conservation était trouble et jaune, par acidification du milieu, ont été exclues. Cette modification colorimétrique indiquait une contamination bactérienne des liquides.

II.1.3. Nombre de greffons inclus

77 greffons cornéens ont été inclus dans notre étude du 1er mai 2023 au 16 février 2024. Deux greffons ont été exclus devant l'altération de leur liquide de conservation.

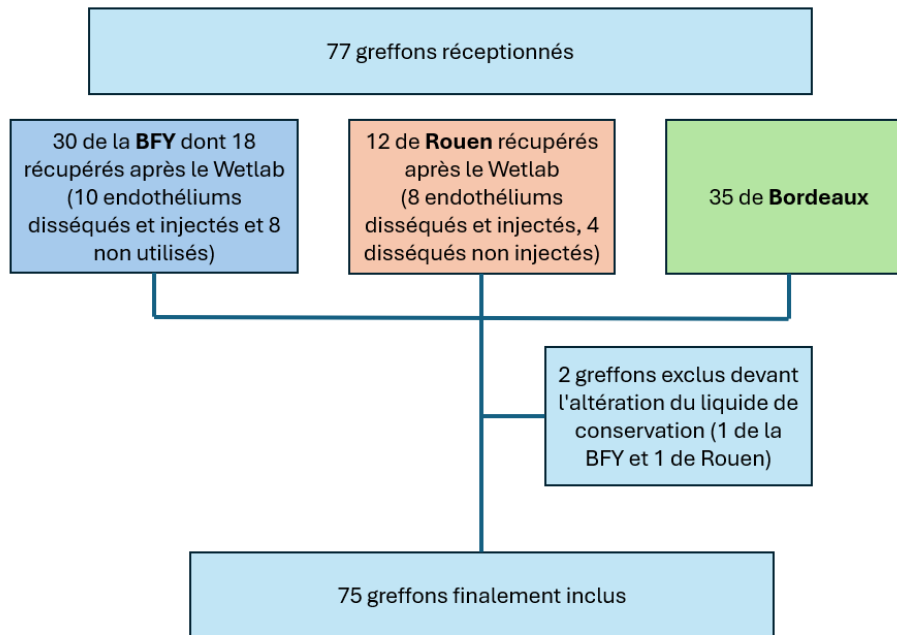


Figure 14 : Diagramme de flux de l'étude

II.2. Procédures de l'étude

II.2.1. Sérologies

Le statut sérologique pour le CMV n'est pas évalué chez les patients donateurs de cornée, ce virus n'étant pas une contre-indication au don. Du sérum de chaque patient donneur est cependant conservé en banque, ce qui nous a permis d'obtenir cette analyse. Les sérologies CMV (IgM et IgG) des patients ont donc été réalisées a posteriori. Elles ont été réalisées au laboratoire Cerba (technique CLIA, LIAISON XL/DiaSorin, France) pour les greffons provenant de la Banque Française des Yeux, au laboratoire du CHU de Rouen (technique CMIA, Alinity i1000, Abbott) et du CHU de Limoges (technique CLIA, LIAISON XL/DiaSorin, France) pour les greffons de Rouen et de Bordeaux respectivement.

II.2.2. Dissection des greffons

Chaque greffon a été disséqué dès réception au CHU de Limoges. Deux procédures distinctes ont été utilisées.

La première procédure a concerné les 58 premiers greffons. La dissection s'est déroulée dans une salle du laboratoire de l'UMR 1092 sous loupe binoculaire (Stéréomicroscope portable SFX- 34, OPTIKA, Italie). Les greffons ont été placés sur une boîte de Pétri. L'épithélium a initialement été séparé du stroma par grattage au scalpel.

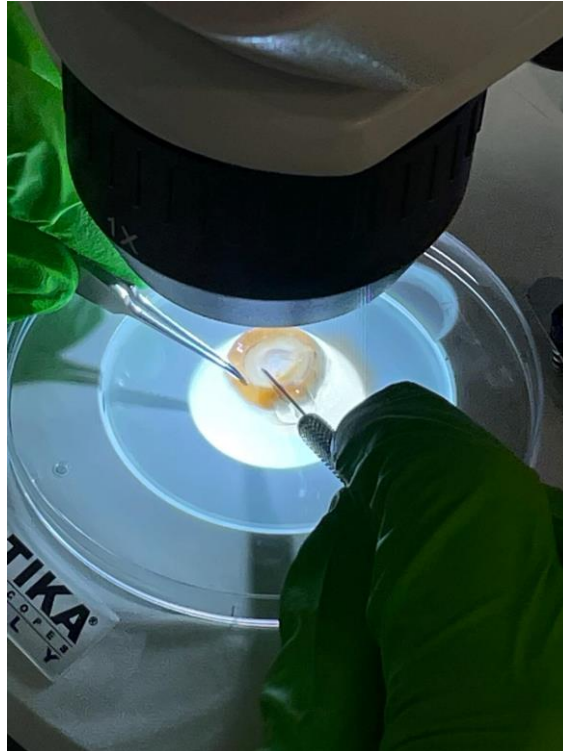


Figure 15 : Séparation de l'épithélium par grattage au scalpel sous loupe binoculaire

Après coloration par du bleu trypan (Solution Trypan blue Stain, 0,4 %, Gibco™ 15250061, USA), l'endothélium a secondairement été pelé au moyen d'une pince de Troutman.

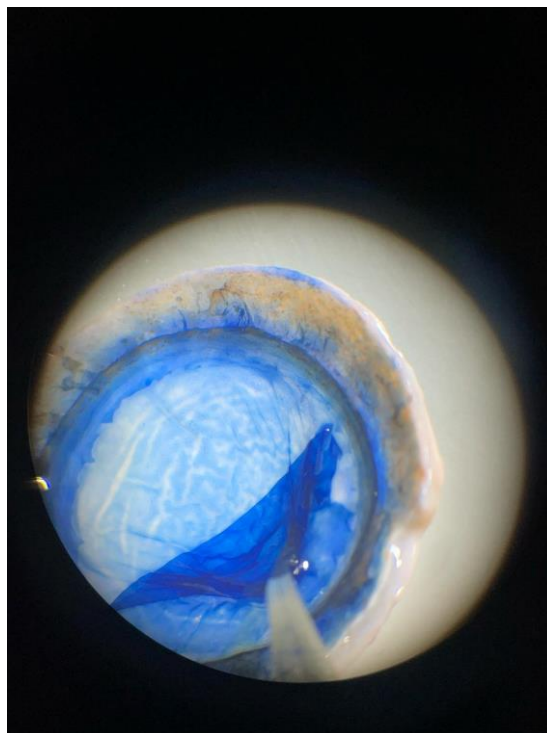


Figure 16 : Pelage de l'endothélium sous loupe binoculaire après coloration (Grossissement X 10)

Enfin, le stroma restant a été découpé de son anneau scléral à l'aide de ciseaux. Chaque tissu séparé a ensuite été placé dans un tube Eppendorf de 1.5mL. Les cellules épithéliales, ne formant plus d'unité tissulaire, ont été placées en suspension dans de l'eau pour préparation injectable (PPI). Entre chaque greffon, les instruments, la boîte de Pétri et la table de travail ont été nettoyés à l'alcool à 70°.

La seconde procédure a été utilisée pour les 17 greffons suivants. La dissection s'est déroulée dans la salle de bloc d'ophtalmologie du CHU de Limoges sous microscope opératoire en suivant les mêmes étapes. Le bleu trypan a été remplacé par du VisionBlue® (D.O.R.C., Zuidland, Pays-Bas). Au cours de la seconde procédure, à la différence de la première, les boîtes de Pétri, les lames de scalpel, les pinces de Troutman et de Bonn ainsi que les ciseaux étaient stériles et changés entre chaque greffon. La table a été nettoyée entre chaque greffon par un détergent désinfectant Surfanios Premium (Anios, Lille-Hellemmes, France), et les gants changés systématiquement.

Tous les prélèvements ont ensuite été congelés à -80°C dans l'attente de leur extraction.

II.2.3. PCR Multiplex CMV – Albumine

II.2.3.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée manuellement avec le kit d'extraction d'ADN DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Chaque tissu a été placé dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5mL dans lequel ont été ajoutés 180µL de tampon ATL puis 20 µL de protéinase K. Les stromas ont été coupés en petits morceaux afin de faciliter leur digestion. Après un mélange au vortex, les tissus ont été incubés à 56°C afin d'obtenir un lysat légèrement visqueux, marqueur de dissolution complète des tissus (environ 1h30 pour les stromas). Après homogénéisation du lysat, 200µL de tampon AL ont été ajoutés au mélange avant un nouveau passage au vortex. 200µL d'éthanol absolu ont ensuite été apportés au lysat suivi d'une nouvelle homogénéisation. Après cela, les solutions ont été placées dans des colonnes elles-mêmes situées dans des tubes collecteurs afin de procéder à deux lavages successifs par les solutions tampons AW1 et AW2. Les colonnes ont finalement été placées dans des tubes Eppendorf de 1,5mL et l'ajout de 200µL de tampon AE a permis d'éluer l'ADN en fin de manipulation. Les tubes contenant l'ADN ont été conservés à -80°C dans l'attente de la qPCR.

Les extractions ont également été séparées en deux groupes. Les premières se sont déroulées dans une salle du laboratoire de l'UMR 1092 pour les 58 premiers greffons. Les suivantes ont été réalisées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) dans la salle d'extraction d'ADN du laboratoire du CHU de Limoges avec un kit d'extraction d'ADN neuf DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Courtaboeuf, France) pour les 17 greffons restants avec des ciseaux stériles pour la découpe de chaque stroma.

II.2.3.2. Evaluation de la pureté de l'ADN extrait

Lors de la décongélation des échantillons pour réalisation de la qPCR, une évaluation de la pureté et de la concentration des ADN par mesure de leur absorbance à 260 et 280 nm a été réalisée par un spectrophotomètre (NanoDrop™ 2000/2000c, ND2000USCAN, Thermo Scientific™, USA). Un volume de 1,3µL a été prélevé pour chaque échantillon.

II.2.3.3. Matériel pour la qPCR

La qPCR utilisée pour notre étude a été mise au point au sein de l'UMR 1092 RESINFIT à Limoges(46). Cette qPCR multiplex permet de déterminer le nombre de copies d'ADN de CMV et d'albumine d'un échantillon au cours de la même procédure.

