

Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 9 octobre 2020

Par **Caroline BENET**

Né(e) le 8 novembre 1993 à PERPIGNAN

Intérêt du test QuantiFERON™ CMV dans la prédiction de l'évolution de la charge virale chez des patients transplantés non répondeurs au traitement antiviral

Thèse dirigée par Sébastien HANTZ

Examineurs :

Mme. Sylvie Rogez, Professeur des Universités, Bactériologie-Virologie, faculté de Pharmacie

Mme. Sophie Alain, Professeur des Universités, Bactériologie-Virologie, faculté de Médecine

Mme. Jasmine Chauzeix, Maître de Conférences, Hématologie Biologique, faculté de Pharmacie

M. Daniel Ajzenberg, Professeur des Universités, Parasitologie-Mycologie, faculté de Médecine

M. Sébastien Hantz, Professeur des Universités, Bactériologie-Virologie, faculté de Médecine



Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 9 octobre 2020

Par **Caroline BENET**

Né(e) le 8 novembre 1993 à PERPIGNAN

Intérêt du test QuantiFERON™ CMV dans la prédiction de l'évolution de la charge virale chez des patients transplantés non répondeurs au traitement antiviral

Thèse dirigée par Sébastien HANTZ

Examineurs :

Mme. Sylvie Rogez, Professeur des Universités, Bactériologie-Virologie, faculté de Pharmacie

Mme. Sophie Alain, Professeur des Universités, Bactériologie-Virologie, faculté de Médecine

M. Jasmine Chauzeix, Maître de Conférences, Hématologie Biologique, faculté de Pharmacie

M. Daniel Ajzenberg, Professeur des Universités, Parasitologie-Mycoologie, faculté de Médecine

M. Sébastien Hantz, Professeur des Universités, Bactériologie-Virologie, faculté de Médecine



Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2019

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HÉMATOLOGIE
JOST Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BÉGAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTRÔLE DU MÉDICAMENT

BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE
CLÉDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FABRE Gabin	SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET INGÉNIERIE APPLIQUÉE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LAVERDET Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD-MATHIEU Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATÉRIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BOUDOT Clotilde

MICROBIOLOGIE
(du 01/09/2018 au 31/08/2020)

MARCHAND Guillaume

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
(du 01/09/2019 au 31/08/2020)

PROFESSEURS EMERITES :

DREYFUSS Gilles (jusqu'au 31/03/2020)

A ma jolie et brillante mamie Marie-Louise Bénet, qui ne m'a jamais vraiment quittée.

Remerciements

Au président du jury de Thèse

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ
Professeur des universités Virologie-Bactériologie
Virologue
CHU de Limoges

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de ma thèse. Merci également pour votre implication, vos conseils, vos enseignements et votre bienveillance en tant que responsable de DES, mais aussi en tant que Biologiste sénior, nos entretiens ont toujours été d'une extrême aide pour moi. J'espère par ce travail, vous témoigner ma gratitude.

Aux membres du Jury

Madame le Professeur Sophie ALAIN
Professeur des universités Virologie-Bactériologie
Virologue
CHU de Limoges

Merci de m'avoir accompagnée durant tout ce travail que ce soit durant le recueil de données mais aussi dans l'analyse, malgré votre emploi du temps chargé et la crise sanitaire qui touche de plein fouet le laboratoire. Plus largement merci pour votre expertise au quotidien et pour votre gentillesse.

Monsieur le Professeur Daniel AJZENBERG
Professeur des universités Parasitologie-Mycologie Médicale
Parasitologue, mycologue
CHU de Limoges

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je garde un souvenir heureux de mon semestre au sein de ton service, merci pour tous ces enseignements de qualité, pour ta pédagogie que je trouve efficace et moderne et pour toute la bienveillance dont tu as fait preuve à mon égard.

Madame le Docteur Jasmine CHAUZEIX
Maître de conférences Hématologie Biologique
Hématologue
CHU de Limoges

Merci de faire partie de mon jury, merci également pour les enseignements reçus en hémostase et pour toute votre aide et votre patience pour la validation de la routine au cours de mon semestre en Hématologie.

A mon directeur de Thèse

Monsieur le Professeur Sébastien HANTZ
Professeur des Universités Virologie-Bactériologie
Virologue
CHU de Limoges

Merci d'avoir accepté de travailler avec moi pour rédiger ma thèse. Merci également pour ton aide et ta disponibilité durant toute l'élaboration de ce travail. Je sais que ça n'a pas été simple de dégager du temps pour ma thèse dans le contexte actuel mais tu l'as fait et toujours de bon cœur. Merci pour tout ce que tu m'as appris en virologie et pour ta bonne humeur.

Aux membres du service de BVH

Merci au Professeur Marie-Cécile PLOY, pour son accueil au sein de son service, son implication dans la formation des internes et pour sa bienveillance depuis mon tout premier semestre.

Merci à tous les Biologistes, le Docteur Christian MARTIN, le Docteur Olivier BARRAUD, le Docteur Fabien GARNIER, le Docteur Nadia HIDRI, le Docteur Jérôme DARREYE, le Docteur Nathalie PESTOURIE, le Docteur Elodie COUVE-DEACON et le Docteur Camille BATAILLE, pour leur patience en paillasse et leurs enseignements d'une très grande qualité. Le fait d'avoir travaillé avec vous y est pour beaucoup dans mon envie de spécialisation en Agents Infectieux. Merci à tous les techniciens et secrétaires avec lesquels j'ai tissé des liens depuis ces trois années. Vous m'avez vue évoluer non sans peine mais vous m'avez toujours soutenue. Je ne pourrais pas tous vous citer mais merci à tout le monde !

Aux membres du CNR

Merci pour votre accueil et votre aide durant le recueil de données et merci à Mathieu d'avoir accepté que je le suive dans la technique !

Au personnel du Centre de prélèvements

Que d'émotions durant ces trois années ! Des fous rires, des coups de stress, de la fatigue mais toujours de la bonne humeur.

Merci à Sandra, Sandrine, Valérie, Myriam, Laurence et Stéphane !

A ma famille et à mes proches

Muchas gracias a mis abuelos, Maria del Carmen y Pablo TOLEDANO et à mes grands-parents Jean-Joseph et Marie-Louise BENET, qui ont sacrifié beaucoup de choses pour nous donner l'opportunité d'avoir une vie meilleure.

Merci à mes parents.

A mon papa, qui depuis le début n'a jamais cessé de me soutenir moralement dès que j'avais des doutes. Je me souviens qu'en primaire tu m'avais fait signer un contrat dans lequel je m'engageais à ne plus jamais avoir 7/20 en maths de ma vie, bon j'ai fait pire depuis mais j'espère que cette thèse compensera 😊 !

A ma maman, qui avec beaucoup de douceur et de bienveillance m'a toujours soutenue tout en me faisant comprendre que j'avais le droit de me tromper et de changer d'avis.

Merci pour leur amour, leur bienveillance, leur soutien durant toutes ces années (pour les SMS de papa et les appels de Maman) et pour toutes les valeurs qu'ils m'ont transmises. Je serais où sans vous ?

Merci à mon grand-frère frère Jean-Baptiste, qui m'a toujours protégée et soutenue que ce soit en cours de récréation ou en boîte de nuit (je me souviens de cette soirée en première année où tu m'as vue au fond du gouffre et que tu m'as emmenée danser au Playa pour me changer les idées : merci !).

Merci à mon petit frère Guillem qui est devenu un homme sans que je m'en rende compte et qui m'a toujours soutenue et fait beaucoup rire (tout seul chez Hyper Burger).

Merci à mes cousins, Alex et ces soirées Limougeaudes improbables, Clément, Maxime et ces étés de folie dans les Fenouillèdes (Le Vivier 66 RPZ), Laura, Lucas, Julie, Nico, mes oncles et tantes, pour leur bienveillance.

Merci à mon grand-oncle, le Professeur Jean-Claude BENET, qui n'a pas hésité à me faire venir dans son laboratoire quand j'ai passé ma première année à Montpellier pour m'expliquer la thermo dynamique et les équations de Maxwell (ma super note en Physique c'est grâce à toi).

Merci à mes deux Amours : Lola et Antonin.

Plus de vingt ans que nous grandissons ensemble, notre amitié est pour moi l'une des choses les plus précieuses (Théza forever). Je n'ai pas osé placer volontairement une erreur de frappe dans ce manuscrit mais je trouve cette idée très drôle et même dix ans après ça me fait toujours aussi rire (Charlies de Gaulle ♥).

A ma Sarah d'amour, que je connais depuis toute petite et qui m'a fait me sentir comme chez moi dès mes premiers instants à Limoges. Je te dois tellement.

A ma coloc pour toujours, Agathe (et à nos deux ans de vie commune merveilleux). Merci pour tout.

Merci à Laura pour tous nos souvenirs (du premier cours de Latin jusqu'à l'oral de TPE : 9 mois à délirer sur le putamen, comment on a fait pour pas éclater de rire le jour de l'oral ??).

Merci à Anne-Laure alias Tatie Guens, cette première année de lycée nous a liées pour toujours (hâte de te voir organiser mon mariage à coups de talkie-walkie et de grands moments d'indignation : PARDON ?!).

Merci à Margaux autre membre incontestable de la conversation des Bridgettes : quand ça va pas pendant mes journées, vos bêtises me font tellement de bien.

Merci à mes deux amies de première année, Carlos et Bernie je repense à toutes ces férias, à quand la prochaine ? (RDV à Optic 3200).

A Juju et à cet été de folie à Argelès où tu faisais la poussière avec des lingettes Saforelle. A ma Pharmily, ces années de fac avec vous étaient incroyables : Camillou (do you remember la chimie ana.. ?), Barru et Yann (je reviens quand manger chez vous devant Game of Thrones ??), Thomas Bou et ses imitations (Vouala le macrophage), Kirikou (et à nos 8h30-23h full BU), Cabanou (jamais je n'oublierais cette matinée où tu m'as remotivée), Romain (Chafaie Tomber), Tutu et ses jolies robes, Blum (c'est les Alpes ou les Pyrénées ?), Méganou (il était parfait, il faisait du latin !), ma Binonome et nos TP catastrophiques (quand on devait obtenir une poudre fine et blanche et que finalement on obtenait une pâte jaune et gluante !), à Benou et ses performances qui frisent le niveau professionnel au Trivial Pursuite.

A mes copains d'internat qui m'ont vue dans tous mes états.

Merci à Léa qui a fait et qui fait tellement de choses pour moi que je ne saurais les énumérer (j'ai bien monté mon pourcentage cette année sur impôts.gouv promis !). Merci à Chacha et à sa bonne humeur permanente depuis que je l'ai connue interne en Parasito (toujours un pichet à la main en soirée pour servir tout le monde #jeunessedorée). Merci à mon Soso, rencontrée le premier jour de mon premier stage dans l'ascenseur et à nos appels téléphoniques, à Florence (dédicace au Pink Flam's) et Malika pour ce semestre un peu surréaliste du Corona. A Sarah pour ces fous rires, ces crises de paniques et notre collaboration dans la gestion de l'AIPHL (toi c'est la tête, moi c'est les chèques), à Cassandra pour sa douceur et sa gentillesse, au Docteur Le Retour Faudel aka Wasfi (un jour je saurais qui était cette fille en léopard à la soirée mousse), à Nico pour toutes ces fois où on a voulu tout plaquer pour aller élever des moutons dans le Larzac (ohé c'est la m*rde), à Etienne qui a toujours dans sa poche une photo horrible à me montrer et qui est capable de tenir toute une conversation avec un accent russe au téléphone pour le plaisir, à Guigui pour tous ces semestres où pendant que moi je m'agitais de désespoir dans toute la pièce tu restais impassible à rire de mes bêtises. A Sarah, Fifamé et Nolwenn : vous êtes géniales (ça resserre les liens les pandémies !), merci à Victor et Maxime pour leur bonne humeur, Marwan le meilleur VP soirée de toute l'histoire de l'AIPHL. Alex (nos gardes ensemble sont les meilleures), Ali pour ton aide au tutorat, Alice et Valentin (bon courage pour la suite de la présidence vous gérez !), Robin et son sourire constant, Docteur de Lafontaine et son autodérision géniale, Benjamin, Saoussane, Rémy, Mouaffak, Théo et Seb (je sais pourquoi je n'arrive pas à vous dissocier : vous devriez vous marier). Merci à Camillou Villesuzanne (c'est quand qu'on se refait un café Oz ??), Alex ton coloc d'enfer et Juju (bon courage pour l'assistantat à La Réunion !). Et puis les plus vieux (pas tant que ça quand même !) Sylvain, Yoyo, Marc, Mylène, Marie-Fleur, Virginie, Martial et Marine qui m'ont accompagnée pendant ces semestres.

Merci à Josette et Jean-Luc RUAUD pour leur accueil chaleureux dans leur maison et pour leur soutien.

Et merci à mon amoureux Rémi, qui est à bord des montagnes russes de mes émotions côté passager. Quand je serais grande, j'aimerais avoir le même self control que toi.

PS : Je sais que tu voulais que j'écrive juste un « merci Rémi » alors je me suis canalisée (un peu).