Ses éléments constitutifs comprennent le Mix pour qPCR PerfeCta® MultiPlex qPCR ToughMix® (Quantabio, QIAGEN Beverly, USA, référence fabricant 733-2322), de l'eau PPI, des primers et sondes albumine et CMV, une gamme de plasmides d'albumine en 7 points de 10^2 à 10^8 copies et une gamme de plasmides CMV UL83 (protéine tégumentaire essentielle du virus) en 7 points de 10^2 à 10^8 copies.

Les plaques de qPCR utilisées étaient des plaques BIO-RAD Hard-Shell® 96-Well PCR plates (référence fabricant HSP9601) et le thermocycleur un CFX96 Touch Deep Well™ (Real-Time PCR System, BIO RAD, USA). Le programme de PCR commençait par une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 minutes suivie de 45 cycles de 55 secondes composés par une phase de dénaturation à 95°C pendant 10 secondes et une phase d'hybridation-élongation à 60°C pendant 45 secondes. L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager version 3.1.

Tableau 1 : Primers et sondes utilisés pour la qPCR multiplex

Nom	Séquence	Tm (°C)	Degré de purification
Primer albumine forward	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT	67,8	HPLC
Primer albumine reverse	AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT	68	HPLC
Primer CMV forward	GTCAGCGTTCGTGTTTCCCA	68,5	HPLC
Primer CMV reverse	GGGACACAACCCGTAAAGC	64,3	HPLC
Sonde albumine	[6-FAM]CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC[BHQ1]	74	HPLC
Sonde CMV	[CY5]CCCGCAACCCGCAACCCTTCATG[BHQ2]	79,8	HPLC

Tableau 2 : Ratio des réactifs pour la qPCR multiplex

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale	Volume/puit	Volume pour 100 puits
MIX perfecta®	5 X	1 X	5 µL	500 µL
Primer albumine forward	10 µM	50 nM	0,125 µL	12,5 µL
Primer albumine reverse	10 µM	50 nM	0,125 µL	12,5 µL
Primer CMV forward	10 µM	50 nM	0,125 µL	12,5 µL
Primer CMV reverse	10 µM	50 nM	0,125 µL	12,5 µL
Sonde albumine	10 µM	200 nM	0,5 µL	50 µL
Sonde CMV	10 µM	200 nM	0,5 µL	50 µL
H ₂ O ppi			13,5 µL	1350 µL

II.3. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel open source R version 4.3.2. Des tests non paramétriques ont été utilisés pour comparer les variables continues : test de Wilcoxon signé et ANOVA de Friedman. Les variances ont été comparées à l'aide du test de Levene. Les résultats ont été considérés significatifs pour une valeur $P < 0,05$. Les graphiques ont été réalisés avec le logiciel R version 4.3.2.

II.4. Résultats

Notre étude a porté sur 75 greffons cornéens obtenus entre le 1^{er} mai 2023 et le 16 février 2024. Ces greffons ont été séparés en deux groupes et manipulés selon deux protocoles distincts avec 58 greffons dans le premier groupe et 17 dans le second.

II.4.1. Sérologies CMV

47 cornées sur 75, soit 62,7%, provenaient de patients séropositifs en IgG au CMV, dont 3 étaient également positifs en IgM.

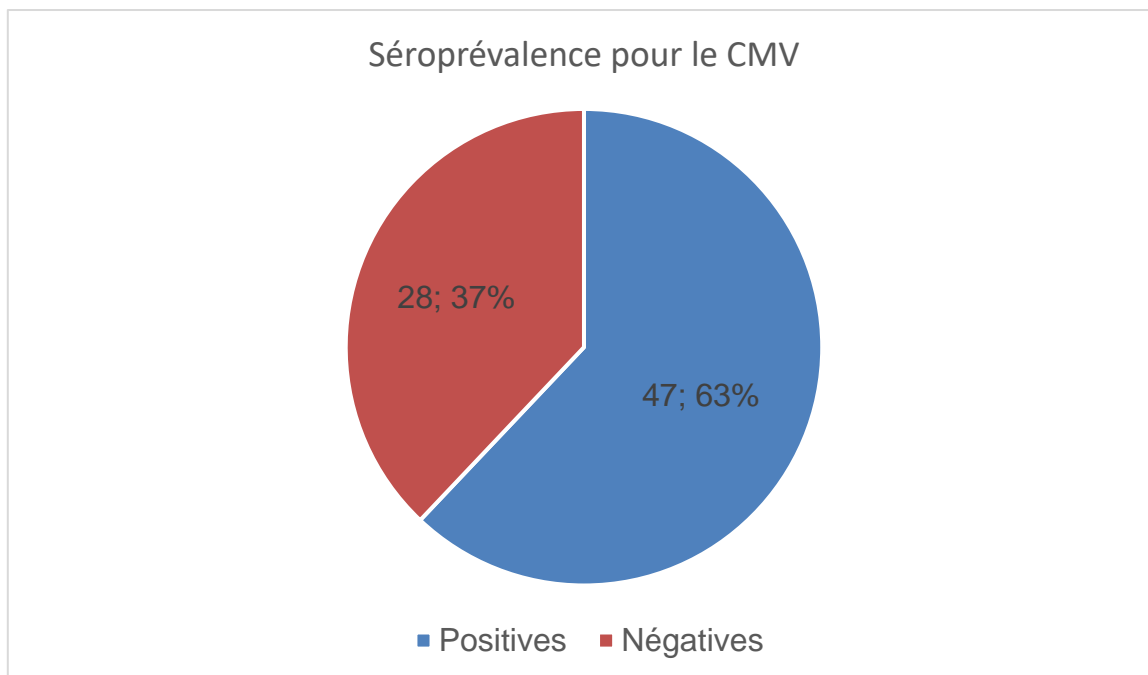


Figure 17 : Séroprévalence pour le CMV (IgG) des patients donneurs de cornée

II.4.2. Spectrophotométrie

La concentration d'ADN de nos échantillons ainsi que leur pureté ont été mesurées par spectrophotométrie. Le rapport de l'absorbance d'une longueur d'onde de 260 nm sur celle de 280 nm se situe proche de 1,8 pour de l'ADN pur, et évalue la contamination par des protéines.

Tableau 3 : Concentration et pureté de l'ADN des échantillons

Couche tissulaire	Médiane et rang interquartile des concentrations d'ADN	Médiane et rang interquartile du rapport 260/280 nm
Epithélium	132 ng/μL [62 – 200]	1,99 [1,92 – 2,29]
Stroma	246 ng/μL [206 – 291]	1,88 [1,84 – 1,94]
Endothélium	34 ng/μL [27 – 52]	1,88 [1,68 – 2,20]

Comme attendu, nous retrouvons des concentrations d'ADN élevées pour les stromas, moins importantes pour les épithéliums et faibles pour les endothéliums.

Le rapport médian d'absorbance de nos échantillons est compris entre 1,8 et 2 ce qui témoigne d'une pureté correcte.

II.4.3. Recherche du CMV

II.4.3.1. Recherche du CMV dans le premier groupe

Nous avons évalué le nombre de copies virales de CMV pour chaque couche cellulaire analysée par qPCR. Nous avons retrouvé la présence de CMV dans 35 épithéliums, 52 stromas et 50 endothéliums dans notre premier groupe. Le nombre médian était de $2,11.10^3$ copies de CMV dans l'épithélium, $8,00.10^3$ copies de CMV dans le stroma et $1,07.10^4$ copies de CMV dans l'endothélium.

Tableau 4 : Nombre de copies de CMV dans les échantillons positifs du premier groupe

Couche tissulaire	Médiane et rang interquartile	Minimum	Maximum	Moyenne
Epithélium (copies de CMV)	$2,11.10^3$ [$7,75.10^2 - 4,14.10^3$]	$6,05.10^1$	$5,13.10^4$	$5,31.10^3$
Stroma (copies de CMV)	$8,00.10^3$ [$3,36.10^3 - 7,64.10^4$]	$4,22.10^1$	$3,46.10^6$	$3,38.10^5$
Endothélium (copies de CMV)	$1,04.10^4$ [$1,10.10^3 - 1,35.10^6$]	$1,07.10^2$	$2,72.10^7$	$2,39.10^6$

Tableau 5 : Répartition des greffons cornéens du premier groupe selon leur sérologie CMV et qPCR

	Sérologie CMV +	Sérologie CMV -	Total
Greffon CMV +*	36	22	58
Greffon CMV -	0	0	0
Total	36	22	58

* Le greffon est considéré positif si au moins une couche tissulaire est positive

Dans ce premier groupe, tous les greffons étaient positifs au CMV, quel que soit le statut sérologique du donneur. Par ailleurs, les résultats des qPCR ont retrouvé une positivité aléatoire entre les différents tissus d'une même cornée et parfois avec un nombre de copies correspondant à ceux observés en cas d'infection active par le virus. Devant ces résultats incohérents, nous avons émis l'hypothèse d'une contamination au cours de nos manipulations.

Afin de pouvoir identifier l'origine de cette contamination, nous avons réévalué chaque étape du procès en remontant la chaîne d'analyse des résultats de notre qPCR à la réception des échantillons.

Les qPCR aux résultats discordants (qPCR positive pour un greffon de patient séronégatif, et inversement) ont donc été répétées sur une 2^{ème} série de triplicatas. Les échantillons

initialement positifs pour le CMV étaient à nouveau positifs, avec un nombre de copies superposable à la première série de qPCR, sans mise en défaut des témoins négatifs.

Des qPCR sur les différents produits utilisés au cours de ces manipulations (le bleu trypan, les tampons ATL, AL, AW1, AW2 et AE, la protéinase K et l'éthanol) à la recherche de CMV ont également été réalisées mais n'ont pas identifié sa présence. De plus, les témoins d'extraction réalisés a posteriori avec le premier kit d'extraction sur eau PPI sont également revenus négatifs au CMV en qPCR.

Les étapes de dissection et d'extraction d'ADN n'ont pu être répétées car la totalité des tissus a été utilisée lors de ces étapes.

Afin d'éliminer au mieux le risque de contamination, nous avons changé nos méthodes décrites précédemment pour la dissection et l'extraction d'ADN des greffons du second groupe, avec utilisation de matériels et produits neufs et stériles, ajout de témoins négatifs lors de l'étape d'extraction d'ADN et changement du lieu de travail.

II.4.3.2. Recherche du CMV dans le second groupe

Les qPCR des 17 épithéliums, stromas et endothéliums sont toutes revenues négatives au CMV dans notre second groupe.

Par ailleurs, les échantillons témoins réalisés lors des 6 séries d'extraction d'ADN du second groupe sont tous restés négatifs.

Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une contamination des échantillons de notre premier groupe.

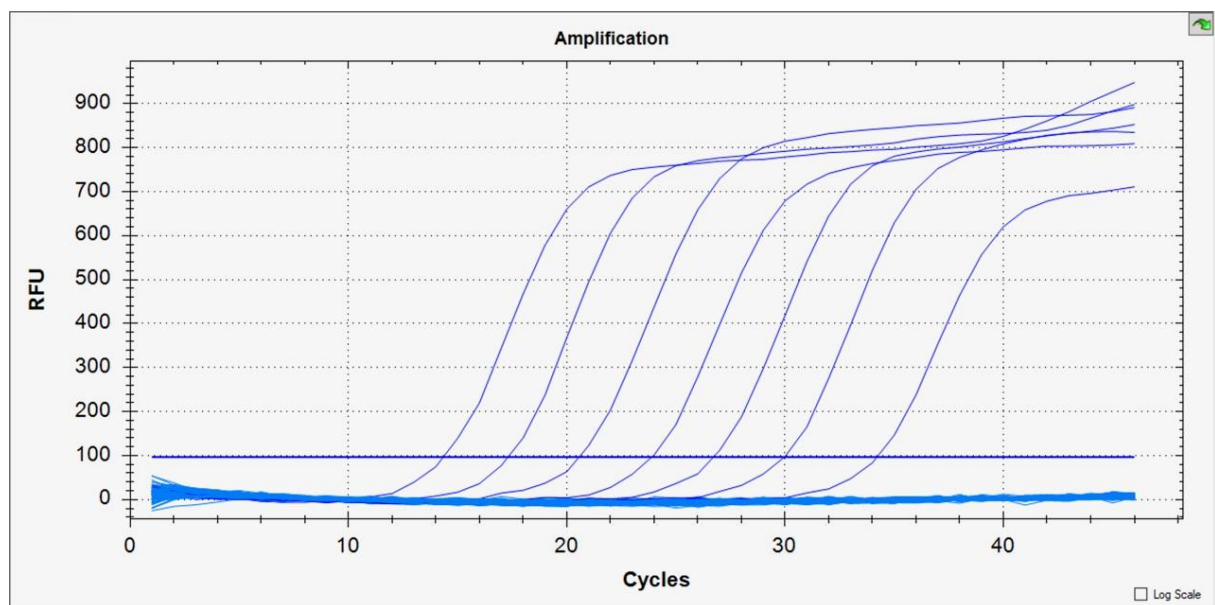


Figure 18 : Courbes d'amplification pour le CMV d'une plaque de qPCR du second groupe

Seules les courbes correspondant aux points de la gamme de calibration pour le CMV présentent un aspect exponentiel typique d'un résultat positif. Leur espacement régulier est le

signe d'une bonne préparation de la gamme. Toutes les autres courbes restent plates ce qui traduit l'absence d'ADN de CMV dans les échantillons testés.

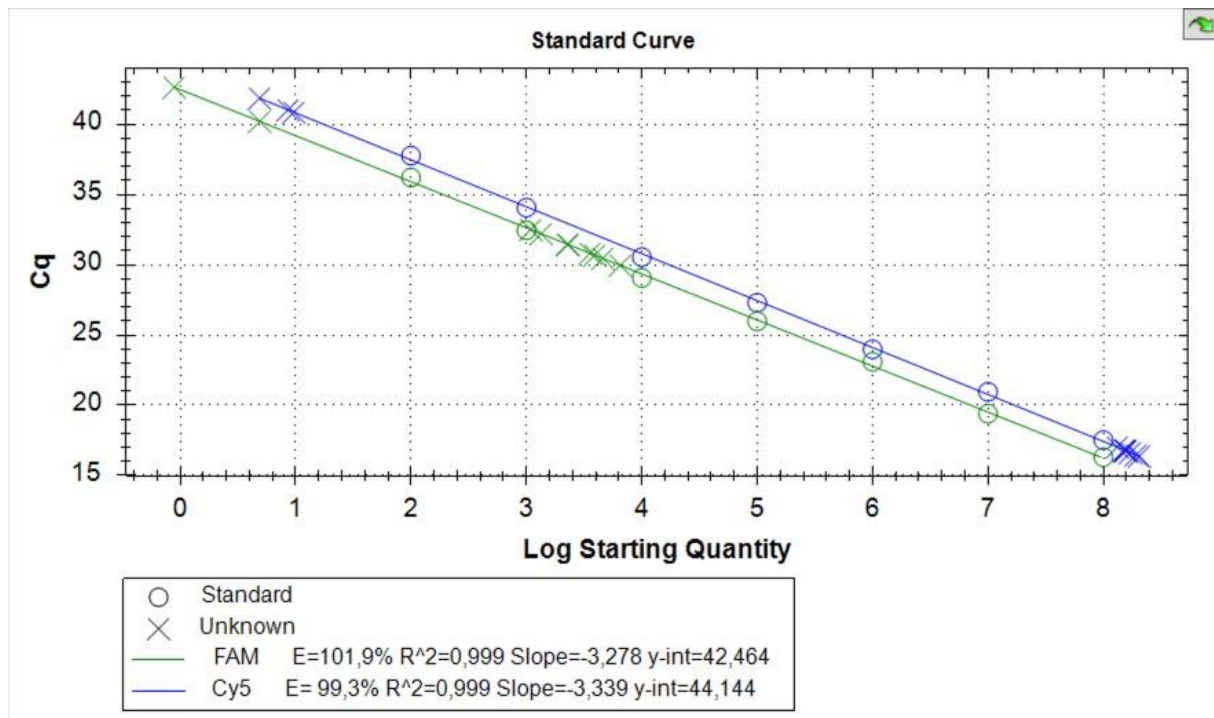


Figure 19 : Critères de qualité des gammes d'étalonnage des qPCR

Ces courbes sont établies sur un repère semi-logarithmique grâce aux gammes d'étalonnage. Elles permettent de déterminer la quantité initiale d'ADN présente dans chaque puits analysé en fonction du cycle de quantification (Cq) obtenu. Elles sont calculées pour chaque réaction de qPCR.

Deux critères de jugement sur la qualité des qPCR y sont indiqués. L'efficacité de la réaction notée **E** qui correspond à la duplication de l'ADN à chaque cycle. Une efficacité de 100% reflète un doublement de la quantité d'ADN. L'efficacité est considérée acceptable entre 90 et 110%, en dehors de cet écart, les résultats obtenus par la qPCR ne peuvent être considérés comme fiables. Le deuxième indice est le **R²**, le coefficient de détermination linéaire. Il s'agit d'une mesure de la qualité de prédiction d'une régression linéaire. Plus le R² s'approche de 1, plus les résultats seront fiables. Il est considéré acceptable au-delà de 0,980.

La figure 19 montre une efficacité de 101,9% et un R² à 0,999 pour le plasmide de l'albumine (FAM) et une efficacité de 99,3% et un R² à 0,999 pour le plasmide du CMV (Cy5).

II.4.4. Cellularités tissulaires

La détermination du nombre de copies d'albumine par qPCR multiplex permet d'estimer le nombre de cellules présentes dans l'échantillon analysé car chaque cellule humaine possède 2 copies de ce gène.

II.4.4.1. Cellularités tissulaires du premier groupe

Nous avons ainsi retrouvé une quantité de cellules médianes de $1,02 \cdot 10^6$ pour les épithéliums, $4,15 \cdot 10^6$ pour les stromas et $1,12 \cdot 10^5$ pour les endothéliums.

Tableau 6 : Nombre de cellules dans les échantillons du premier groupe

Couche tissulaire	Médiane et rang interquartile	Minimum	Maximum	Moyenne
Epithélium (nombre de cellules)	$1,02 \cdot 10^6$ [$4,47 \cdot 10^5 - 1,77 \cdot 10^6$]	$8,69 \cdot 10^3$	$3,45 \cdot 10^6$	$1,18 \cdot 10^6$
Stroma (nombre de cellules)	$4,15 \cdot 10^6$ [$3,18 \cdot 10^6 - 5,35 \cdot 10^6$]	$2,03 \cdot 10^6$	$9,93 \cdot 10^6$	$4,37 \cdot 10^6$
Endothélium (nombre de cellules)	$1,12 \cdot 10^5$ [$4,20 \cdot 10^4 - 2,15 \cdot 10^5$]	$5,12 \cdot 10^3$	$7,58 \cdot 10^5$	$1,60 \cdot 10^5$

II.4.4.2. Cellularités tissulaires du second groupe

Concernant le nombre de cellules par couches tissulaires pour le second groupe, la médiane était de $9,87 \cdot 10^5$ pour les épithéliums, $3,77 \cdot 10^6$ pour les stromas et $1,50 \cdot 10^5$ pour les endothéliums.

Tableau 7 : Nombre de cellules dans les échantillons du second groupe

Couche tissulaire	Médiane et rang interquartile	Minimum	Maximum	Moyenne
Epithélium (nombre de cellules)	$9,87 \cdot 10^5$ [$4,85 \cdot 10^5 - 2,20 \cdot 10^6$]	$1,68 \cdot 10^5$	$3,34 \cdot 10^6$	$1,24 \cdot 10^6$
Stroma (nombre de cellules)	$3,77 \cdot 10^6$ [$2,84 \cdot 10^6 - 4,83 \cdot 10^6$]	$2,40 \cdot 10^6$	$6,58 \cdot 10^6$	$3,77 \cdot 10^6$
Endothélium (nombre de cellules)	$1,50 \cdot 10^5$ [$9,33 \cdot 10^4 - 2,06 \cdot 10^5$]	$4,71 \cdot 10^3$	$2,74 \cdot 10^5$	$1,43 \cdot 10^5$