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/>



Table des matières

Table des Abréviations	18
Introduction	19
I.1. Le Cytomégalovirus	19
I.1.1. Histoire	19
I.1.2. Structure.....	21
I.1.3. Cycle de réplication	22
I.2. Réponse immunitaire	23
I.2.1. Réponse innée	23
I.2.2. Réponse acquise.....	24
I.2.3. Échappement immunitaire	24
I.3. Mode de transmission et clinique	24
I.3.1. Mode de transmission	24
I.3.2. Infection chez l'immunocompétent.....	25
I.3.3. Infections congénitales	25
I.3.4. Infection chez l'immunodéprimé	26
I.4. Epidémiologie	27
I.4.1. Population générale.....	27
I.4.2. Infections congénitales	28
I.4.3. Patients Transplantés	29
I.5. Diagnostic au laboratoire	29
I.5.1. Le sérodiagnostic	29
I.5.1.1. Principe.....	29
I.5.1.2. Spécificité d'isotype : IgM/IgG	31
I.5.2. Le test d'avidité	32
I.5.3. Détection qualitative ou quantitative de l'ADN génomique.....	33
I.5.4. La culture cellulaire.....	34
I.6. Traitement.....	35
I.6.1. Molécules actuellement disponibles	35
I.6.1.1. Molécules ciblant l'ADN polymérase	35
I.6.1.1.1. Ganciclovir.....	35
I.6.1.1.2. Valganciclovir	36
I.6.1.1.3. Valaciclovir	36
I.6.1.1.4. Foscarnet	36
I.6.1.1.5. Cidofovir	36
I.6.1.2. Molécule ciblant la protéine kinase.....	36
I.6.1.2.1. Maribavir.....	36
I.6.1.3. Perspectives thérapeutiques	37
I.6.1.3.1. Molécule inhibant le complexe terminase : Letermovir.....	37
I.6.1.3.2. Molécule ciblant l'ADN polymérase : Brincidofovir	37
I.6.2. Stratégie Thérapeutique chez les Immunodéprimés	37
I.6.2.1. Stratégies préventive et préemptive	37
I.6.2.2. Stratégie curative	38
I.6.2.3. Stratégie de restauration d'une réponse immunitaire	39
I.7. Non-réponse au traitement	40
I.7.1. Définition	40

I.7.2. Résistance	40
I.7.2.1. Approche phénotypique	40
I.7.2.2. Approche génotypique	41
I.7.2.3. Gènes concernés et mutations associées	42
I.8. Rôle de la surveillance immunologique	46
I.8.1. Test QuantiFERON™ QIAGEN®	47
I.8.2. ELIspot	49
I.8.3. ICS	49
I.8.4. Tests basés sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)	50
I.8.5. Numération des lymphocytes et tests d'immunité non spécifique	50
I.8.6. Valeur clinique du test QuantiFERON™	50
II. Partie 2 : Etude rétrospective	52
II.1. Introduction à l'étude	52
II.2. Matériels et Méthodes	53
II.2.1. Recrutement population et définitions des termes	53
II.2.2. Recherche de résistance	54
II.2.3. Test immunologique	54
II.2.4. Test statistiques	54
II.2.5. Charge virale	55
II.3. Résultats	55
II.3.1. Analyse descriptive de la population	55
II.3.2. Description des mutations retrouvées chez les résistantes	55
II.3.3. Caractérisation des populations	56
II.3.3.1. Analyse de la population globale (résistants versus réfractaires)	56
II.3.3.2. Analyse de la sous-population des greffés rénaux (Résistants versus Réfractaires)	59
II.3.4. Evaluation des performances prédictives du test QuantiFERON™ CMV sur l'évolution de la virémie à 3/6	61
II.4. Discussion	64
II.4.1. Description des effectifs	64
II.4.1.1. Population globale	64
II.4.1.2. Greffés rénaux	65
II.4.2. Comparaison des capacités de prédiction du QuantiFERON CMV	66
II.4.2.1. Résistant versus Réfractaire	66
II.4.2.2. Greffés rénaux versus autres types de greffe	67
II.5. Conclusion	67
Conclusion générale	69
Références bibliographiques	71
Serment De Galien	84

Table des illustrations

Figure 1. Cellules protozoaire-like vues dans les reins, les poumons et le foie d'un fœtus luétique de 8 mois par Jesionek and Kiolomenglou (1904), permission de Münchener Medizinische Wochenschrift (2).....	21
Figure 2. Comparaison schématique des organisations génomes des herpesvirus humains (5).....	21
Figure 3. Structure CMV (6).....	22
Figure 4. Cycle de répllication du CMV dans une cellule (5).....	23
Figure 5 Image de lymphocytes activés (15)	25
Figure 6 Transmission materno-fœtale du CMV (14).....	26
Figure 7 Séroprévalence au CMV des femmes en âge de procréer (12 à 49 ans) à travers le monde avec le pourcentage d'infections materno-foetales associées (27)	29
Figure 8 Principe de l'agglutination passive.....	30
Figure 9 Principe de l'ELISA indirect	31
Figure 10 Cinétique IgM et IgG.....	32
Figure 11 Principe de la PCR (35).....	34
Figure 12 Effet cytopathogène du CMV (36).....	35
Figure 13 Mutations retrouvées sur le gène <i>UL97</i> (51) avec les plus fréquentes en gras	43
Figure 14 Mutations retrouvées sur le gène <i>UL54</i> (51) Nous pouvons remarquer ici que les mutations confèrent, dans la majeure partie des cas, à la souche des résistances croisées (à 2 voir 3 antiviraux).	44
Figure 15 Mutations retrouvées sur le gène <i>UL56</i> (51).....	45
Figure 16 Recommandations proposées lors d'une suspicion de résistance (48)	46
Figure 17 Représentation schématique du test QuantiFERON™ (58)	49
Figure 18 Design de l'étude.....	55
Figure 19 Répartition des résistances retrouvées dans le groupe "Résistants".....	56
Figure 20 Distribution des valeurs des réponses Antigène et Mitogène Résistants (RS) versus Réfractaires (Rf).....	58
Figure 21 Distribution des valeurs des réponses Antigène et Mitogène chez les greffés rénaux, Résistant versus Réfractaire.....	61
Figure 22 Evolution des VPP et VPN chez les Résistants (Rs) et les Réfractaires (Rf)	62
Figure 23 Evolution des VPP et VPN en fonction du type de greffe Rs : résistant, Rf : réfractaire.....	64

Table des tableaux

Tableau 1 Distribution de la séroprévalence du CMV chez des patients donateurs de sang au niveau mondial (23)	28
Tableau 2 Différentes situations du sérodiagnostic avec proposition d'analyses supplémentaires	33
Tableau 3 Comparaison de la stratégie prophylactique versus préemptive (48)	38
Tableau 4 Traitements antiviraux actuellement disponibles pour la prise en charge des infections sévères à cytomégalovirus (CMV) (39).....	39
Tableau 5 Comparaison des tests immunologiques développés (48)	47
Tableau 6 Principe d'interprétation des résultats du QuantiFERON™ CMV (57).....	48
Tableau 7 Détail de l'ensemble des mutations retrouvées dans le groupe "Résistants" * : <i>bas niveau de résistance surmontée par une augmentation de Ganciclovir, résistance au GCV (ganciclovir), résistance au MBV (maribavir), résistance au FOS (foscarnet), résistance au GCV FOS et CDV (cidofovir), résistance au GCV CDV</i>	56
Tableau 8 Résultats des paramètres comparés groupe résistants vs groupe réfractaires (RR : recherche résistance) (1) 8 Valeurs manquantes, (2) 10 Valeurs manquantes, (3) 4 Valeurs manquantes, (4) 6 Valeurs manquantes, * différence statistique	57
Tableau 9 Résultats Test QuantiFERON™ des deux groupes.....	59
Tableau 10 Valeurs moyennes des paramètres observés chez les greffés rénaux * différence significative.....	60
Tableau 11 Répartition des statuts sérologiques des greffés rénaux.....	60
Tableau 12 Comparaison des VPP et VPN en population globale	61
Tableau 13 Résultats complémentaires : VPP et VPN à trois et six mois Résistant versus Réfractaires sans les Mitogènes non répondeurs	63
Tableau 14 Analyse des VPP et VPN avec et sans greffe rénale	63

Table des Abréviations

HCMV : Human cytomegalovirus
HHV: Human herpes virus
CMV : Cytomégalovirus
PNN : Polynucléaire neutrophile
VZV : Varicelle-Zona-virus
HSV : Herpes simplex virus
CID : Cytomegalovirus infection disease
ADN : Acide désoxyribonucléique
EBV : Epstein Barr virus
UL : Unique long
TLR : Toll like receptor
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
RCIU : Retard de croissance *in utero*
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
Ig : Immunoglobuline
PCR : Polymerase chaine reaction
ELISA : Enzyme linked immuno sorbent assay
DO : Densité optique
Ct : Cycle threshold
CSH : Cellules souches hématopoïétiques
CI : Concentration inhibitrice
LCR : Liquide céphalo-rachidien
IFN : Interféron
ICS : Coloration intracellulaire des cytokines
CNR : Centre national de référence
CHU : Centre hospitalo-universitaire
GCV : Ganciclovir
MBV : Maribavir
FOS : Foscarnet
CDV : Cidofovir
VPP : Valeur prédictive positive
VPN : Valeur prédictive négative
Ag : Antigène
Mit : Mitogène
RS : Résistant
RF : Réfractaire
QTF : QuantiFERON™
D : Donneur
R : Receveur
RR : Recherche de résistance
MMF : Mycophénolate de Mofétil

Introduction

Le cytomégalovirus Humain (HCMV) ou Herpes Virus Humain 5 (HHV5), est un virus ubiquitaire issu de la famille des *Herpesviridae*. Il fait partie avec les herpèsvirus 6 et 7 de la sous famille des *Betaherpesvirinae*. Cette famille de virus est connue pour sa capacité à persister sous forme latente secondairement à une primo-infection chez un hôte.

Chez l'immunocompétent, une primo-infection est fréquemment asymptomatique. En revanche elle peut s'avérer fortement délétère pour les fœtus en cas d'infection congénitale et pour les patients immunodéprimés.

Ce travail porte sur l'infection à CMV chez les patients greffés. En effet les lignes de traitement anti-rejet ont pour but de diminuer leur immunocompétence ce qui favorise fortement la survenue d'infections opportunistes. Le CMV reste l'infection virale causant le plus de mortalité et morbidité au sein de cette population, ce qui a amené au fil des années à mettre en place des stratégies de prévention, de surveillance et de traitements. La prévention repose sur l'utilisation d'antiviraux sur une longue durée favorisant l'émergence de souches virales mutées capables de résister à cette pression pharmacologique. Mais la non réponse au traitement peut également avoir des causes pharmacologiques (sous-dosage) ou immunologiques. A ce jour, de nombreux travaux ont cherché à déterminer la place de la réponse immune dans les échecs thérapeutiques. Divers outils ont été développés pour évaluer la qualité de la réponse immune cellulaire dirigée contre le CMV. Dans ce contexte, nous avons choisi d'évaluer la capacité prédictive du test QuantiFERON™ CMV vis à vis de l'évolution de l'infection à CMV chez des patients immunodéprimés non répondeurs au traitement antiviral.

Cette étude a eu pour but de déterminer l'intérêt de la prédiction de l'évolution de la charge virale du CMV via un test immunologique, le test QuantiFERON™ CMV, chez des patients immunodéprimés non répondeurs à un traitement antiviral. Et de mettre en évidence ou non, une différence d'efficacité entre une population porteuse d'une souche CMV résistante et une population non porteuse.

I.1. Le Cytomégalovirus

I.1.1. Histoire

C'est en 1881 que Ribbert décrit pour la première fois des cellules « protozoaire-like » au niveau des reins d'un enfant mort-né présumé luétique (1) (dystrophie secondaire à une Syphilis). Ces mêmes observations sont à nouveau décrites en 1904 par Jesionek et Kiolenoglou au niveau des poumons, des reins et du foie d'un fœtus lui aussi luétique (Fig. 1). La taille de ces cellules décrites variait entre 20 et 30µm de diamètre. Le noyau était large et excentré, il contenait un corps nucléaire central entouré d'une zone claire. En 1907, Löwenstein examine 30 enfants morts en bas âge et trouve chez 4 d'entre eux les mêmes inclusions au niveau des glandes parotidiennes. De nombreux parasitologues ont conclu en voyant ces différentes observations à des inclusions dues à un protozoaire : *coccidia sporozoa* ou bien à des amibes.

Pisano en 1910 réaffirme que ces inclusions sont en lien avec l'infection par l'agent de la syphilis (*Treponema pallidum*).

Smith et Weidman (1910, 1914) ont pu à nouveau observer les mêmes inclusions chez un enfant de deux mois, infecté par un « protozoaire amoebiforme » nommé *Entamoeba mortinatalium*. On pouvait distinguer autour des inclusions une forte réaction inflammatoire composée de lymphocytes (Lc) et de polynucléaires neutrophiles (PNN). Cliniquement l'enfant présentait des ulcères au niveau de la bouche, une peau squameuse, une fibrose du thymus et est décédé d'une pneumopathie décompensée. Ces complications étaient imputées à une syphilis mais le test de Wasserman négatif réfuta cette hypothèse.