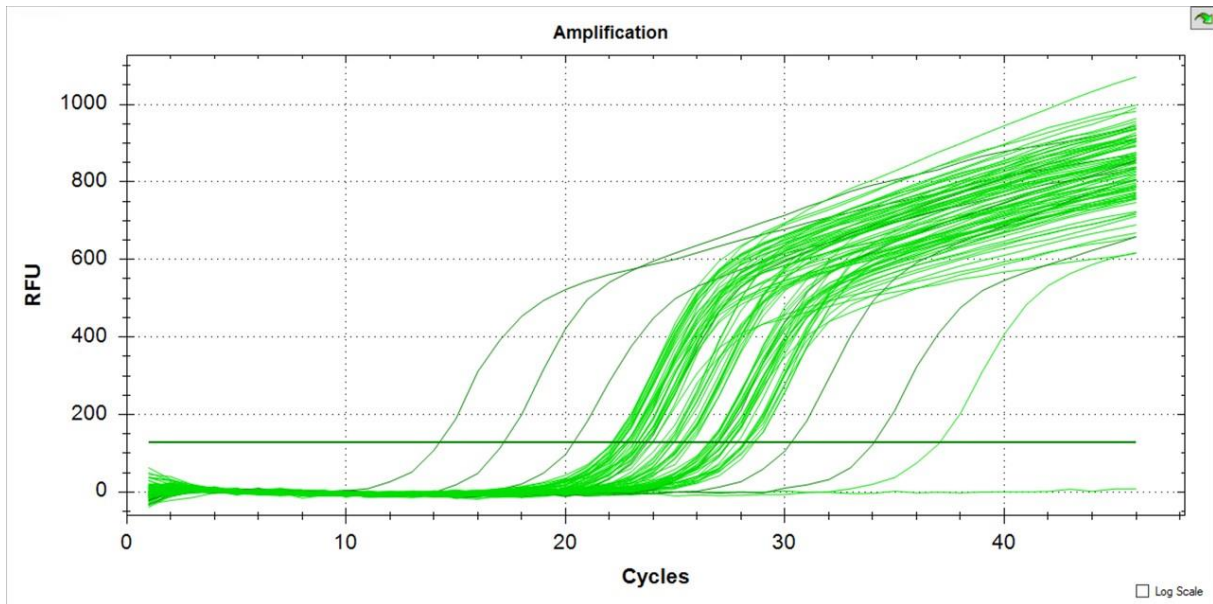


Figure 20 : Courbes d'amplification pour l'albumine d'une plaque de qPCR du second groupe

Nous retrouvons ici les courbes régulièrement espacées aux extrémités du graphique correspondant à la gamme de calibration. Le nombre important de courbes au centre reflète la présence d'albumine dans nos échantillons avec un nombre de copies compris entre 10^3 et 10^6 .

II.4.5. Comparaison des cellularités tissulaires

Pour la suite des résultats consacrés à la cellularité de nos échantillons, nos deux groupes ont été fusionnés. Les résultats sont exprimés en centaines de milliers de cellules et les médianes sont présentées graphiquement en reprenant l'architecture histologique cornéenne comme suit.

Le nombre médian de cellules était de $10,2 \cdot 10^5$, $41,5 \cdot 10^5$ et $1,3 \cdot 10^5$ cellules pour les épithéliums, stromas et endothéliums respectivement.

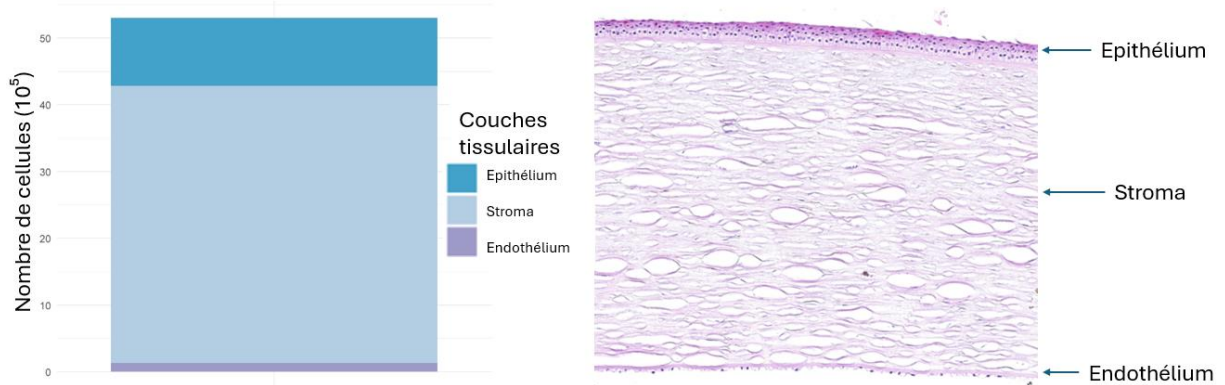


Figure 21 : Comparaison de la représentation graphique des médianes de cellularité des couches tissulaires à gauche, à une coupe histologique de cornée à droite

Cette comparaison illustre le partage entre volume et cellularité des tissus cornéens. En effet, l'épithélium représente un dixième de l'épaisseur cornéenne mais il est essentiellement constitué de couches pluristratifiées qui représentent 19% du nombre total de cellules d'après nos résultats. Le stroma est en grande partie constitué de matrice extracellulaire, il occupe 90% de l'épaisseur cornéenne (partie centrale majoritaire plus claire) et compte pour 79% du total cellulaire. Enfin, la monocouche cellulaire qu'est l'endothélium représente les 2% de cellules restantes.

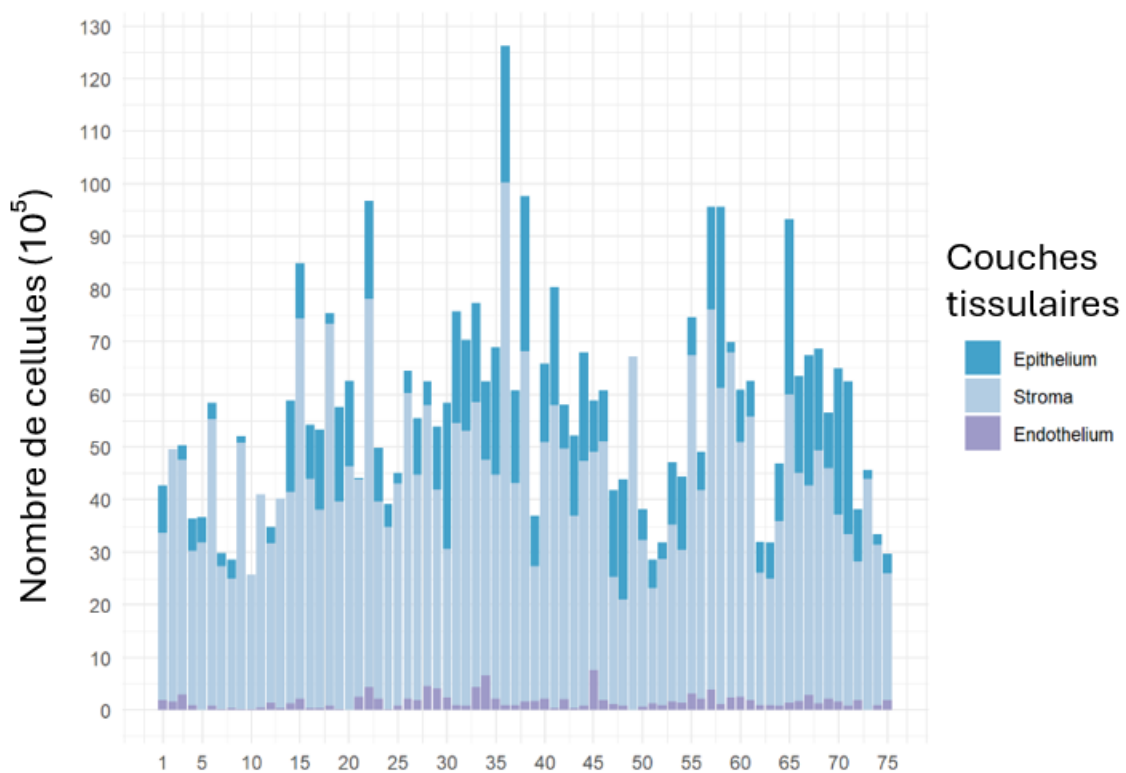


Figure 22 : Représentation graphique des médianes de cellularité des trois couches tissulaires des 75 greffons analysés

Ce graphique présente l'ensemble de la population étudiée et de la variabilité retrouvée d'un greffon à l'autre. A la vue de ces résultats, nous avons comparé la cellularité des couches entre elles. L'objectif était de déterminer si pour une cornée donnée, un nombre élevé de cellules dans une des couches était associé à un nombre également élevé dans une autre couche, mais nous n'avons pas retrouvé de corrélation statistiquement significative entre stroma et épithélium ($p = 0,076$), stroma et endothélium ($p = 0,085$) ni épithélium et endothélium ($p = 0,63$).

La figure 22 met également en avant une variabilité importante pour le stroma et assez faible pour l'endothélium. Les écarts-types sont de 8,8, 15,0 et 1,4 pour l'épithélium, le stroma et l'endothélium respectivement.

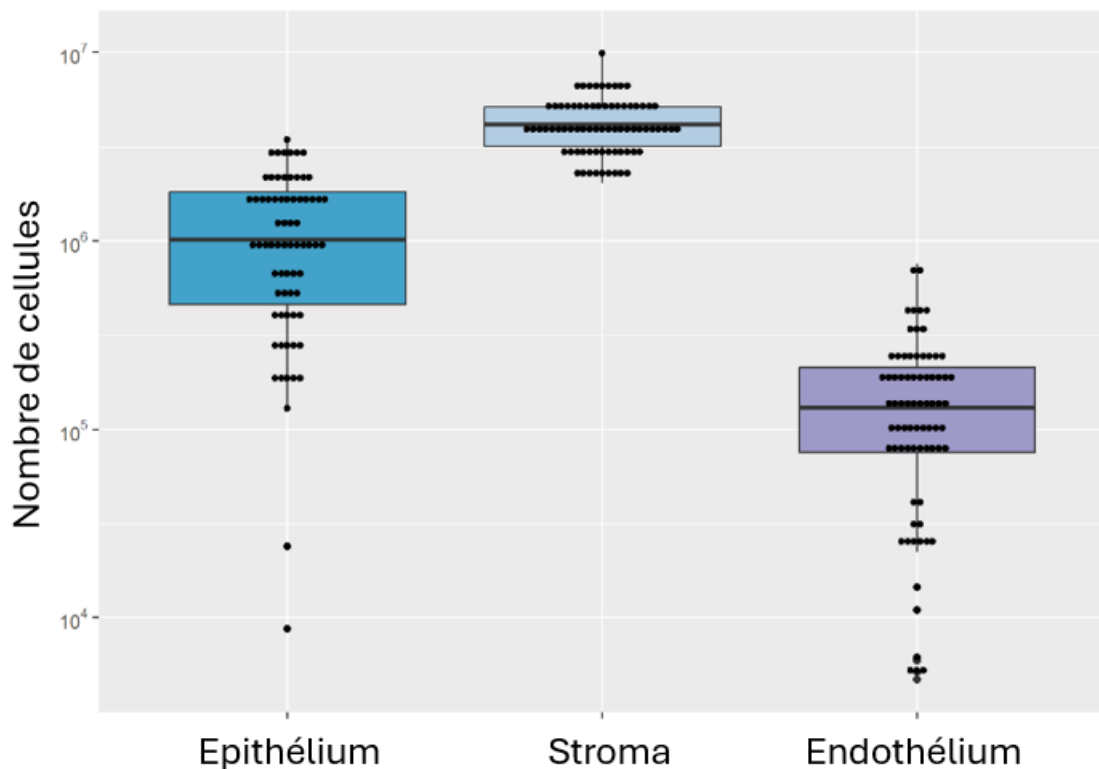


Figure 23 : Graphique en boîte à moustaches des médianes, premiers et troisièmes quartiles des cellularités tissulaires de l'ensemble des échantillons

Le coefficient de variation correspond au rapport de l'écart-type sur la moyenne, et est exprimé en pourcentage. Il permet ici d'évaluer la variation de cellularité rapporté au nombre moyen de cellules dans chaque tissu. Il est de 72, 35 et 87% pour les épithéliums, stromas et endothéliums respectivement.