En 1921, Goodpasture et Talbott produisent un cas clinique décrivant des inclusions intranucléaires éosinophiles dans les poumons, les reins et le foie d'un bébé de 6 semaines. Le manque d'abondance de telles cellules au niveau du foie et des reins avec l'absence de réaction inflammatoire locale a fait supposer par les auteurs que ces cellules s'étaient retrouvées secondairement dans ces organes via le flux sanguin. Ces larges cellules mononucléaires décrites dans plusieurs organes ont rappelé aux deux auteurs les mêmes cellules qui avaient été décrites par Tyzzer en 1906 dans le cadre d'une infection par le virus de la Varicelle-Zona (VZV). Ils ont donc réfuté l'hypothèse d'un protozoaire responsable et nommèrent la présence de telles cellules dans les organes la « cytomégalie ».

Ce n'est qu'en 1925, que Von Glahn et Pappenheimer décrivent pour la première fois chez un adulte, un homme décédé de 36 ans, un abcès hépatique contenant des grandes cellules avec des imposantes inclusions intranucléaires. Des cellules similaires sont trouvées dans les intestins et les poumons. Les auteurs ont fait le lien entre leur découverte et celle de Lipschutz qui décrivait un type de cellule similaire retrouvé dans des lésions causées par l'herpès virus (HSV) chez des lapins et chez l'Homme. Il avait étudié ces inclusions et avait conclu qu'elles étaient l'expression d'une infection intracellulaire du virus. Avec ces conclusions, Von Glahn et Pappenheimer affirment eux aussi que cette cytomégalie est secondaire à une infection par un virus proche de l'HSV.

C'est Wyatt en 1952 qui suggère le terme « Maladie d'inclusions cytomégaliqes généralisée » pour décrire cette infection létale. Il soumet aussi l'hypothèse qu'à partir du moment où ces cellules sont retrouvées au niveau des tubules rénaux, il est possible qu'elles soient également dans les urines.

Toujours en 1952, Fetterman recueille 0,5mL d'urine d'un prématuré de trois jours admis à l'Hôpital de Pittsburg pour ictère, purpura, hépatosplénomégalie et calcifications intracrâniennes. En introduisant l'urine dans une culture cellulaire, il obtient exactement les mêmes cellules cytomégaliqes. Pour la première fois, le diagnostic de CID (Cytomegalic Inclusion Disease) est posé en *ante mortem*.

En 1953, Minder examine les cellules du pancréas d'un bébé de 14 jours avec un microscope électronique. Des particules de 100nm sont vues au grossissement x25 000. De manière rétrospective, on peut supposer que c'est à ce moment-là que le cytomégalo virus a été vu pour la première fois (2) .

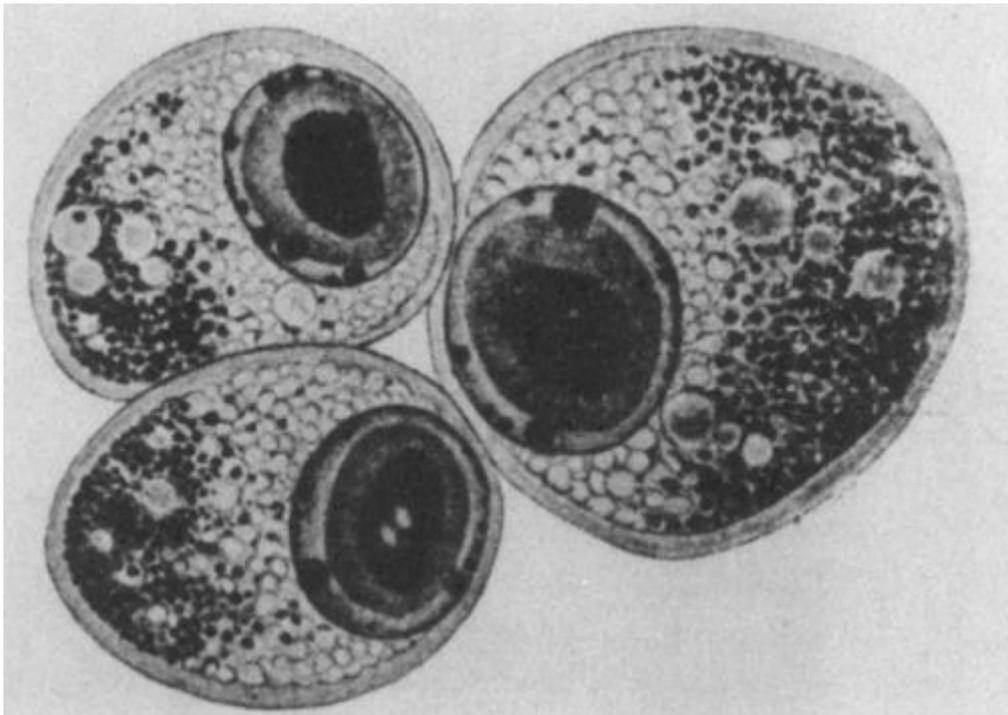


Figure 1. Cellules protozoaire-like vues dans les reins, les poumons et le foie d'un fœtus luétique de 8 mois par Jesionek and Kiolomenglou (1904), permission de Münchener Medizinische Wochenschrift (2).

I.1.2. Structure

Les herpès virus humains (herpès simplex virus, virus varicelle zona, Epstein Bar virus) ont des caractéristiques communes, notamment la structure virale. En effet ils sont tous composés d'un ADN double brin linéaire encapsulé par une capsidie icosaédrique. L'enveloppe qui est constituée d'une membrane à bicouche lipidique entoure cette capsidie, cet ensemble est appelé le virion. Le virion du CMV fait 150 à 200nm de diamètre. Son génome, composé de 165 gènes, fait de lui le plus grand des virus Herpes humains (Fig.2) (3). L'ADN viral des herpèsvirus excepté l'EBV est divisé en deux segments de séquences uniques (non répétées) une longue (UL) et une courte (US). Ces deux séquences sont unies par des séquences d'ADN répétées et inversées déjà présentes aux extrémités du génome (4).

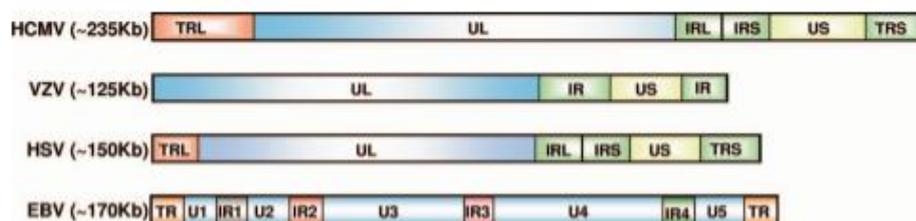


Figure 2. Comparaison schématique des organisations génomes des herpesvirus humains (5).

Le génome à ADN bicaténaire est protégé par une capsidie dont la forme est icosaédrique. Cette capsidie constituée de 162 capsomères est séparée de son enveloppe par une matrice protéique : le tégument (Fig.3). Même si l'enveloppe est recouverte de nombreuses glycoprotéines, c'est le tégument qui contient la majorité des protéines virales, avec comme protéine la plus abondante : la phosphoprotéine 65 (pp65) également appelée *UL83*. Certaines

de ces protéines jouent un rôle prépondérant dans les interactions avec le système immunitaire. Ces protéines tégumentaires vont être séparées en deux classes en fonction de leur rôle. Certaines vont avoir un rôle dans : la structure du virus, l'assemblage des virions et le désassemblage de la particule virale lors de son entrée dans une cellule hôte, d'autres de moduler la réponse immunitaire de l'hôte secondaire à l'infection (5).

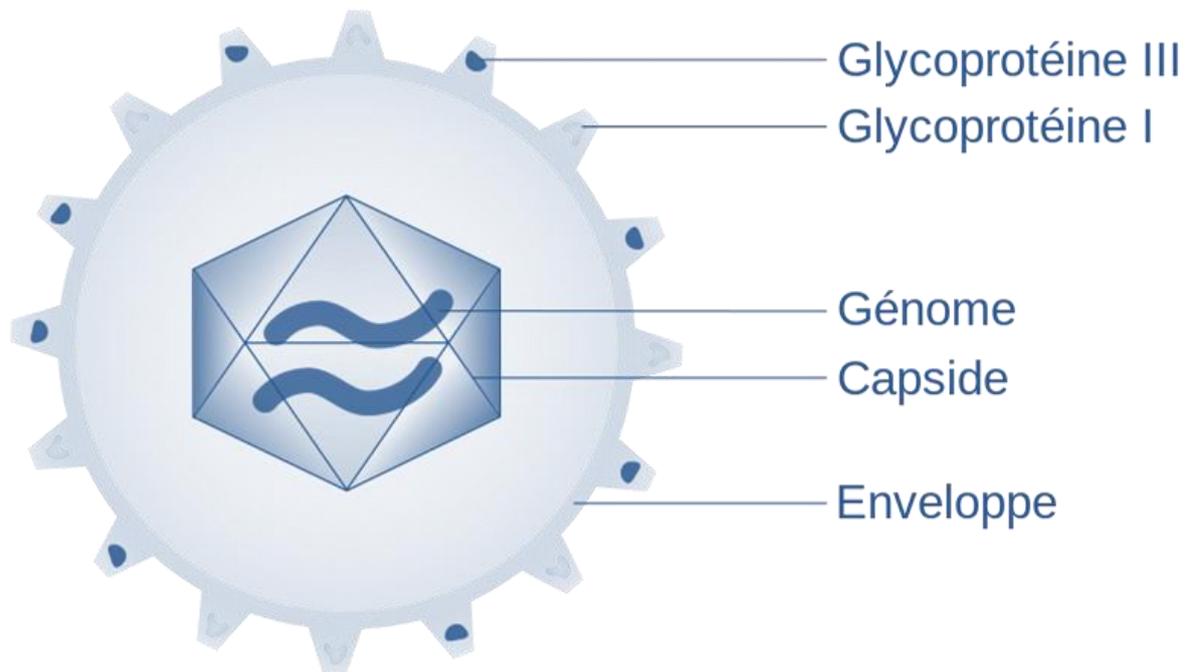


Figure 3. Structure CMV (6)

I.1.3. Cycle de réplication

La première étape (Fig. 4), très rapide, se matérialise par l'entrée des particules virales au sein de la cellule hôte via par fusion ou endocytose secondairement à une liaison à des récepteurs cellulaires de surface encore peu connus (7). La capsid et les protéines du tégument sont libérées dans le cytosol. La capsid est ensuite transportée jusqu'au noyau, là où le génome (ADN) va être libéré et circularisé grâce à la décapsidation. La protéine tégumentaire pp65 va rapidement préparer la réplication virale en réorganisant la configuration du noyau. Une deuxième protéine du tégument pp71 active le promoteur majeur très précoce (MIEP) et va induire l'expression génique en cascade divisée en trois parties distinctes.

La première phase (IE = *Immediate early*) correspond à l'expression de gènes très précoces qui est contrôlée par un promoteur majeur (MIEP). Ces gènes détournent le métabolisme cellulaire au profit de la réplication virale, l'inhibition de l'ADN cellulaire et déclenchent la deuxième phase, la phase précoce (E= *early*).

Elle va commencer par l'expression des gènes E, codant pour les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral, notamment l'ADN polymérase (*UL54*). C'est au cours de cette phase que le génome viral commence sa réplication.

Vient ensuite la troisième et dernière phase, la phase tardive (L=*late*). Au cours de cette phase, les gènes L sont transcrits en protéines de structure du virion. La réplication de l'ADN se termine, il va ensuite être encapsidé dans des capsides nouvellement formées. C'est au cours de cette étape également que le tégument va se former.

Les particules enveloppées sont expulsées de la cellule suite à une fusion entre les vésicules de l'appareil de Golgi avec la membrane plasmique qui va provoquer un enveloppement. Le virus se maintient cependant à l'état latent dans certaines cellules comme les monocytes par exemple (8).