Contrairement aux valeurs apportées par les écarts-types, nous retrouvons donc une faible variation de cellularité dans les stromas alors qu'elle est plus importante pour les épithéliums et les endothéliums.

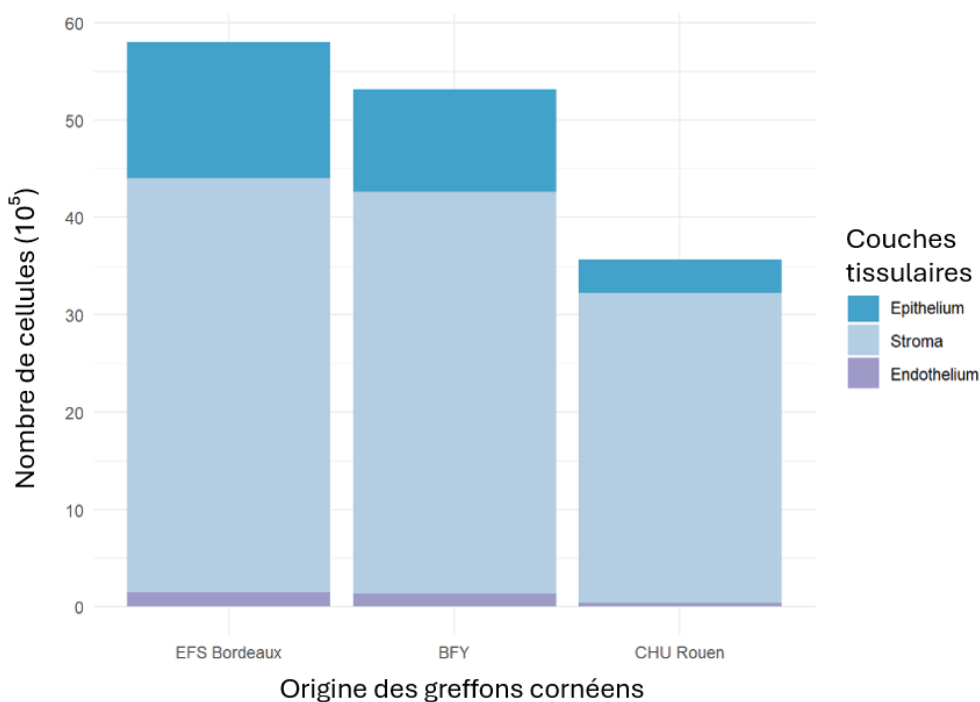


Figure 24 : Représentation graphique de la cellularité des couches tissulaires (nombre de cellules médian) selon la provenance des greffons

Ce graphique met en évidence une différence de cellularité significative dans les épithéliums et les endothéliums entre les trois centres ($p = 0,005$ et $p = 0,047$ respectivement). A l'inverse, la cellularité stromale varie peu ($p = 0,413$).

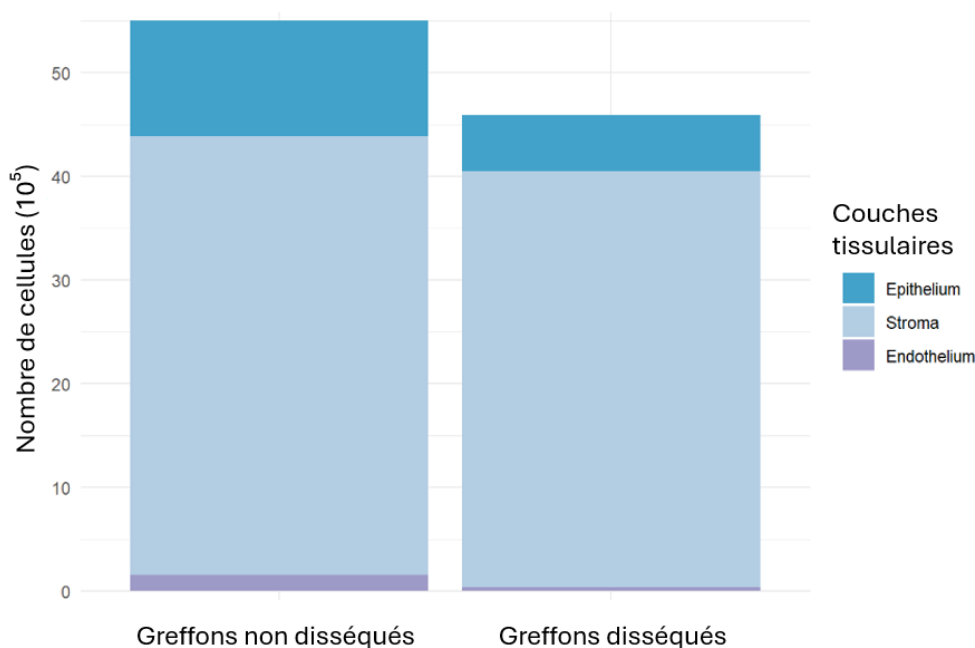


Figure 25 : Représentation graphique des médianes de cellularité des greffons selon leur dissection ou non, lors du Wetlab de la SFO

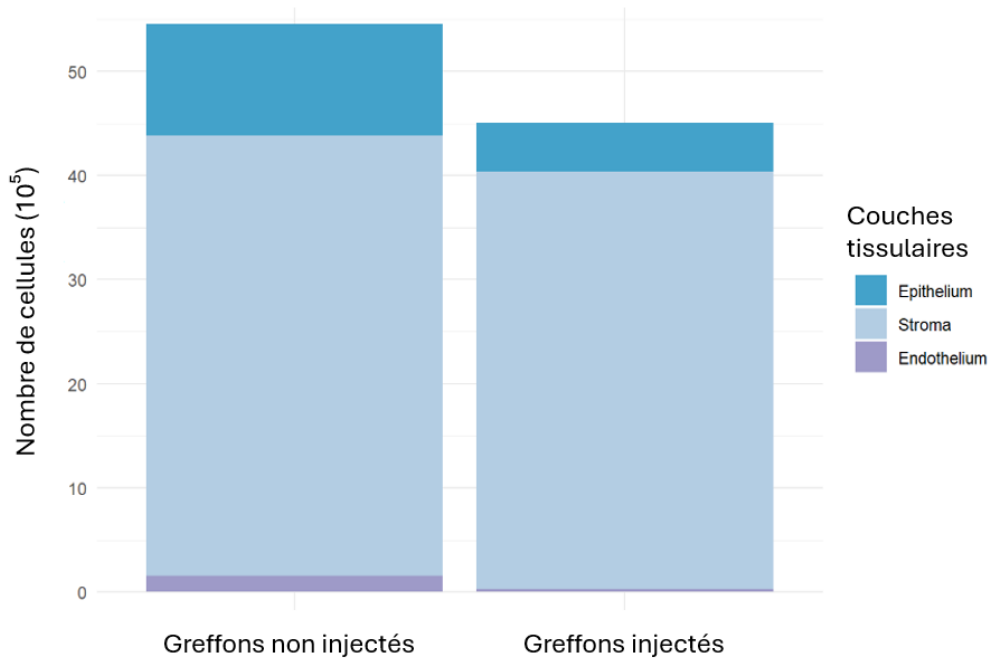


Figure 26 : Représentation graphique des médianes de cellularité des greffons selon leur injection dans un œil de porc ou non, lors du Wetlab de la SFO

Ces deux graphiques ont pour objectif de montrer une différence sur la cellularité des échantillons, notamment des endothéliums, en fonction de la manipulation ou non des greffons lors d'un Wetlab. L'atelier de la SFO consistait à disséquer l'endothélium puis, pour la plupart des greffons préparés, de l'injecter dans des yeux de porcs. La différence est flagrante pour les endothéliums. La cellularité médiane passe de $1,5 \cdot 10^5$ cellules pour les endothéliums non manipulés à $0,4 \cdot 10^5$ pour les endothéliums disséqués ($p = 0,001$) et à $0,3 \cdot 10^5$ ($p < 0,001$) pour les endothéliums injectés. Ceci explique aussi la différence de cellularité retrouvée entre les 3 centres. En effet, tous nos greffons provenant de la banque de Rouen ont été disséqués lors du Wetlab contre la moitié des greffons de la Banque Française des Yeux et aucun de la banque de Bordeaux.

II.5. Discussion

Dans notre étude, nous avons cherché la présence de CMV par qPCR dans les différentes couches tissulaires de greffons cornéens disséqués afin de localiser le virus, et tenter de déterminer un ou des éventuels sites de latence au sein même de ce tissu oculaire.

Sur notre population de 75 greffons, 62,7% des donneurs étaient séropositifs au CMV, ce qui est en accord avec la littérature sur la séoprévalence en France(25).

II.5.1. Analyse de la recherche sur le CMV

Nos résultats sont divisés en 2 groupes.

Les différentes études ayant recherché le CMV dans des cornées retrouvent des prévalences pour le CMV allant de 1 à 20% sur des cornées greffées donc considérées saines(6,7) et de 0 à 27% sur des cornées receveuses de greffe et donc pathologiques(4–6,8). Les résultats de

notre premier groupe sont incohérents avec la littérature alors que ceux de notre second groupe s'en rapprochent.

II.5.1.1. Analyse des résultats du premier groupe

Nous avons retrouvé la présence de CMV dans tous nos greffons cornéens en considérant la positivité lorsqu'au moins une couche tissulaire était positive, et ce quel que soit le statut sérologique du donneur. Pour certains échantillons, le nombre de copies de CMV retrouvé pour une couche tissulaire était de 10^5 soit une quantité de virus bien trop élevée pour un portage sain dans un tissu ne montrant aucun signe d'infection. En effet, de telles quantités virales sont plutôt observées lors d'une infection active par le virus(47).