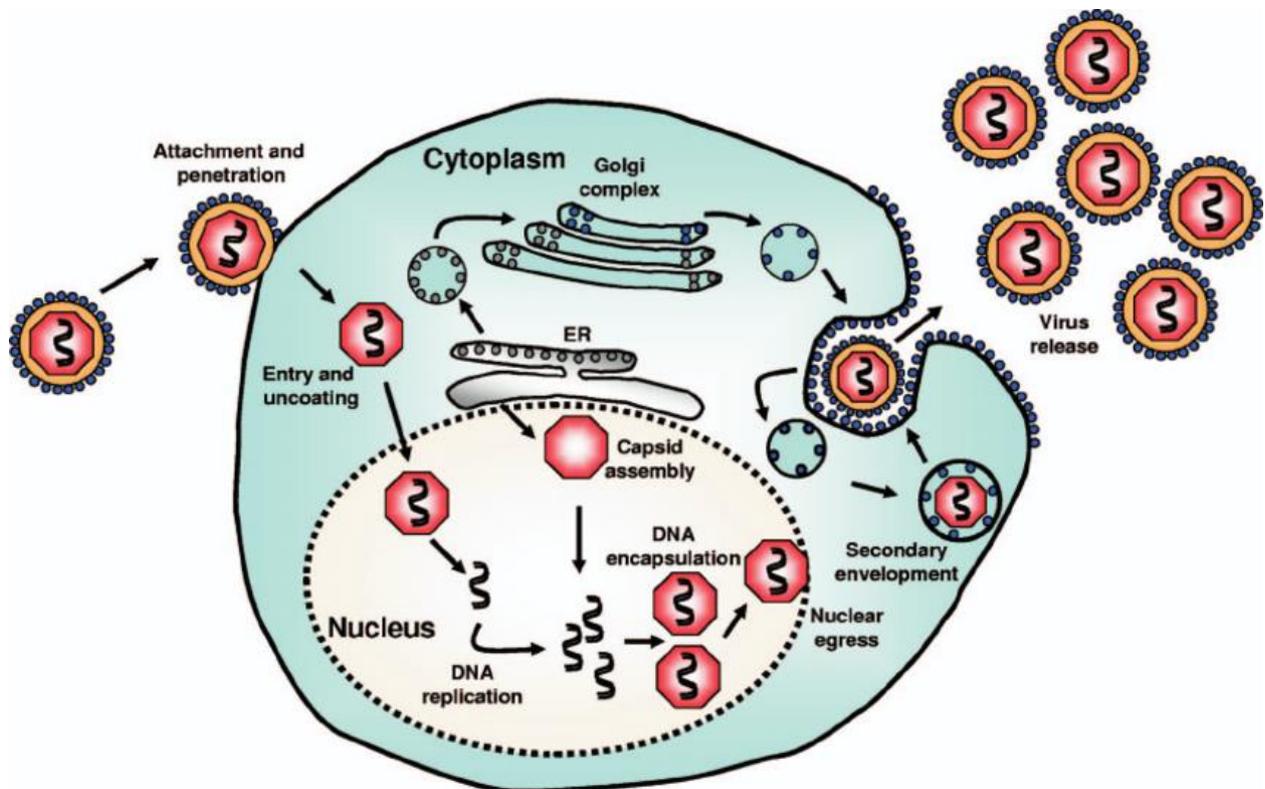


Figure 4. Cycle de réplication du CMV dans une cellule (5).

I.2. Réponse immunitaire

I.2.1. Réponse innée

La primo infection par le CMV chez les individus immunocompétents débute dans les épithéliums des muqueuses. Le virus diffuse dans les cellules myéloïdes notamment les monocytes et les cellules CD34+ ; c'est au sein de ces cellules qu'il restera par la suite latent, nous aborderons dans la partie échappement immunitaire par quel moyen il y parvient. C'est cependant la différenciation de ces monocytes infectés en macrophage ou cellule dendritique qui va initier l'infection productive.

La réponse immunitaire innée joue un rôle de première barrière dans la réponse immunitaire de l'hôte face au CMV. Elle est aussi responsable de l'initiation de la réponse immunitaire acquise.

Le CMV une fois en contact avec des cellules hôtes va en effet stimuler les Toll-like récepteurs (TLRs) qui sont des récepteurs retrouvés à la surface de la plupart des cellules humaines mais plus particulièrement les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages (9). Cette stimulation va activer des voies de transductions et ainsi sécréter des cytokines pro-inflammatoires qui vont avoir pour but de recruter des cellules de l'immunité innée. Les co-récepteurs des TLRs (CD80 et CD86) vont eux aussi être stimulés et vont avoir un rôle dans l'activation de la réponse immunitaire acquise. En effet après capture de l'antigène viral, il va

y avoir présentation de la part des cellules dendritiques matures d'antigènes aux lymphocytes T via les molécules CMH-I ou II sans être infectées, initiant la réponse innée et adaptative (5).

Les lymphocytes NK (*natural killer*) vont eux aussi jouer un rôle dans la réponse innée en induisant l'apoptose sélectivement sur les cellules infectées tout en continuant de sécréter des cytokines pro-inflammatoires qui amplifient le recrutement d'autres cellules de la réponse immunitaire innée (8).

I.2.2. Réponse acquise

L'immunité adaptative cellulaire médiée par les Lymphocytes T CD4+ (LT CD4+) est le mécanisme prédominant dans le contrôle de la réplication virale du CMV. Elle permet la libération d'INF γ dans la circulation sanguine, suivie par la synthèse d'anticorps spécifiques neutralisants (médiée par les Lymphocytes B) et l'apparition des lymphocytes T CD8+ (LT CD8+). La réponse cellulaire spécifique est dirigée principalement contre les glycoprotéines virales de surface (gB et gH) des protéines très précoces comme IE1, IE2 et pUL69 et contre la protéine du tégument pp65 (8). Le rôle indispensable des lymphocytes T CD8+ a été mis en évidence dans de nombreuses études qui prouvent une recrudescence de l'infection virale à CMV chez des individus dépourvus de telles cellules (10). La proportion de LT CD8 engagée dans la réponse antivirale contre le CMV est importante. Elle varie avec une médiane de 10% (dans le sang périphérique) chez les immunocompétents séropositifs au CMV pour atteindre 40% chez des personnes plus âgées (11).

I.2.3. Échappement immunitaire

A l'instar d'autres virus, notamment la plupart des herpès virus, le CMV a réussi à développer une multitude de stratégies afin de déjouer la défense immunitaire de l'hôte.

De nombreuses études décrivent en détail ces stratégies. Nous pouvons citer cependant un mécanisme d'échappement majeur centré sur l'inhibition de la présentation restreinte de l'antigène du CMH I ce qui permet au virus de rester de manière intra cellulaire dans un état de latence sans être menacé par la réponse immunitaire qui ne parvient pas à détecter les antigènes viraux en surface (12).

D'autres gènes, dits « immunomodulateurs », (comme US3, UL18, UL111a, UL40) sont impliqués dans l'interférence avec la fonction des cellules NK (via leurs récepteurs), mais aussi dans la modification du cycle cellulaire et inhibition de l'apoptose (8).

I.3. Mode de transmission et clinique

I.3.1. Mode de transmission

Le CMV est un virus à réservoir strictement humain. Il est retrouvé dans les fluides biologiques (salive, sécrétions cervicales, sperme, urine, selles, larmes, lait maternel et sang). Il est transmis lors de contact étroit avec des sujets excréant le virus. Ce qui explique le fort taux de séropositifs dans la population générale (13). En effet cette ubiquité dans les fluides biologiques humaines lui confère de multiples modes de transmission comme l'allaitement, la voie materno-fœtale, la transfusion sanguine, la transplantation d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques, les gouttelettes salivaires ou les rapports sexuels.

I.3.2. Infection chez l'immunocompétent

Une infection à CMV chez un patient immunocompétent reste asymptomatique dans 90% des cas et est généralement sans gravité lorsqu'elle est symptomatique (14). Les symptômes le plus fréquemment rencontrés lors d'une infection symptomatique sont des céphalées, une asthénie, des sueurs plutôt nocturnes, une fièvre, des courbatures et des adénopathies. Au niveau biologique on observe un syndrome mononucléosique sur le frottis sanguin, caractérisé par de grandes cellules lymphoïdes activées ou hyperbasophiles (Fig.5) (15). Une anomalie du bilan hépatique (augmentation des transaminases, phosphatase alcaline et bilirubine) est également fréquemment retrouvée (16). La durée moyenne des symptômes est d'environ 7 à 8 semaines.

Les formes sévères sont possibles mais rares chez le patient immunocompétent. Elles se manifestent par des hépatites, rétinites, colites ou des pneumopathies (17).

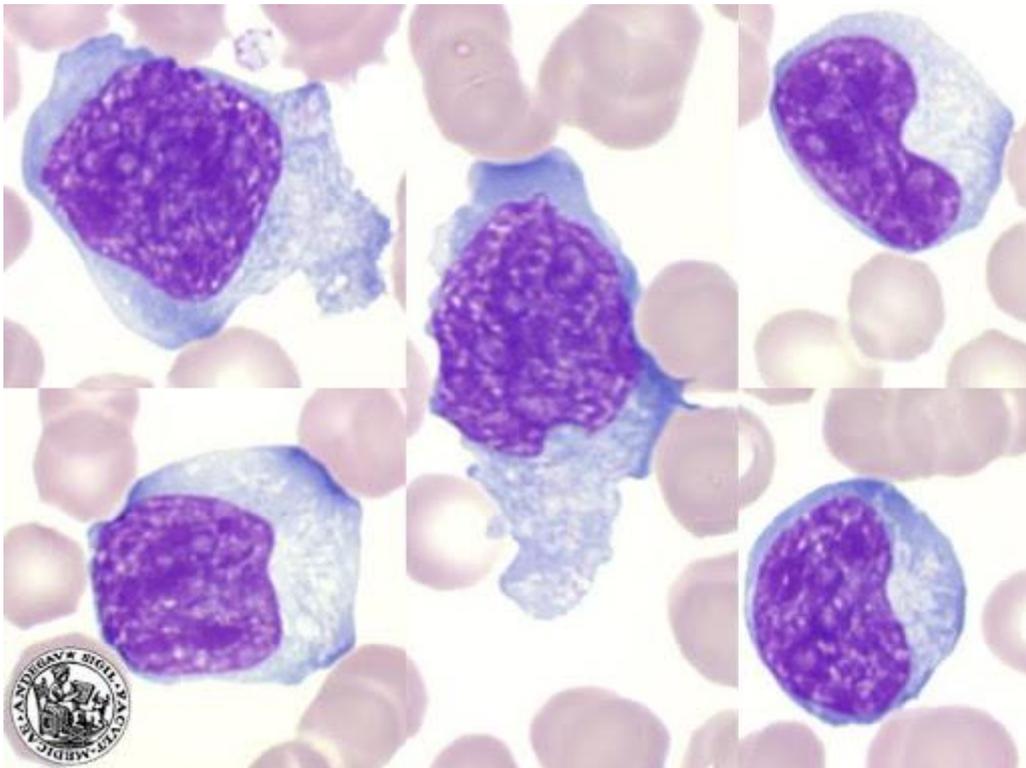


Figure 5 Image de lymphocytes activés (15)

I.3.3. Infections congénitales

Une primo-infection ou une réactivation du CMV au cours d'une grossesse sont sans risque pour la maman mais peuvent être fortement délétères pour le fœtus (Fig. 6). En effet, plus l'infection sera contractée tôt dans la grossesse, plus l'atteinte congénitale risque d'être sévère (18). Il est donc primordial de pouvoir dater le moment de survenue de l'infection, nous aborderons ce point dans la partie diagnostic.

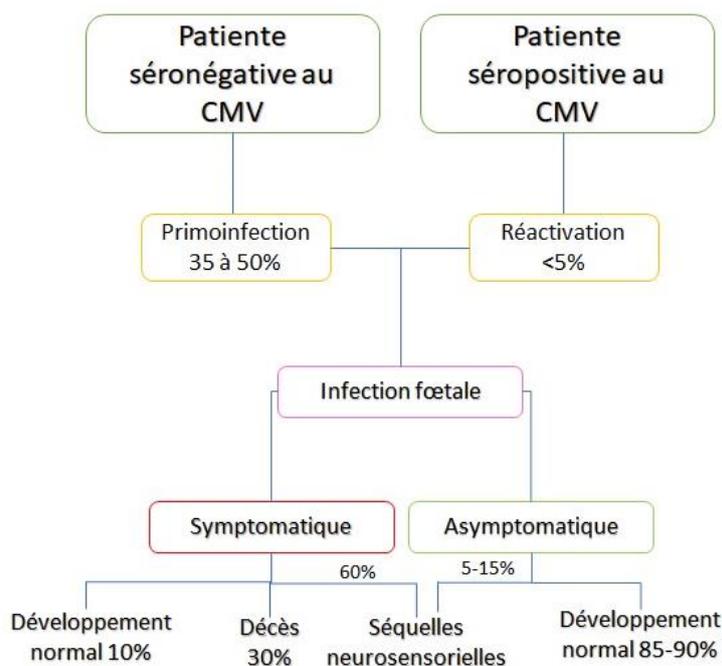


Figure 6 Transmission materno-fœtale du CMV (14).

Du fait de la forte proportion des formes asymptomatiques, une infection à CMV est le plus souvent découverte sur des signes de fœtopathie à l'échographie systématique (5 à 15% des cas). Le plus souvent, ces anomalies se traduiront par un retard de croissance *in utero* (RCIU), un oligoamnios, une microcéphalie, des calcifications périventriculaires, intrahépatiques entre autres. La maladie d'inclusions cytomégaliqes décrite en 1952 par Wyatt touche moins de 5% des nouveaux nés infectés. Cette forme sévère se manifeste par une infection généralisée ictéro-hémorragique avec pétéchies et hépatosplénomégalie associée à un ictère. L'enfant présente en général un petit poids à la naissance. Cette forme entraîne environ 30% de mortalité avec pour les enfants survivants des séquelles neurologiques dans 90% des cas. Les infections plus limitées sont plus fréquentes, elles concernent les enfants ne présentant pas d'anomalies à la naissance à hauteur de 10%. Ces enfants seront atteints de retard psychomoteur ou de surdité la plupart du temps avec parfois des apparitions tardives (14) .

I.3.4. Infection chez l'immunodéprimé

Chez des patients immunodéprimés, l'infection par le CMV ne se traduit pas systématiquement par des signes cliniques. Cependant, avec le rôle primordial que joue l'immunité (innée et acquise) de l'hôte pour maîtriser une réplication virale, il semble logique qu'une infection chez une personne immunodéprimée ne puisse pas être facilement endiguée. De nombreux articles prouvent que chez un patient immunodéprimé, le CMV est pleinement capable d'exercer sa pathogénicité du fait de l'absence de réponse immunitaire suffisante (19).

L'immunodépression est la conséquence d'un déficit immunitaire. Celui-ci peut être inné (déficits immunitaires congénitaux) ou acquis. Les étiologies acquises sont nombreuses et peuvent se répartir en trois groupes. Les causes infectieuses avec notamment le VIH qui provoque à terme une lymphopénie (CD4 +) inférieure à 500/mm³ : c'est le stade SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise). Les causes hématologiques avec le développement d'hémopathies malignes telles que la leucémie lymphoïde chronique, le myélome multiple ou bien les diverses leucémies aiguës. Et enfin les causes iatrogènes avec l'utilisation de diverses classes de médicaments dits immunosuppresseurs utilisés dans le cadre de chimiothérapie,

d'aplasie médullaire pré-greffe ou traitement antirejet post transplantation entre autres. Ce type d'immunodépression concerne les patients de notre étude, nous développerons donc ce sujet dans la deuxième partie (20).

Le type d'immunodépression va provoquer chez le patient des manifestations cliniques différentes. En effet chez le patient en stade SIDA, le CMV se manifestera le plus souvent sous forme de rétinites. En revanche, chez le patient greffé de cellules souches hématopoïétiques c'est plutôt une forme pulmonaire qui a tendance à se développer. Chez les patients greffés hépatiques le CMV se développera au niveau du foie générant ainsi des hépatites préférentiellement, mais d'autres tissus peuvent également être touchés (19).

L'origine de ces différences n'est pas encore très bien connue, mais elles peuvent résulter de l'ensemble des cytokines générées par l'organe transplanté ainsi que de la durée de réplication. Chez les patients en stade SIDA et les nouveaux nés atteints d'infection congénitale, la réplication du virale se produit généralement à un niveau élevé avec une persistance pendant plusieurs mois. En revanche chez les patients greffés, le CMV se manifeste à travers une infection aiguë, entraînant ensuite une maladie à CMV dans un court délai. En plus de la réplication directement responsable d'une pathologie comme par exemple, l'hépatite, c'est le système immunitaire de l'hôte qui est pointé du doigt pour sa contribution aux pathologies observées. C'est ce qui est suggéré pour expliquer la survenue de pneumopathie à CMV. En effet, ce n'est que lorsque les patients sont aptes à fournir une réponse immunitaire suffisante qu'on observe la maladie à CMV. Comme nous avons vu précédemment, l'incidence de pneumopathies chez les patients en stade SIDA est assez faible, or ces patients hébergent fréquemment le CMV dans leurs poumons. En revanche, cette manifestation pulmonaire a été observée plus fréquemment chez des patients séropositifs au VIH ayant un taux de CD4+ plus élevé (19).

De manière générale, en cas de dissémination virale importante dans un contexte d'immunodépression, il va apparaître chez le malade une infection à CMV (réplication virale) qui peut provoquer le stade de maladie à CMV. Celle-ci étant définie comme une infection à CMV accompagnée de symptômes clinico-biologiques cités précédemment (rétinite, pneumopathie, néphrite...). Des infections sévères peuvent entraîner une perte du greffon chez les transplantés voire aller jusqu'au décès des patients (21).

I.4. Epidémiologie

I.4.1. Population générale

La détection d'anticorps de type IgG confère au patient un statut séropositif vis à vis du CMV acquis à la suite d'une rencontre au cours de sa vie avec le virus. Aux Etats-Unis environ 1 à 2% de la population contracte une infection au CMV par an. On considère dans ce pays qu'à l'âge de 70 ans, la majorité de la population a été infectée par le CMV (22).

La séroprévalence de la population mondiale est très variable en fonction de la situation socio-économique du pays. En effet elle varie de 40% dans les pays hautement industrialisés pour atteindre 100% dans les pays en voie de développement (Tableau 1) (23). En France on estime que 50% de la population globale est séropositive au CMV (13).

Tableau 1 Distribution de la séroprévalence du CMV chez des patients donneurs de sang au niveau mondial (23) .

Place where blood was collected	Country code	No. of serum samples tested	Samples with complement-fixing antibody	
			No. ^a	%
Lyon	F	98	39	40
Freiburg	D	89	37	42
St. Gallen	CH	105	47	45
Albany	USA	98	44	45
Melbourne	AUS	99	54	54
Stockholm	S	99	60	60
Manchester	GB	94	58	61
Honolulu	USA	145	97	67
Johannesburg (whites)	SA	96	72	75
Houston	USA	98	77	79
Buenos Aires	RA	43	35	81
Bratislava	CS	100	83	83
Port of Spain	TT	99	86	86
Mauritius	MS	93	83	89
Anchorage	USA	100	94	94
Hong Kong	HK	99	94	94
Sendai	J	99	96	96
Greenland	DK	90	88	98
Dar es Salaam	EAT	117	114	98
Morocco	MA	109	107	98
Fiji Islands	GB	95	95	100
Entebbe	EAU	143	143	100
Ibadan	WAN	95	95	100
Johannesburg (Bantu negroes)	SA	112	112	100
Manila	PH	89	89	100
Chandigarh	IND	68	68	100

^a ≥ 1 in 4. The tests were performed by the coordinating laboratory.

I.4.2. Infections congénitales

Le CMV est la première cause virale d'infection congénitale. Il est également la première étiologie non héréditaire de perte auditive neurosensorielle ainsi que de retard mental dans la petite enfance (24). Sa prévalence dans les pays industrialisés est d'environ 0,64 % des naissances vivantes (25). On estime qu'entre 42 et 53% des femmes en âge de procréer sont séropositives au CMV. Cette population particulière est à risque de contamination notamment à cause de l'exposition à la salive et aux urines de jeunes enfants qui sont des excréments du virus pendant de nombreux mois après leur primo-infection, asymptomatique la majeure partie du temps. De ce fait, certains groupes de femmes sont très à risque de contracter une infection à CMV, comme le personnel de crèche (26) .

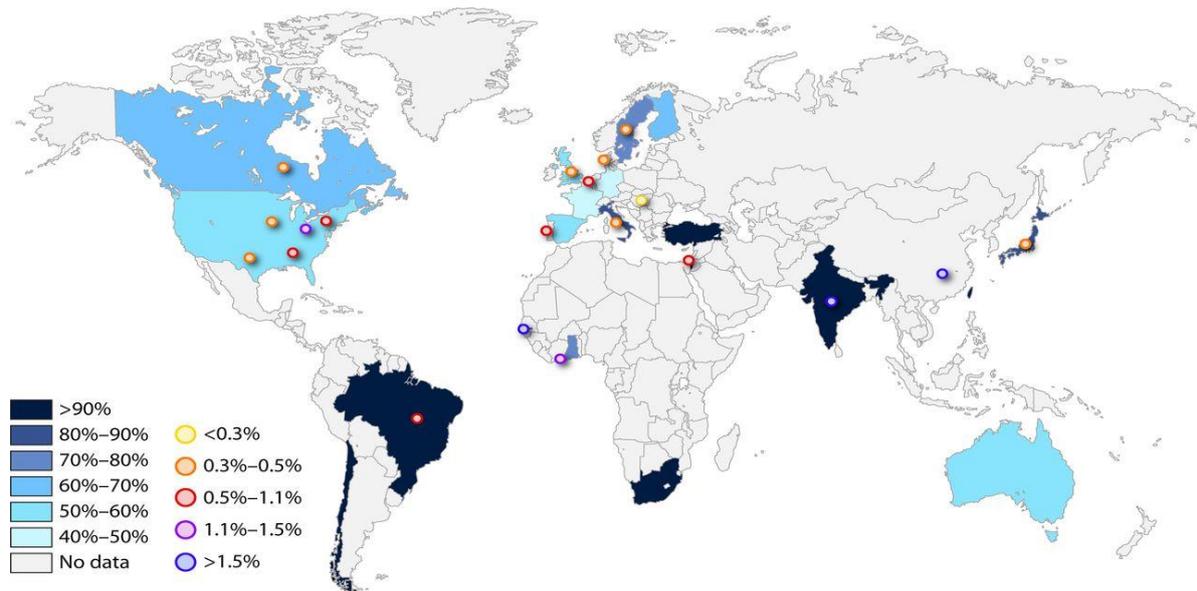


Figure 7 Séroprévalence au CMV des femmes en âge de procréer (12 à 49 ans) à travers le monde avec le pourcentage d'infections materno-foetales associées (27)

I.4.3. Patients Transplantés

En l'absence de prophylaxie antivirale, on estime que 40 % à 100 % des patients transplantés développent une infection à CMV et 67 % développent une maladie à CMV (28). Le risque d'infection à CMV post transplantation dépend fortement de la sérologie du donneur (D) et du receveur (R). En effet, l'incidence de la maladie à CMV chez les D-/R- (donneur et receveur séronégatifs) est inférieure à 5% (29).

I.5. Diagnostic au laboratoire

Les différents tests diagnostiques de l'infection à CMV sont développés pour répondre à des questions distinctes. En effet la sérologie renseignera sur le statut immunitaire du patient et pourra conclure à un contact avec le CMV (ancien ou récent). La PCR aura un rôle dans le diagnostic de la maladie active et dans le suivi des transplantés. La culture cellulaire, bien que moins utilisée actuellement permet d'objectiver le caractère infectieux d'une souche virale présente dans un prélèvement et est nécessaire à la réalisation d'antivirogrammes pour tester la sensibilité d'une souche aux antiviraux. Les tests immunologiques plus récents, objectivent la réponse immunitaire cellulaire vis à vis du CMV (30).

I.5.1. Le sérodiagnostic

I.5.1.1. Principe

Le principe de la sérologie est de doser les anticorps dirigés contre l'agent infectieux recherché, on cherche à doser soit les IgG (immunoglobulines G) spécifiques, les IgM ou les anticorps totaux (IgM et IgG). Il s'agit d'un diagnostic indirect. Dans le cadre d'une sérologie CMV, ces anticorps peuvent être recherchés par agglutination passive ou par la technique ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). De nos jours, c'est la technique ELISA qui est privilégiée, alors que l'agglutination passive est laissée de côté.

Le principe de l'agglutination passive est le suivant, on va utiliser un antigène soluble rendu particulière en étant fixé sur un support (bille de latex ou hématies). On va ensuite mettre du

sérum du patient sur ce support. S'il y a présence d'anticorps spécifiques dirigés donc les antigènes, une agglutination visible à l'œil nu confirmera cette présence (Fig. 8). Cette technique est avantageuse du fait de sa simplicité d'exécution (lecture à température ambiante) de l'équipement modeste qu'il demande (lecture à l'œil nu), du faible volume d'échantillon requis, la réalisation de la réaction, la lecture possible à l'œil nu et, pour les latex notamment, la rapidité d'obtention du résultat. Cependant la lecture d'une telle analyse peut se révéler difficile (31).

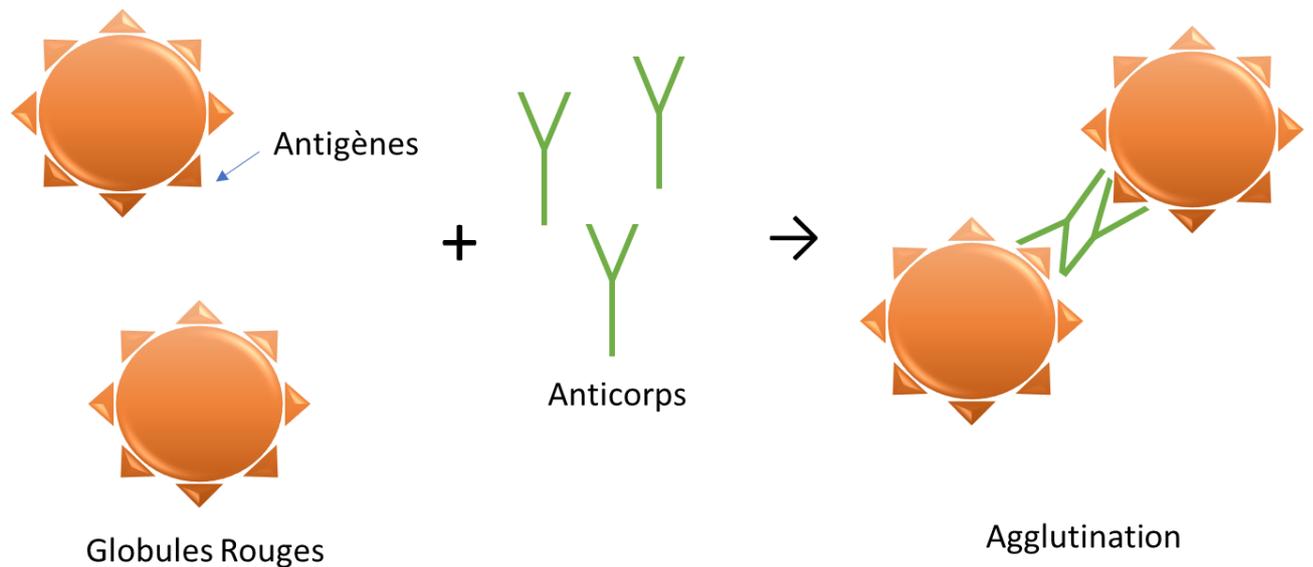


Figure 8 Principe de l'agglutination passive.