Devant cette probable contamination, nous avons essayé de comprendre son origine en reprenant nos manipulations : qPCR, dissection, extraction d'ADN.

La qPCR peut être l'une des sources de la contamination lors de la dépose des extraits d'ADN, notamment en cas d'analyse concomitante d'échantillons fortement dosés en ADN viral. Mais plusieurs arguments vont à l'encontre de cette hypothèse. Premièrement, chaque plaque contenait un puits témoin dont la négativité nous a conforté dans le bon déroulement de la réalisation de la manipulation. Deuxièmement, nous avons réalisé des triplicatas pour chaque échantillon analysé dont les résultats étaient superposables. Troisièmement, les runs de qPCR ont été répétées pour l'analyse de nos extraits d'ADN, notamment pour les tissus provenant de patients avec une sérologie CMV négative, et les résultats étaient identiques entre les 2 séries réalisées.

Nous apportons donc une fiabilité importante aux résultats de nos qPCR.

Concernant la dissection, il est difficile de réaliser une mesure d'une potentielle contamination. Les 28 premières cornées ont été disséquées dans l'ordre, à la suite, le même jour, avec les mêmes instruments qui étaient désinfectés à l'alcool à 70°(48) entre chaque greffon. Si la contamination s'est faite à cette étape, nos résultats devraient montrer un nombre de copies de CMV importants dans une cornée x contenant le virus puis un nombre de copies progressivement décroissant dans les cornées $x+1$, $x+2$... Ce qui ne correspond pas à nos observations.

Par ailleurs, les 30 cornées suivantes ont été réceptionnées et disséquées par séries de 5. Sachant que nos qPCR ont retrouvé du CMV dans la plupart des différentes couches de toutes ces cornées, il aurait fallu que chaque première cornée de chaque série contienne réellement le virus pour pouvoir contaminer les suivantes lors de l'étape de dissection, ce qui apparaît également peu probable.

La source potentielle de contamination peut également provenir de l'environnement malgré les précautions appliquées : instruments mal nettoyés, tubes Eppendorf ou boîte de Pétri stérilisés, surface de la paillasse souillée ou encore air de la pièce contaminé par des particules volatiles.

L'étape d'extraction peut également être source de contamination. Les extractions ont été réalisées en série de 8 à 12 échantillons de couche cellulaire identique. Aucune suite logique n'a pu être observée lorsque l'on analyse les prélèvements positifs. L'absence de témoin sur ces séries d'extraction en kit manuel ne nous aide pas à remonter la piste des contaminations. Cependant, nous avons réalisé ultérieurement des extractions d'ADN sur de l'eau PPI en

utilisant les mêmes produits que ceux choisis pour les premières extractions et conduit des qPCR sur ceux-ci avec témoins afin de vérifier leur absence de contamination par le CMV. Les résultats étant revenus négatifs, il apparaît que nous n'avons pas contaminé nos tissus avec ces produits.

Les différences de méthodes entre nos deux groupes reposent sur l'utilisation d'un matériel stérile remplacé entre chaque greffon, d'un nouveau kit d'extraction neuf mais également sur un lieu de travail différent dans une pièce d'extraction dédiée sous PSM. Comme expliqué précédemment, nous ne pouvons écarter formellement l'hypothèse d'une contamination lors de la dissection par le biais des instruments utilisés mais cela nous semble peu probable. De même, les produits du kit d'extraction utilisés n'ont pas montré de trace de CMV.

Notre dernière hypothèse repose sur une possible contamination par l'environnement de travail qui est partagé par d'autres membres de l'unité de recherche travaillant sur le CMV et ce malgré une décontamination des surfaces selon le protocole du laboratoire.

Afin d'identifier la souche de CMV à l'origine de nos contaminations, il serait intéressant de séquencer les génomes de CMV retrouvés dans nos échantillons et de les comparer aux génomes des souches utilisées au laboratoire.

II.5.1.2. Analyse des résultats du second groupe

Aucune couche tissulaire d'aucune cornée n'a montré la présence de CMV dans notre second groupe de 17 cornées et ce quel que soit la couche tissulaire analysée. Ces résultats sont cohérents avec la littérature. Les études menées par Qu et al. et Kaye et al.(5,7) ont retrouvé du CMV dans 8 cornées sur 942 (extraction d'ADN réalisée sur les anneaux cornéens récupérés après trépanation des greffons transplantés avec le QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et détection par CMV Real-Time PCR Kit Z-OD-002-02, Liferiver Bio-Tech Corp., China)) et 0 cornée sur 89 (extraction d'ADN réalisée manuellement sur les cornées explantées et détection par PCR conventionnelle) respectivement, soit une prévalence de 0 à 0,85%. A l'inverse, Hsiao et al.(6) ont retrouvé une prévalence de CMV de 20% sur 30 anneaux cornéo-scléaux de greffons cornéens et de 27% sur 30 cornées explantées au cours de greffe (extraction d'ADN réalisée avec le QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et détection par PCR conventionnelle puis par real time PCR pour les résultats positifs). En calculant selon cette prévalence, nous aurions pu avoir entre 3 et 4 cornées positives dans notre second groupe.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'absence de prélèvements positifs au CMV.

D'une part, nous ne pouvons considérer uniquement les résultats de notre second groupe et donc d'une population d'étude de 17 greffons, ce qui reste une trop petite série pour pouvoir mettre en évidence un évènement assez rare.

D'autre part, les différentes études ayant retrouvé le CMV dans des cornées exemptes d'infection ont analysé des prélèvements cornéens de pleine épaisseur. Dans notre étude, la séparation des tissus peut avoir amené à une diminution de la quantité d'ADN détectable dans chaque échantillon. Notre qPCR pourrait ainsi manquer de sensibilité pour détecter un petit nombre de copies sur un fond complexe (tissu humain). Il serait intéressant de réaliser une nouvelle mesure de nos échantillons avec une technique de PCR digitale CMV, en cours de mise au point dans le laboratoire, qui permettrait de quantifier des cibles très peu abondantes sur fond complexe en améliorant la limite de détection du virus(49).

Il est toutefois rassurant de constater une faible prévalence du CMV dans les greffons cornéens.

Malgré les études ayant rapporté la présence de CMV dans des cornées(4,6–8), certaines hypothèses expliquent que ce tissu n'en soit pas un site de latence majeur. En effet, la cornée est avasculaire, or la dissémination du virus s'effectue en grande partie par voie hématogène(27). En dehors du limbe, la cornée est pauvre en cellules présentatrices d'antigènes, afin de protéger sa structure et sa transparence des conséquences délétères des processus inflammatoires(50). Ce « privilège immunitaire cornéen » est un argument supplémentaire pouvant expliquer la faible diffusion du CMV. Par ailleurs, les infections ou inflammations du segment antérieur liées au CMV ont souvent lieu, lors ou secondairement à des événements altérant les barrières oculaires et notamment endothéliale, tel qu'un traumatisme, une chirurgie intra-oculaire, des conditions inflammatoires... Ces antécédents étant des contre-indications au don de cornée, notre population d'étude en était exempte.

Dans les suites de greffe de cornée, le CMV est reconnu pour donner des endothélites(51) dont les manifestations peuvent ressembler à un rejet endothélial immunologique. Le traitement de ces deux entités est complètement différent. Le traitement immunosuppresseur local proposé après la greffe pourrait être à l'origine d'une réactivation virale et déclencher une endothélite à CMV(52). Cependant, la littérature est rassurante quant au risque de transmission du CMV par le biais de la greffe cornéenne(7,53,54). Des séroconversions ont cependant été rapportées sans apparition de manifestation clinique oculaire(54,55). En 2017, Cheung et al. rapportent ce qu'ils décrivent comme « le premier cas de maladie à CMV chez un patient séronégatif receveur d'une allogreffe kératolimnique d'un donneur présumé positif au CMV » après que le patient ait présenté un épisode pseudo-grippal 5 semaines après la greffe avec une PCR sanguine positive à CMV(56). Néanmoins, la source de cette primo-infection reste difficilement identifiable avec certitude devant un statut sérologique pour le CMV du donneur inconnu, l'absence d'atteinte oculaire chez le patient dans les suites de la greffe, et la prise d'un traitement immunosuppresseur systémique (tacrolimus et mycophénolate mofétil), facteur de risque important de primo-infection à CMV(57,58). Le risque de transmission de CMV par l'intermédiaire d'une greffe de cornée semble ainsi assez hypothétique à l'inverse de la réactivation du CMV latent chez le patient greffé.

II.5.2. Discussion de la cellularité tissulaire

Notre qPCR multiplex nous a permis également de rechercher le gène de l'albumine humaine et ainsi d'estimer le nombre de cellules présentes dans les échantillons analysés. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude ayant mesuré la cellularité des différentes couches cornéennes séparément chez l'homme au moyen d'une qPCR.

En effet, les mesures de cellularité ne concernent habituellement que l'endothélium. Elles sont effectuées le plus souvent, soit lors du suivi de patients présentant des pathologies endothéliales comme la cornea guttata, soit au sein des banques de cornées afin de déterminer si le greffon est de suffisamment bonne qualité pour être greffé. Ces mesures, réalisées grâce à la microscopie spéculaire, permettent une analyse qualitative et quantitative de l'endothélium. Cependant, l'analyse par microscopie spéculaire reste très focale car une image couvre une surface d'environ 0,1mm²(59), et l'extrapolation de la cellularité ne permet pas d'avoir une analyse précise de l'ensemble de cette couche cellulaire, critère clé de la détermination de la qualité des greffons des donneurs.

De rares études se sont penchées sur les cellularités tissulaires cornéennes selon leur couche mais au moyen de la microscopie confocale in vivo(60,61). Cette méthode d'imagerie permet d'observer les différents composants des tissus cornéens à une échelle histologique, de la surface cornéenne jusqu'à l'endothélium. Pour cela, le microscope émet une lumière et récupère les rayons réfléchis par les tissus traversés. En éliminant une partie des rayons réfléchis, il est possible de focaliser l'image obtenue sur un « plan » défini qui correspond en réalité à une « coupe » de moins de 10 microns d'épaisseur sur une surface de plusieurs mm². En comptant le nombre de cellules visualisables sur cette coupe, on obtient une densité de cellule par mm² très précise. Pour estimer le nombre de cellules dans l'ensemble du tissu, il faut multiplier cette densité par le nombre de coupes réalisables dans l'épaisseur de ce tissu. Cependant, la densité cellulaire n'est pas la même selon la profondeur et la localisation centrale ou périphérique de la coupe cornéenne étudiée(62), ce qui rend l'estimation du nombre total de cellules moins fiable que notre mesure par qPCR.