Le test ELISA est un test relativement récent (1971) il regroupe plusieurs sortes de techniques mais nous décrivons la plus utilisée : la technique indirecte.

Elle consiste dans un premier temps à fixer un antigène connu, spécifique de l'anticorps que l'on cherche, sur une microplaque de manière électrostatique au fond des puits (par adsorption). Cette étape est suivie d'une étape de lavage pour éliminer les antigènes non fixés. On incube une succession d'échantillons à concentrations connues et croissantes de manière à réaliser une gamme d'étalonnage qui servira à titrer le sérum à doser, lui aussi mis en incubation, dont la concentration est inconnue. S'il y a présence d'anticorps spécifiques, ceux-ci vont se fixer aux antigènes. On procède à un second lavage des puits à la suite de cette étape pour enlever les anticorps non fixés. On dépose ensuite des anticorps qui sont liés de manière covalente à une enzyme de révélation ; ils sont dits « conjugués ». Cet anticorps conjugué va reconnaître l'anticorps que l'on cherche à mettre en évidence. Un nouveau lavage suit cette étape. Pour révéler la présence d'anticorps, on va mesurer l'activité de l'enzyme couplée, mise en évidence soit par l'ajout d'un substrat chromogène, soit par fluorométrie, soit par chimiluminescence. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration de l'anticorps recherché (32) (Fig. 9). C'est un test peu coûteux, flexible, spécifique et automatisable. Cependant, cette technique présente quelques limites. Notamment la détection d'une cible unique pour chaque test. Il dépend de la liaison de l'analyte par un anticorps, ELISA ne peut pas distinguer les composés antigéniquement proches par manque de spécificité, ce qui peut causer des réactions croisées avec d'autres anticorps (rendant des résultats faussement positifs).

3. Substrat de l'enzyme qui va révéler une couleur

2. Ac dirigés contre les Ac d'intérêt couplés à une enzyme

1. Matériel biologique contenant les Ac à doser (ex : sérum)

Ag fixés sur la plaque

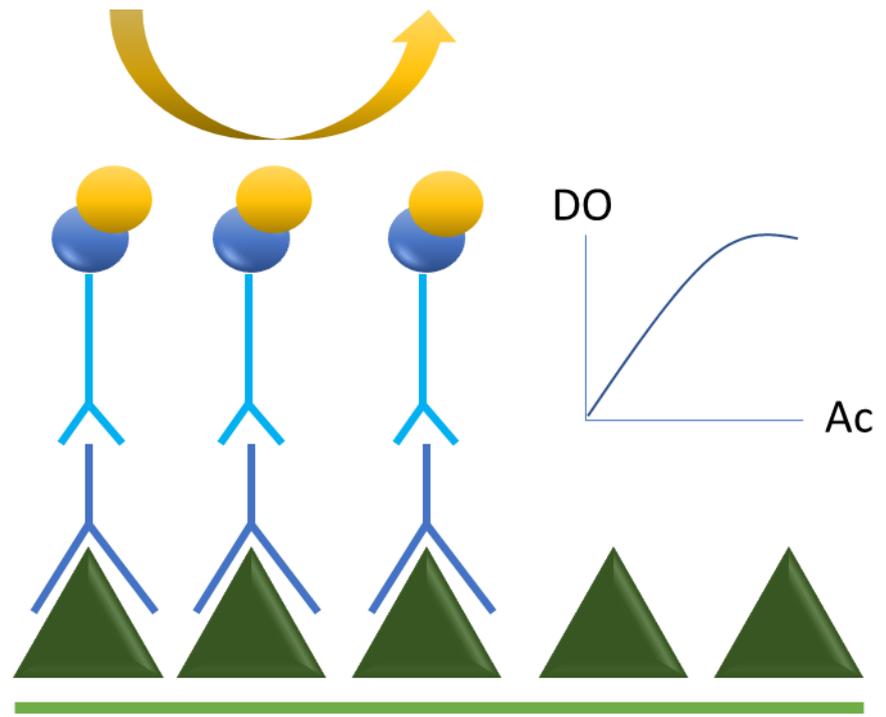


Figure 9 Principe de l'ELISA indirect

I.5.1.2. Spécificité d'isotype : IgM/IgG

Le diagnostic biologique de première intention pour une infection à CMV est un sérodiagnostic avec la recherche d'IgG et d'IgM.

La réponse immunitaire au CMV va fournir après un temps d'incubation moyen de 40 jours (28 à 60 jours) des anticorps IgM puis des IgG qui sont spécifiques. Comme décrit plus tôt, le statut sérologique du patient se définit donc avec la présence ou non d'IgG.

La cinétique des IgG a une valeur significative pour dater une primo infection. En effet si à deux semaines d'intervalle le taux d'IgG reste stable on peut considérer que la séroconversion est ancienne. En revanche si on observe une tendance à l'augmentation des IgG, on suspecte fortement une primo infection récente (Fig. 10).

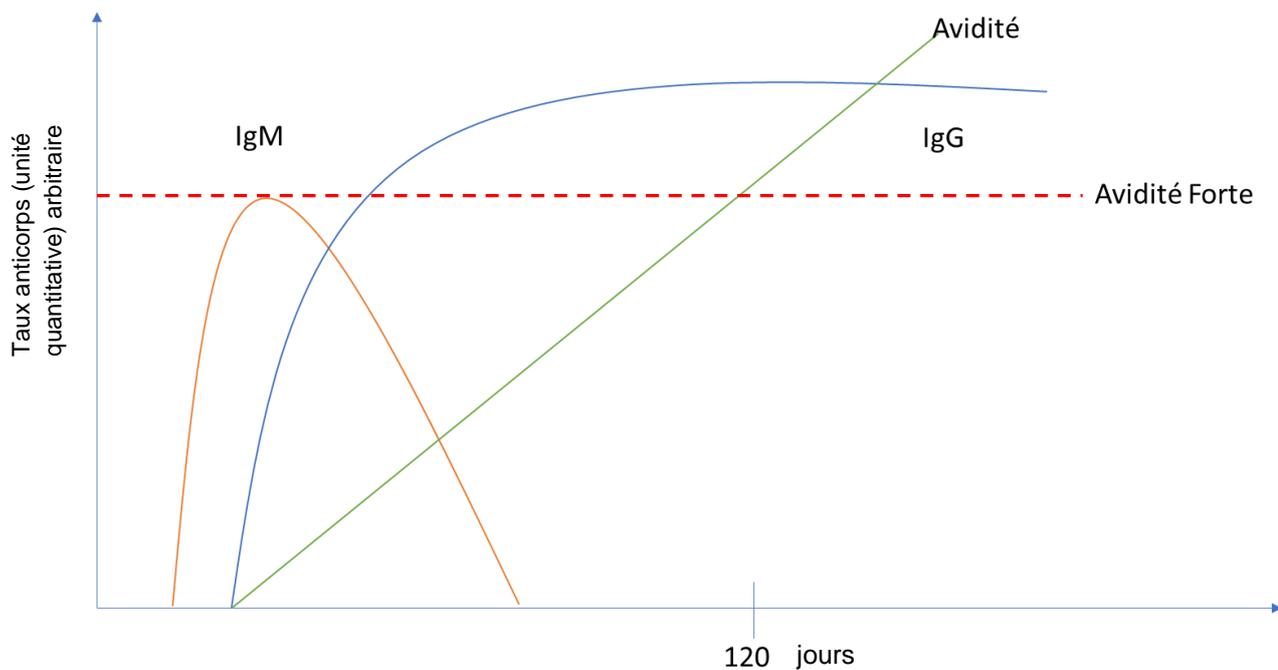


Figure 10 Cinétique IgM et IgG.

Ce sérodiagnostic est en principe inutile pour un diagnostic ou un suivi chez l'immunodéprimé du fait d'une faible ou d'une absence de réponse immunitaire (33).

I.5.2. Le test d'avidité

Il existe des situations dans lesquelles le patient présente des IgM positifs associés à des IgG positifs sans que l'on puisse savoir s'il s'agit d'une primo-infection détectée tardivement, d'une présence d'IgM persistants ou d'une réactivation ou encore d'une réaction croisée. Par exemple, comme évoqué précédemment, une primo-infection au cours d'une grossesse peut conduire à l'infection du fœtus et menacer son pronostic vital. Plus la primo-infection est contractée tôt dans la grossesse, plus le risque d'atteintes sévères est élevé. D'où l'importance de dater la survenue de la primo-infection. C'est là que l'avidité devient un outil très utile. L'avidité c'est la force de liaison entre les antigènes et les IgG correspondants. Celle-ci augmente progressivement au cours des mois post-primo-infection (Fig. 10). Il a été prouvé que la protection d'un individu face à une infection est liée à la qualité des réponses humorale et cellulaire. La qualité de la réponse humorale est déterminée entre autres par l'avidité des IgG. Durant les années 80 des techniques ELISA ont été développées pour mesurer cette avidité en utilisant un agent dénaturant (comme l'urée par exemple) pour détruire la liaison entre l'antigène et l'anticorps associé. Le principe est le suivant, on mesure le taux d'IgG avant l'ajout de l'agent dénaturant et on mesure ces mêmes anticorps après traitement par dénaturation. Si l'infection est ancienne, la liaison entre les antigènes utilisés pour le test ELISA et les anticorps mesurés sera forte, donc la variation avant/après ajout d'agent dénaturant sera plutôt faible. A l'inverse, si l'infection est récente, le dosage d'IgG post-traitement sera beaucoup plus faible. On mesure donc l'avidité de la manière suivante :

$$\frac{DO \text{ en présence d'agent dénaturant}}{DO \text{ sans agent dénaturant}} \times 100$$

La valeur seuil pour déterminer si l'avidité est forte ou faible est fixée par les fournisseurs de la technique. Lorsque ce seuil est dépassé, l'avidité est donc dite forte et la primo infection est considérée comme apparue à une date supérieure à trois mois avant la date de prélèvement (34) .

Tableau 2 Différentes situations du sérodiagnostic avec proposition d'analyses supplémentaires

IgM	IgG	Interprétation	Analyses supplémentaires pouvant aider à l'interprétation
Négatif	Négatif	Séronégativité pas de contact avec le virus	/
Positif	Négatif	Probable primo-infection	-Contrôle sérologique à distance (dizaine de jour) pour mettre en évidence l'apparition d'IgG -PCR (détection ADN viral)
Négatif	Positif	Séropositivité	/
Positif	Positif	Primo infection détectée tardivement ou réactivation	Avidité

I.5.3. Détection qualitative ou quantitative de l'ADN génomique

La deuxième approche utilisée pour établir le diagnostic d'une infection à CMV est la mise en évidence directe du virus ou de ses composants dans l'échantillon. Les techniques moléculaires permettent de détecter l'ADN viral présent dans l'échantillon.

La PCR en temps réel est la technique la plus utilisée. C'est une technique basée sur l'amplification d'une séquence connue, ciblée grâce à deux amorces d'extrémité 3' qui se dirigent l'une vers l'autre in vitro et une sonde marquée par un fluorochrome permettant la détection des produits amplifiés. Cette technique repose sur une répétition de cycles comportant trois étapes réalisées dans un automate (thermocycleur) permettant des variations rapides de température dans le temps. Une étape de dénaturation permet la séparation des deux brins de la séquence d'ADN par augmentation de la température. Une étape d'hybridation durant laquelle chacune des deux amorces spécifiques va s'hybrider avec chaque simple brin d'ADN viral dénaturé à une température dépendante de la séquence des amorces utilisées. Une étape d'élongation durant laquelle l'ADN polymérase va pouvoir synthétiser l'intégralité du brin complémentaire de la séquence ciblée. A chaque synthèse du brin complémentaire, l'activité 3' exonucléasique de l'ADN polymérase va libérer le fluorochrome. Au fur et à mesure que les cycles se succèdent, la quantité d'ADN va croître et l'intensité de la fluorescence augmenter (Fig. 11). Cette croissance va s'observer grâce à une courbe d'amplification qui doit dépasser une limite seuil fixée (Threshold). Pour quantifier l'ADN amplifié, on regarde au bout de combien de cycles cette courbe d'amplification a dépassé le seuil : ce qui définit le Ct. Grâce à une gamme étalon qui exprime le nombre de copies virales /mL en fonction du Ct, le Ct de l'échantillon est converti en copies/mL, ce qui définit la charge virale. Donc plus le Ct est

faible, plus la quantité d'ADN viral est élevée. La PCR CMV dans le sang est connue pour avoir une sensibilité de 100% et une spécificité supérieure à 75% pour diagnostiquer une maladie à CMV, la recherche d'ADN viral dans le sérum peut se révéler positive dans les 15 jours qui suivent les signes cliniques, sachant que la sévérité des symptômes est directement corrélable à la valeur de la charge virale (4). On peut également réaliser des PCR CMV dans la salive ou les urines dans les suspicions d'infection materno-fœtale pour distinguer l'excrétion virale du bébé et une contamination des échantillons par la virémie maternelle par exemple.

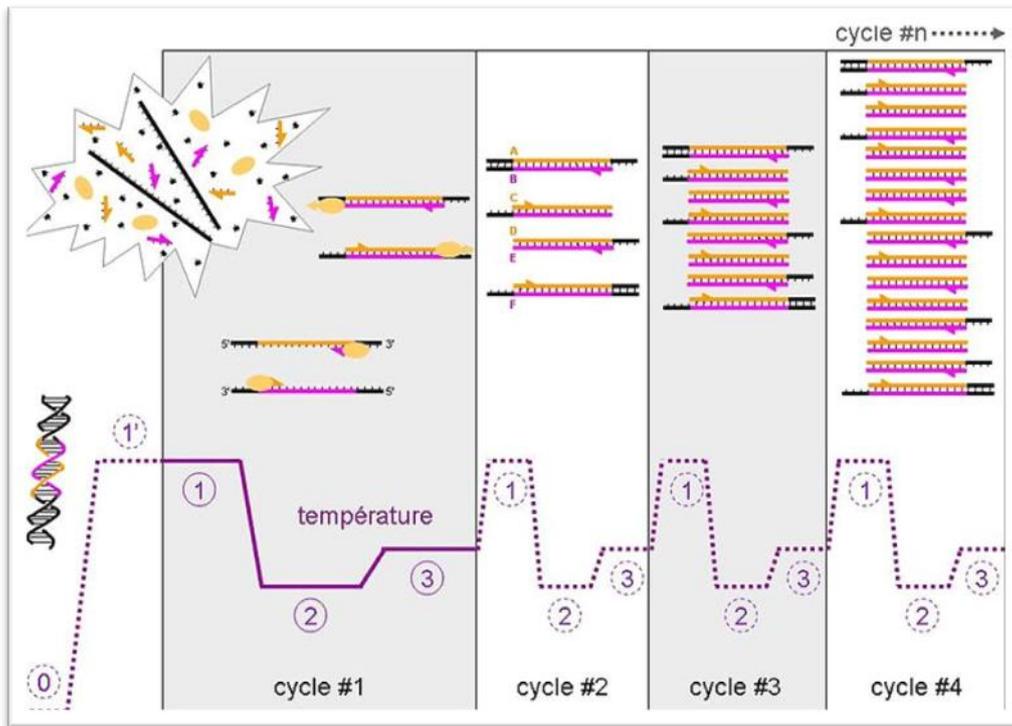


Figure 11 Principe de la PCR (35)

I.5.4. La culture cellulaire

Un des moyens pour mettre en évidence la présence de virus dans un prélèvement est l'isolement viral par culture cellulaire. Il s'agit d'une méthode historique, qui compte tenu son délai tardif de rendu de résultat et de ses contraintes techniques, n'est plus utilisée en routine. Elle persiste cependant pour l'isolement et l'entretien de souches et la réalisation d'antivirogrammes. Celle-ci s'effectue sur des cellules embryonnaires fibroblastiques et diploïdes humaines. Les plus couramment utilisées sont les cellules fibroblastiques (comme les MRC-5) pulmonaires, on y reproduit le cycle productif du CMV. Les cellules d'origine épithéliale habituellement utilisées (Hela ou KB), ne permettent pas une telle répliation. Tout comme les cellules d'origine animale puisqu'il s'agit d'un virus strictement humain. La répliation se fait dans le noyau où on peut détecter de l'ADN viral en 48 heures. Comme décrit plus haut c'est dans le cytoplasme que les protéines virales sont synthétisées avant d'être assemblées sous forme de capsides immatures dans le noyau de la cellule. L'accumulation de capsides immatures dans le noyau va donner une inclusion nucléaire. Ces capsides après avoir incorporé l'ADN viral s'enveloppent et migrent vers le cytoplasme, se forme alors une inclusion cytoplasmique composée de particules enveloppées immatures sans ADN (corps denses) et de particules virales. Les virions nouvellement formés sont expulsés environ 120

heures après le début de l'infection. La cellule infectée augmente de taille dans les premières heures de l'infection. L'effet cytopathogène qui apparaît entre 8 et 20 jours est caractérisé par un ensemble de cellules infectées formant un foyer composé de grandes cellules réfringentes ovalaires d'extension lente (4) , on caractérise cet aspect comme un aspect « banc de poissons » (36).

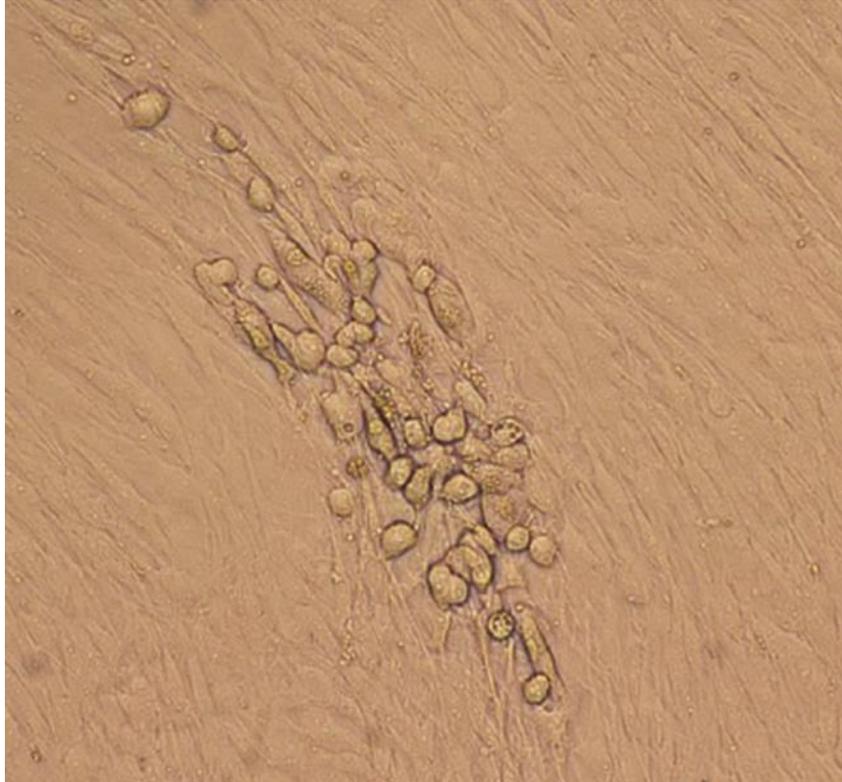


Figure 12 Effet cytopathogène du CMV (36)

I.6. Traitement

Les traitements antiviraux dirigés contre le CMV sont réservés essentiellement aux patients immunodéprimés et aux enfants nés avec une infection congénitale à CMV. Ils peuvent être utilisés dans le cadre d'un traitement préventif, préemptif ou curatif.

I.6.1. Molécules actuellement disponibles

I.6.1.1. Molécules ciblant l'ADN polymérase

I.6.1.1.1. Ganciclovir

Le ganciclovir est un analogue de la 2'-désoxyguanosine, sa structure étant proche de celle de l'aciclovir. Ce qui les différencie est un atome carbone supplémentaire associé à un radical OH jouant le rôle d'un 3' OH, permettant l'incorporation d'un nucléoside. Pour être actif, il doit être triphosphorylé et sa première phosphorylation dépend de la protéine kinase virale codée par le gène *UL97*. Les deux autres phosphorylations étant effectuées par des kinases cellulaires. Cette forme triphosphate s'incorpore ensuite dans l'ADN viral au cours de la réplication en compétition avec la guanosine, il va y avoir une interférence avec l'ADN polymérase (codée par le gène *UL54*) ce qui stoppe l'élongation.

Cette molécule est administrée par voie IV, nous aborderons les posologies et les modalités d'administration avec les stratégies thérapeutiques.

Les principaux effets toxiques secondaires à son administration sont l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité et l'hémato toxicité (neutropénie, thrombopénie). Il convient de réaliser une surveillance régulière grâce à des bilans biologiques (37).

C'est la molécule de première intention dans les stratégies thérapeutiques, que ce soit à visée prophylactique, préemptive ou curative car l'activité enzymatique du ganciclovir vis-à-vis de l'ADN polymérase du CMV est largement supérieure à celle de l'aciclovir à concentration égale (38) .

I.6.1.1.2. Valganciclovir

C'est une prodrogue du ganciclovir, il s'administre par voie orale car il est doté d'une biodisponibilité dix fois supérieure à celle du ganciclovir (39). Il est métabolisé rapidement en ganciclovir par des estérases intestinales et hépatiques (40).

I.6.1.1.3. Valaciclovir

Le valaciclovir est une prodrogue de l'aciclovir qui a une meilleure biodisponibilité, ce qui lui permet une administration par voie orale. Son mécanisme d'action est comparable à celui du ganciclovir. Il s'agit d'un analogue nucléosidique qui va inhiber l'ADN polymérase virale qui a besoin d'être triphosphorylé pour être actif avec la première phosphorylation faite par une protéine kinase virale (41).

I.6.1.1.4. Foscarnet

Le foscarnet est une molécule qui agit sur l'ADN polymérase des Herpès virus. Elle bloque de manière non compétitive le site du récepteur au pyrophosphate de l'ADN polymérase virale. Cette activité antivirale n'a pas besoin de phosphorylation intracellulaire. Cette inhibition est virostatique et réversible à l'arrêt du traitement. Ce médicament est connu pour être néphrotoxique (42).

I.6.1.1.5. Cidofovir

Le cidofovir est un analogue nucléotidique qui inhibe l'ADN polymérase, il a besoin d'être phosphorylé pour être actif. Cette molécule a une longue demi-vie, ce qui rend le cidofovir administrable une fois par semaine. Cet antiviral est lui aussi néphrotoxique (43).

I.6.1.2. Molécule ciblant la protéine kinase

I.6.1.2.1. Maribavir

Le maribavir inhibe directement la protéine kinase UL97. Il a montré son efficacité contre les souches résistantes au ganciclovir. Le maribavir se distingue des autres agents antiviraux utilisés contre le CMV par l'absence d'effets indésirables hématologiques ou néphrologiques. Cependant il a été associé à des troubles du goût (44).

I.6.1.3. Perspectives thérapeutiques

I.6.1.3.1. Molécule inhibant le complexe terminase : Letermovir

Il inhibe les composants du complexe terminase du CMV responsables de l'encapsidation de l'ADN viral et bloque ainsi la réplication virale. Cette molécule est spécifique du CMV, sans action sur les autres herpesvirus. Parmi les effets indésirables les plus fréquents on retrouve des troubles digestifs, des nausées, des œdèmes périphériques, des céphalées, et une asthénie. Contrairement aux inhibiteurs de l'ADN-polymérase, le létermovir n'est pas associé à une myélotoxicité ni à une néphrotoxicité (45). Une étude récente a permis de mettre en évidence une efficacité significative de l'utilisation du létermovir dans le cadre d'une prophylaxie anti-CMV chez des patients greffés de cellules souches hématopoïétiques (46).

I.6.1.3.2. Molécule ciblant l'ADN polymérase : Brincidofovir

Il s'agit d'une nouvelle molécule antivirale, un analogue lipido-conjugué du cidofovir dont la biodisponibilité est élevée par voie orale. Elle possède une longue demi-vie, ce qui permet une administration en 2 prises par semaine. *In vitro*, il a une activité préservée contre un certain nombre de souches résistantes. Le brincidofovir n'est pas un substrat des transporteurs anioniques présents au niveau du tubule rénal proximal ce qui réduit la néphrotoxicité retrouvée avec le cidofovir. De nombreuses études mettent évidence une diminution de la toxicité rénale associée à une baisse du nombre d'infections à CMV chez un groupe de patients traités par brincidofovir (39).

I.6.2. Stratégie Thérapeutique chez les Immunodéprimés

L'infection à CMV chez les patients greffés de CSH ou d'organes solides est la première cause virale de morbidité et mortalité. Voilà pourquoi il est primordial de prévenir le plus possible une primo-infection ou une réactivation du virus favorisée par le traitement immunosuppresseur visant à limiter le rejet de la greffe (39).

I.6.2.1. Stratégies préventive et préemptive

Il a été convenu par les recommandations européennes d'établir le statut sérologique du patient receveur avant toute greffe de CSH ou d'organes solides et que pour tout patient séronégatif il fallait :

- Dans la mesure du possible, privilégier un donneur séronégatif
- En cas de donneur séronégatif, réaliser des transfusions avec des produits sanguins déleucocytés ou provenant d'un donneur séronégatif.

Il existe deux stratégies possibles de prévention de maladie à CMV.

- L'administration systématique d'un traitement prophylactique antiviral
- Le recours au traitement préemptif.