Mustonen et al. ont réalisé une mesure de la densité cellulaire dans chaque couche cornéenne par microscopie confocale in vivo avec des coupes de 10µm(61). Leur étude ne donne pas le nombre total de cellules dans chaque couche tissulaire. Afin d'estimer celui-ci, nous avons considéré une cornée parfaitement circulaire de 10mm de diamètre, dont la surface serait de 79mm², une épaisseur d'épithélium de 50µm, un stroma de 450µm et un endothélium de l'épaisseur de la coupe. En multipliant la densité cellulaire du tissu par la surface cornéenne et le nombre de coupes réalisables dans la couche tissulaire, il est possible d'obtenir une estimation grossière du nombre total de cellule. Ils seraient ainsi de 13.10⁵ pour l'épithélium, 33.10⁵ pour le stroma et 2.10⁵ pour l'endothélium. Zheng et al. ont mené le même type d'étude mais avec une épaisseur de coupe de 3µm(60). En appliquant le même mode de calcul, on obtient un nombre de cellules de 50.10⁵ pour l'épithélium, 89.10⁵ pour le stroma et également 2.10⁵ pour l'endothélium.

Moller et al. ont publié une étude sur la densité cellulaire stromale par mesure d'ADN. Après avoir récupéré des greffons cornéens d'une banque de cornées, ils ont disséqué les couches afin de ne garder que le stroma et l'ont lyophilisé. Une extraction d'ADN a ensuite été réalisée sur ces stroma lyophilisés et les chercheurs ont mesuré une masse d'ADN par mL. En estimant une masse d'ADN cellulaire de 8,5 pg par cellule et une densité kératocytaire stromale de 129000 kératocytes par mg de tissu sec, ils ont estimé un nombre de kératocytes stromaux pour une cornée entière de 24.10⁵ (63).

Notre étude n'a pas évalué la densité cellulaire des tissus, ce qui nous prive de comparaison avec les études précédentes. Cependant, avec nos médianes de cellularité de 10,2.10⁵, 41,5.10⁵ et 1,3.10⁵ pour l'épithélium, le stroma et l'endothélium respectivement, nos résultats sont assez proches des estimations tirées de l'étude de Mustonen et al. Nous retrouvons une différence assez importante avec l'étude de Moller et al. mais leur détermination du nombre total de cellules n'a pas consisté en une mesure directe et repose également sur des estimations.

En comparaison aux études précédentes, nos estimations devraient se rapprocher des valeurs de cellularité réelles des différentes couches tissulaires. En effet dans notre étude, nous avons récupéré et analysé l'entièreté des différentes couches tissulaires. Notre mesure est la plus « directe ». Les résultats de la qPCR sont très reproductibles pour les quantités d'ADN analysés. L'estimation est obtenue en prenant en compte la présence des deux copies du gène de l'albumine dans chaque cellule humaine. Elle n'est donc pas dépendante de la qualité de l'image et des facteurs environnementaux tels que la température ou encore la disposition

de la cornée au moment de l'analyse. De plus, toutes nos analyses ont été réalisées en triplicata avec une reproductibilité des résultats pour chaque échantillon.

Notre méthode comporte cependant certaines limites. En effet, les dissections ont été réalisées sous loupe binoculaire et microscope opératoire sans réalisation d'un contrôle histologique garant d'une dissection complète. Concernant la cellularité endothéliale, il semble également plus judicieux de retenir la médiane des greffons « non disséqués » que la médiane de l'ensemble afin de se rapprocher des conditions de vraie vie soit un résultat de $1,5.10^5$ cellules.

L'étude de la cellularité pour chaque cornée permet de montrer la variabilité interindividuelle et nous rappelle que chaque cornée provient d'un donneur unique. Cependant l'analyse de cette variabilité peut être affinée en fonction de la couche cellulaire. Nous retenons un coefficient de variation élevé pour les épithéliums et les endothéliums et plus faible pour les stromas. Outre la différence de fragilité intrinsèque entre ces tissus, nous avons observé lors des dissections que certains épithéliums ne contenaient déjà plus beaucoup de strates cellulaires. Cela peut être expliqué par plusieurs phénomènes. Premièrement, les greffons sont récupérés sur des patients décédés. Si les paupières sont mal fermées avant que le prélèvement cornéen ne soit effectué, les couches superficielles de l'épithélium peuvent s'altérer. Deuxièmement, le temps passé dans le liquide de conservation doit également jouer un rôle sur le maintien d'une bonne intégrité tissulaire. Il est probable que les greffons déclassés obtenus aient présenté des durées de conservation supérieures aux greffons utilisés à des fins thérapeutiques et donc subit une légère détérioration des tissus les plus fragiles. Cette donnée n'était pas disponible pour la plupart de nos greffons. Par ailleurs, les 28 premières cornées récupérées suites au Wetlab ont été sorties des banques le vendredi et leur dissection n'a pu être réalisée que le lundi soir à la fin du congrès. La variabilité observée pour les endothéliums est en grande partie liée à leur manipulation comme expliqué précédemment.

La variabilité des cellularités selon l'origine des greffons est majoritairement expliquée par l'utilisation des tissus lors du Wetlab ainsi que le temps passé entre la sortie du greffon de sa banque et son utilisation. Nous retrouvons en effet une meilleure cellularité pour les greffons provenant de la banque de Bordeaux (la banque référente pour le CHU de Limoges) qui ont tous été disséqués le jour de leur réception. Cela nous permet d'insister sur l'importance de la coopération entre le centre de soins greffeur et sa banque de tissu locale afin d'optimiser la conservation et le transport des greffons et permettre ainsi d'améliorer les résultats thérapeutiques pour nos patients.

Conclusion

Le cytomégalovirus est bien connu des ophtalmologistes uvéitologues et cornéologues. Il peut en effet être responsable de nombreuses manifestations oculaires inflammatoires et rester latent dans certains des tissus de l'œil. Sa réactivation lors d'un contexte d'immunodépression locale telle qu'une endothélite dans les suites d'une greffe de cornée nous a poussé à le rechercher au sein des différentes couches cornéennes par qPCR. Notre étude n'est pas parvenue à démontrer si la latence du CMV est uniforme ou non dans les tissus cornéens mais de futures recherches pourraient nous apporter plus de précision. Bien qu'une majorité de la population soit séropositive au CMV, il semble que sa présence au sein des greffons cornéens reste rare et que le risque de transmission à un patient receveur soit quasi nul.

En parallèle, nos expériences nous auront permis d'estimer le nombre de cellules présentes dans l'épithélium, le stroma et l'endothélium de greffons cornéens humains après dissection, d'une manière plus précise que les précédentes études disponibles sur le sujet.

Références bibliographiques

1. Mushegian AR. Are There 10³¹ Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? *J Bacteriol.* 9 avr 2020;202(9):e00052-20.
2. Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol.* 31 mars 2020;10:130.
3. Rocher M, Duchesne M, Andouard D, Beral L, Labriffe M, Chainier D, et al. Cytomegalovirus detected by qPCR in iris and ciliary body of immunocompetent corneal donors. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 1 janv 2024;171:105636.
4. Jeng YT, Tsai CY, Kuo LL, Woung LC, Lin SY, Tsai IL. The presence and impact of herpes virus DNA in recipient cornea and aqueous humor on graft survival following penetrating keratoplasty. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi.* nov 2020;119(11):1650-7.
5. Kaye SB, Baker K, Bonshek R, Maseruka H, Grinfeld E, Tullo A, et al. Human herpesviruses in the cornea. *Br J Ophthalmol.* juin 2000;84(6):563-71.
6. Hsiao CH, Hwang YS, Chuang WY, Ma DHK, Yeh LK, Chen SY, et al. Prevalence and clinical consequences of cytomegalovirus DNA in the aqueous humour and corneal transplants. *Br J Ophthalmol.* 28 juin 2018;bjophthalmol-2018-312196.
7. Qu JH, Peng RM, Xiao GG, Qu HQ, Yu T, Zhang S, et al. The incidence and influence of the donor corneas positive for herpesviridae DNA in keratoplasty. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* déc 2020;258(12):2767-74.
8. Kaneko H, Higaki S, Fukuda M, Shimomura Y, Ishioka K, Fukushima E, et al. The quantitative detection of herpes simplex virus, varicella zoster virus, and cytomegalovirus DNAs in recipient corneal buttons. *Cornea.* déc 2010;29(12):1436-9.
9. Crescitelli F. Physiology of vision. *Annu Rev Physiol.* 1960;22:525-78.
10. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol.* févr 2018;66(2):190-4.
11. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res.* nov 2015;49:1-16.
12. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol.* 2000;44(5):415-25.
13. Abtahi MA, Beheshtnejad AH, Latifi G, Akbari-Kamrani M, Ghafarian S, Masoomi A, et al. Corneal Epithelial Thickness Mapping: A Major Review. *J Ophthalmol.* 2024;2024:6674747.
14. Merker HJ. Morphology of the basement membrane. *Microsc Res Tech.* 1 juin 1994;28(2):95-124.
15. Yam GHF, Riau AK, Funderburgh ML, Mehta JS, Jhanji V. Keratocyte biology. *Exp Eye Res.* juill 2020;196:108062.
16. de Oliveira RC, Wilson SE. Descemet's membrane development, structure, function and regeneration. *Exp Eye Res.* août 2020;197:108090.

17. Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. *Prog Retin Eye Res.* nov 2015;49:17-45.
18. Noske W, Fromm M, Levarlet B, Kreusel KM, Hirsch M. Tight junctions of the human corneal endothelium: morphological and electrophysiological features. *Ger J Ophthalmol.* août 1994;3(4-5):253-7.
19. Roizman B. Redefining virology. *Science.* 30 juin 2000;288(5475):2327-8.
20. Mhiri L, Arrouji Z, Slim A, Ben Redjeb S. [Detection of DNA human cytomegalovirus of a molecular methods: hybrid capture DNA CMV by immunocompromised]. *Tunis Med.* oct 2006;84(10):644-6.
21. Knox GE. Cytomegalovirus: import of sexual transmission. *Clin Obstet Gynecol.* mars 1983;26(1):173-7.
22. Noyola DE, Demmler GJ, Williamson WD, Griesser C, Sellers S, Llorente A, et al. Cytomegalovirus urinary excretion and long term outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. Congenital CMV Longitudinal Study Group. *Pediatr Infect Dis J.* juin 2000;19(6):505-10.
23. Boeckh M, Fries B, Nichols WG. Recent advances in the prevention of CMV infection and disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant.* juin 2004;8 Suppl 5:19-27.
24. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleeschauwer B, et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* mai 2019;29(3):e2034.
25. Antona D, Lepoutre A, Fonteneau L, Baudon C, Halftermeyer-Zhou F, LE Strat Y, et al. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in France in 2010. *Epidemiol Infect.* mai 2017;145(7):1471-8.
26. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol.* 2007;17(5):355-63.
27. Dioverti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiol Spectr.* août 2016;4(4).
28. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol.* janv 2015;235(2):288-97.
29. Larsson S, Söderberg-Nauclér C, Wang FZ, Möller E. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion (Paris).* mars 1998;38(3):271-8.
30. Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, Falagas ME. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virol J.* 27 mars 2008;5:47.
31. Kabani N, Ross SA. Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 5 mars 2020;221(Suppl 1):S9-14.
32. Mondaca R, Fica A, Delama I, Olivares F, Navarrete M. Cytomegalovirus infection in AIDS patients. An illustrative case series. *Rev Med Chil.* juin 2020;148(6):778-86.

33. Razonable RR. Cytomegalovirus in Solid Organ Transplant Recipients: Clinical Updates, Challenges and Future Directions. *Curr Pharm Des.* 2020;26(28):3497-506.
34. Carmichael A. Cytomegalovirus and the eye. *Eye Lond Engl.* févr 2012;26(2):237-40.
35. Chan NSW, Chee SP, Caspers L, Bodaghi B. Clinical Features of CMV-Associated Anterior Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2018;26(1):107-15.
36. Sun Y, Ji Y. A literature review on Fuchs uveitis syndrome: An update. *Surv Ophthalmol.* 2020;65(2):133-43.
37. Tajunisah I, Reddy SC, Tan LH. Acute retinal necrosis by cytomegalovirus in an immunocompetent adult: case report and review of the literature. *Int Ophthalmol.* avr 2009;29(2):85-90.
38. Delyfer MN, Rougier MB, Hubschman JP, Aouizérate F, Korobelnik JF. Cytomegalovirus retinitis following intravitreal injection of triamcinolone: report of two cases. *Acta Ophthalmol Scand.* sept 2007;85(6):681-3.
39. Jabs DA, Van Natta ML, Holland GN, Danis R, Studies of the Ocular Complications of AIDS Research Group. Cytomegalovirus Retinitis in Patients With Acquired Immunodeficiency Syndrome After Initiating Antiretroviral Therapy. *Am J Ophthalmol.* févr 2017;174:23-32.
40. Canene-Adams K. General PCR. *Methods Enzymol.* 2013;529:291-8.
41. Gurr S. PCR Protocols-A Guide to Methods and Applications. *Biochem Educ - BIOCHEM EDUC.* 1 janv 1991;19:45-45.
42. Landgraf A, Wolfes H. Taq polymerase (EC 2.7.7.7): with particular emphasis on its use in PCR protocols. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 1993;16:31-58.
43. Bustin SA, Mueller R, Nolan T. Parameters for Successful PCR Primer Design. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2020;2065:5-22.
44. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* oct 2000;25(2):169-93.
45. Masson E. EM-Consulte. [cité 7 févr 2024]. La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/131004/la-pcr-en-temps-reel-principe-et-application-en-i>
46. Jacquet C, Marschall M, Andouard D, El Hamel C, Chianea T, Tsogoeva SB, et al. A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising treatment profiles in experimental models for congenital HCMV infection in vitro and ex vivo. *Antiviral Res.* mars 2020;175:104700.
47. Oka N, Suzuki T, Inoue T, Kobayashi T, Ohashi Y. Polymorphisms in cytomegalovirus genotype in immunocompetent patients with corneal endotheliitis or iridocyclitis. *J Med Virol.* août 2015;87(8):1441-5.
48. Block SS. *Disinfection, Sterilization, and Preservation.* Lippincott Williams & Wilkins; 2001. 1448 p.

49. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors*. 20 avr 2018;18(4):1271.
50. Cursiefen C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy*. 2007;92:50-7.
51. Suzuki T, Hara Y, Uno T, Ohashi Y. DNA of cytomegalovirus detected by PCR in aqueous of patient with corneal endotheliitis after penetrating keratoplasty. *Cornea*. avr 2007;26(3):370-2.
52. Chee SP, Jap A, Ling ECW, Ti SE. Cytomegalovirus-positive corneal stromal edema with keratic precipitates after penetrating keratoplasty: a case-control study. *Cornea*. août 2013;32(8):1094-8.
53. Robert PY, Adenis JP, Denis F, Drouet M, Ranger-Rogez S. [Herpesviruses serologic survey of corneal allograft recipients]. *J Fr Ophtalmol*. mars 2006;29(3):259-63.
54. Maguire MG. Cytomegalovirus transmission and corneal transplantation. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960. juill 1988;106(7):877.
55. Holland EJ, Bennett SR, Brannian R, Osborne JC, Goeken JA, Krachmer JH. The risk of cytomegalovirus transmission by penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 15 avr 1988;105(4):357-60.
56. Cheung AY, Govil A, Friedstrom SR, Holland EJ. Probable Donor-Derived Cytomegalovirus Disease After Keratolimbal Allograft Transplantation. *Cornea*. août 2017;36(8):1006-8.
57. Orden AO, Chuluyan JC, Colombini AC, Barbera RF. Leflunomide use in a cytomegalovirus infection of a patient with dermatomyositis. *Rheumatol Int*. janv 2012;32(1):273-5.
58. Voet M, Calon T, Hendriks M, Schreuder R. Severe Complication of Thiopurine Treatment in a Young Woman with Crohn's Disease. *Eur J Case Rep Intern Med*. 29 mars 2021;8(3):002350.
59. Tavazzi S, Cozza F, Colciago S, Zeri F. Slit-lamp based assessment of peripheral versus central regions of the human corneal endothelium. *Contact Lens Anterior Eye J Br Contact Lens Assoc*. avr 2020;43(2):149-53.
60. Zheng T, Le Q, Hong J, Xu J. Comparison of human corneal cell density by age and corneal location: an in vivo confocal microscopy study. *BMC Ophthalmol*. 16 juill 2016;16:109.
61. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea*. sept 1998;17(5):485-92.
62. Berlau J, Becker HH, Stave J, Oriwol C, Guthoff RF. Depth and age-dependent distribution of keratocytes in healthy human corneas: a study using scanning-slit confocal microscopy in vivo. *J Cataract Refract Surg*. avr 2002;28(4):611-6.
63. Møller-Pedersen T, Ledet T, Ehlers N. The keratocyte density of human donor corneas. *Curr Eye Res*. févr 1994;13(2):163-9.

Serment d'Hippocrate

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

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

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

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

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

Recherche de CMV par qPCR dans les différentes couches tissulaires de greffons cornéens après dissection

Introduction : Le cytomégalovirus (CMV) est tenu responsable de nombreuses manifestations oculaires inflammatoires et possède la capacité de rester latent dans certains des tissus de l'œil. Sa réactivation lors d'un contexte d'immunosuppression locale telle qu'une endothélie dans les suites d'une greffe de cornée nous a poussé à le rechercher au sein des différentes couches cornéennes par qPCR. L'objectif principal de l'étude était de déterminer la localisation cornéenne dans laquelle le CMV pouvait rester latent. Les objectifs secondaires reposaient sur l'étude des cellularités tissulaires. **Matériels et méthode :** 75 greffons cornéens déclassés, provenant de la Banque Française des Yeux et des banques de cornées de Bordeaux et Rouen, ont été inclus dans notre étude. Après dissection des différentes couches tissulaires (épithélium, stroma et endothélium), une extraction d'ADN manuelle à l'aide du kit d'extraction DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Courtaboeuf, France) a permis de réaliser une qPCR multiplex CMV/albumine. **Résultats :** 62% des greffons provenaient de patients séropositifs au CMV. 75 greffons, séparés en deux groupes selon les conditions de manipulations utilisées, ont été analysés. Les résultats concernant la recherche du CMV dans le premier groupe ne sont pas interprétables, faussés par une contamination virale. Le CMV n'a été retrouvé dans aucun des greffons du second groupe. Concernant l'analyse tissulaire, un nombre médian de cellules de $10,2 \cdot 10^5$, $41,5 \cdot 10^5$ et $1,3 \cdot 10^5$ a été estimé par qPCR pour les épithéliums, stromas et endothéliums respectivement. La variation de cellularité par rapport au nombre moyen de cellules était plus importante pour les épithéliums et les endothéliums. **Conclusion :** La localisation exacte du CMV dans la cornée reste indéterminée et remet en cause sa latence dans un tissu cornéen sain. Des études plus puissantes et/ou plus sensibles permettraient de répondre à cette question afin d'améliorer la compréhension du cycle latence/réactivation du CMV dans les tissus du segment antérieur de l'œil.

Mots-clés : cytomégalovirus, qPCR, greffons cornéens, cellularité cornéenne

CMV detection by qPCR in the different tissue layers of corneal grafts after dissection

Introduction : Cytomegalovirus (CMV) is implicated in numerous ocular inflammatory manifestations and has the capacity to remain latent within some eye tissues. Its reactivation in a context of local immunosuppression such as endotheliitis following corneal transplant prompted us to investigate its presence within the various corneal layers using qPCR. The primary objective of the study was to determine the corneal localisation where CMV could remain latent. Secondary objectives were focused on tissue cellularity. **Materials and methods :** 75 discarded corneal grafts, coming from the French Eye Bank and the corneal banks of Bordeaux and Rouen, were included in our study. Following dissection of the different tissue layers (epithelium, stroma and endothelium), manual DNA extraction using the DNeasy® Blood & Tissue extraction kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) enabled multiplex CMV/albumin qPCR. **Results :** 62% of grafts were from CMV seropositive patients. 75 grafts, divided into two groups based on manipulation conditions, were analyzed. Results regarding CMV detection in the first group were inconclusive, confounded by viral contamination. CMV was not detected in any grafts of the second group. Regarding tissue analysis, a median cell count of 10.2×10^5 , 41.5×10^5 and 1.3×10^5 cells was estimated per qPCR for epithelia, stroma and endothelia respectively. Cellularity variation relative to mean cell count was more pronounced for epithelia and endothelia. **Conclusion :** The exact localization of CMV within the cornea remains undetermined, challenging its latency within healthy corneal tissue. More robust and/or sensitive studies would address this question, enhancing understanding of the CMV latency/reactivation cycle in tissues of the anterior segment of the eye.

Keywords : cytomegalovirus, qPCR, corneal grafts, corneal cellularity