Un traitement prophylactique par un antiviral (ceux cités précédemment) peut être prescrit pour éviter la survenue d'une infection à CMV. Les molécules les plus couramment utilisées dans cette indication sont le valaciclovir (à la posologie, chez l'adulte, de 2000 mg 4 fois par jour), le ganciclovir IV (à la posologie de 5 mg/kg 1 fois par jour) et le valganciclovir (à la posologie, chez l'adulte, de 900 mg 1 fois par jour). Cette stratégie de traitement prophylactique systématique est envisagée chez les patients à haut risque de maladie sévère à CMV,

notamment lorsqu'il y a la combinaison Donneur séropositif et Receveur séronégatif. Elle réduit le risque d'infection à CMV post greffe. Il a été prouvé que pour la prophylaxie soit efficace une durée minimale de 3 à 6 mois est nécessaire pour les greffes de rein, cœur et foie et 6 à 12 mois pour les greffes de poumons (47). Cette stratégie expose les patients à un risque majoré d'effets indésirables, tels que la myélosuppression secondaire à l'hématotoxicité des molécules en cas de recours au ganciclovir/valganciclovir, avec majoration secondaire du risque d'infections opportunistes (bactériennes, fongiques, parasitaires et virales). Chez les patients à haut risque de maladie à CMV, l'autre stratégie consiste à effectuer une simple surveillance régulière de la virémie par PCR. Si celle-ci se positive ou dépasse un seuil prédéfini (variable selon les centres), et qu'il persiste une réplication virale malgré une diminution du traitement immunosuppresseur lorsque cette mesure est possible, un traitement antiviral dit préemptif est instauré (39). Le tableau suivant compare les deux stratégies de prise en charge.

Tableau 3 Comparaison de la stratégie prophylactique versus préemptive (48)

	Prophylactif	Préemptif
Survenue d'infection précoce	Rare	Commune
Prévention Maladie à CMV	Bonne efficacité	Bonne efficacité
Survenue d'infection tardive	Commune	Rare
Apparition de Résistance	Non commune	Non commune
Facilité de mise en place	Assez facile	Plus difficile
Prévention d'autres Herpès virus	HSV et VZV	Pas de prévention
Survenue d'autres infections opportunistes	Pourrait prévenir	Inconnu
Coût	Coût du médicament	Coût du suivi
Sécurité	Effets indésirables	Moins de toxicité
Prévention du rejet	Pourrait prévenir	Inconnu
Survie du greffon	Pourrait améliorer	Pourrait améliorer

I.6.2.2. Stratégie curative

Le but d'une stratégie curative est l'obtention d'une diminution de la charge virale sanguine d'au moins 1 log copies ou UI/ml suivant les 2 premières semaines de traitement. Le traitement pourra être interrompu après guérison des signes cliniques et après obtention de 2 PCR CMV sanguines successives (effectuées à au moins 1 semaine d'intervalle) indétectables.

Le ganciclovir est le médicament en première intention utilisé dans un cadre curatif par voie intraveineuse à la posologie de 5 mg/kg/12 h chez l'adulte.

Le valganciclovir en voie orale à la posologie de 900 mg matin et soir, chez l'adulte est utilisé en deuxième intention lorsque l'absorption par voie digestive est tolérée par le patient.

Il existe d'autres alternatives thérapeutiques actuellement disponibles pour traiter une maladie à CMV chez un patient immunodéprimé : le foscarnet et le cidofovir. Ces deux molécules sont dépourvues de toxicité hématologique mais doivent être administrées uniquement par voie IV. Elles ont cependant une néphrotoxicité prouvée ce qui limite beaucoup leur utilisation. La posologie du foscarnet habituellement administrée chez l'adulte est 90 mg/kg/12 h. L'efficacité

du cidofovir n'a été prouvée que dans les rétinites à CMV chez l'adulte séropositif au VIH à la posologie 5 mg/kg/semaine pendant 2 semaines puis 5 mg/kg/14 jours.

Tableau 4 Traitements antiviraux actuellement disponibles pour la prise en charge des infections sévères à cytomégalovirus (CMV) (39).

Molécule	Mode d'action	Posologie en cas de traitement préemptif ou curatif	Mode d'administration	Principaux effets indésirables
Ganciclovir	Inhibition de l'ADN polymérase virale	5 mg/kg/12 h	Intraveineux lent (1 h)	Hématotoxicité, troubles digestifs (diarrhée, douleurs abdominales, anorexie) Autres : fièvre, rash, céphalées, œdème maculaire, dyspnée, altération de la fonction rénale
Valganciclovir	Prodrogue du ganciclovir	900 mg matin et soir	Per os	Idem ganciclovir
Foscarnet	Inhibition de l'ADN polymérase virale	90 mg/kg/12 h	Intraveineux lent (1 h)	Néphrotoxicité (tubulopathie, hypocalcémie, hypokaliémie, hypo ou hyperphosphorémie, exceptionnellement hypercalcémie) Ulcérations génitales (mécanisme caustique) Paresthésies des extrémités
Cidofovir	Inhibition de l'ADN polymérase virale	5 mg/kg à j1, j8 puis tous les 14 jours	Intraveineux lent (1 h)	Troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée), pancréatite Néphrologiques (insuffisance rénale) Atteinte oculaire (uvéite)

I.6.2.3. Stratégie de restauration d'une réponse immunitaire

De nombreuses études ont prouvé qu'un nombre important de patients post-transplantation développent une hypogammaglobulinémie. De ce fait, il a été récemment mis en évidence qu'une hypogammaglobulinémie sévère au cours de la première année post-transplantation augmentait considérablement le risque de développement de maladie à CMV. Chez des receveurs de greffe cardiaque, il a été montré que l'injection d'immunoglobulines CMV extraites et concentrées à partir de plasma humain par voie IV (Ig CMV) pouvait prévenir l'apparition de maladie à CMV. Cependant, en dépit des preuves de thérapie de substitution des IgG chez des greffés cardiaques, le lien entre l'hypogammaglobulinémie et le risque de maladie à CMV reste controversé chez les receveurs de rein et de foie (48). Comme tout traitement issu de produit dérivé du sang, il expose à des risques de transmission d'agents infectieux et de réactions immunitaires post-injection.

I.7. Non-réponse au traitement

I.7.1. Définition

Il arrive dans certains cas qu'une réplication persiste ou s'accroît malgré la mise en place d'un traitement antiviral curatif. On considère qu'il y a une non-réponse au traitement en cours en cas de persistance ou d'augmentation de la virémie sous un traitement antiviral bien conduit pendant au minimum 3 semaines.

Une des premières raisons à envisager en dehors d'un manque d'observance est un sous-dosage de l'antiviral. Il a été prouvé que les concentrations plasmatiques sont un témoin fiable de la forme active en intracellulaire. Une étude a mis en évidence une diminution de la charge virale du CMV inversement proportionnelle à la quantité d'antiviral retrouvée dans le sang. Mais cette analyse a été faite sur seulement deux jours (49). Chez l'adulte, plusieurs études suggèrent une relation entre la concentration plasmatique du ganciclovir et son efficacité thérapeutique. Par exemple il a été mis en évidence une augmentation du risque d'évolution du CMV chez des patients séropositifs au VIH atteints de rétinopathie à CMV lorsque la concentration résiduelle de ganciclovir est inférieure à 0,6 mg/L (50).

I.7.2. Résistance

Si la suspicion de sous dosage d'antiviral est écartée après avoir vérifié que les concentrations circulantes de l'antiviral étaient dans les cibles thérapeutiques, il faut évoquer la présence d'une souche de CMV résistante. Les premières résistances ont été mises en évidence en 1989 avant même que le mécanisme d'action précis du ganciclovir ne soit compris (51).

En effet, l'introduction d'une prophylaxie à base de ganciclovir dans les années 80 a considérablement augmenté la proportion de souches résistantes à cet antiviral. Il a même été prouvé que plus le traitement prophylactique était long, plus le risque d'apparition de résistance était élevé. Cette étude a évalué à 8% le nombre de souches résistantes au ganciclovir chez un groupe traité pendant 3 mois contre 27,5% chez un autre groupe traité 9 mois (52). Ce qui entraîne un cycle pernicieux car nous avons également abordé plus tôt qu'une prophylaxie efficace était une prophylaxie conduite sur plusieurs mois.

Il existe deux méthodes pour mettre en évidence la présence de souches mutées. La méthode phénotypique et la méthode génotypique que nous allons maintenant décrire.

I.7.2.1. Approche phénotypique

La technique consiste à déterminer la concentration en antiviral qui est capable d'inhiber 50% (CI_{50}) de la réplication virale et 90% de la réplication virale (CI_{90}) en culture cellulaire. Cette approche présente de nombreux inconvénients. Premièrement il est indispensable d'avoir isolé la souche virale en culture cellulaire. Les deux types de prélèvements les plus couramment utilisés sont le sang et les urines. Il existe de nombreuses techniques de mesure des CI_{50} et CI_{90} et celles-ci sont souvent mal standardisées ce qui complique les comparaisons de résultats d'une technique à une autre. De ce fait il devient impossible de fixer précisément une CI_{50} ou une CI_{90} seuil. Un consensus a donc été développé, un inoculum standardisé est utilisé et on mesure la réduction en 5-6 jours du nombre de foyers en fonction de la concentration d'antiviral. Le marquage des foyers infectieux se fait par fixation d'un anticorps monoclonal spécifique d'antigènes très précoces du CMV révélé par immunopéroxydase. On détermine ensuite l'indice de sensibilité 50% ou IS50 qui est le rapport entre la CI_{50} de la souche étudiée sur la CI_{50} d'une souche standard (nommée AD169) mesurée au cours de la

même manipulation soit par la moyenne des CI_{50} de souches sensibles isolées testées dans le même laboratoire. On considère qu'une souche testée est résistante lorsque l' IS_{50} est supérieur ou égal à 3. Cette recherche peut s'avérer utile dans un suivi de traitement antiviral, en effet on peut ainsi comparer la souche avant et pendant le traitement. Mais cette technique ne permet pas de mettre en évidence une sous population minoritaire résistante ou bien d'affirmer que la souche isolée dans les prélèvements est bien celle responsable des signes cliniques observés (53). De plus, c'est une technique très longue qui peut s'étaler sur plusieurs mois (51).

I.7.2.2. Approche génotypique

Ce n'est qu'avec l'avènement de cette technique qui séquence l'intégralité des gènes d'intérêt que les mutations conférant une résistance ont pu être mises en évidence.

Cette technique nécessite un échantillon (plasma ou sang total en général) représentatif de la charge virale *in vivo*. Du fait de la réplication tissulaire du CMV, il est parfois utile d'effectuer une recherche de résistance, quand celle-ci est justifiée (persistance de non-réponse avec absence de souche de résistance au niveau sanguin par exemple), au niveau d'une biopsie tissulaire (hépatique, pulmonaire, colique...) ou bien d'un liquide localisé (LCR, humeur aqueuse).

Il faut un prétraitement efficace (extraction de l'ADN, enrichissement, amplification) et un séquençage précis des régions de gènes où se situent les mutations d'intérêt. Pour être cliniquement utile, le délai d'exécution, la complexité logistique et le coût doivent être raisonnables. La sensibilité de détection de souches mutantes diminue avec la charge virale. Voilà pourquoi il est conseillé d'avoir un prélèvement contenant au minimum 1000 à 2000 copies ou UI/mL.

La technique standard consiste en une amplification par PCR des parties d'intérêt des gènes *UL97*, *UL54* et *UL56* principalement, suivie d'un séquençage par méthode Sanger impliquant une électrophorèse capillaire. Les résultats sont confrontés à une base de données automatisée, une bibliothèque, qui répertorie la majeure partie des mutations décrites. En effet les gammes de codons recherchés comprennent en général les parties 440 à 670 du gène *UL97*, 300 à 1000 du gène *UL54* et les parties 229 à 369 d'*UL56*. Ce n'est donc pas une liste totalement exhaustive des mutations connues mais ces gammes couvrent celles les plus fréquentes.

Le séquençage par méthode Sanger est en général bien adapté pour le volume de demandes de recherches de résistance au sein d'un laboratoire de diagnostic. En effet c'est une technique bien standardisée avec un délai d'exécution assez court. Le principal inconvénient est son incapacité à détecter des sous-populations mutantes dont l'abondance est inférieure à environ 20 % de l'ADN total. Des méthodes simples sont disponibles pour détecter ces sous-populations, mais elles sont limitées à des mutations spécifiquement ciblées. Trop de mutations de résistance ont maintenant été documentées pour tester chacune d'entre elles de manière individuelle.

Les séquences des tests génotypiques sont alignées sur celle de la souche référence de CMV (AD169 par exemple) et toutes les substitutions d'acides aminés sont vérifiées par rapport à une base de données des polymorphismes de séquence et des mutations de résistance. La plupart du temps, les mutations de résistance aux antiviraux décrites sont bien distinctes des

mutations de polymorphisme qui se retrouvent naturellement parmi les isolats cliniques de CMV (51).

I.7.2.3. Gènes concernés et mutations associées

Le gène principal qui concerné par des mutations qui confèrent à la souche une résistance est l'*UL97* codant la protéine kinase virale indispensable à l'activation du ganciclovir comme expliqué précédemment. Il est composé de 707 acides aminés répartis en onze sous domaines (54).

Cette découverte a été possible grâce à l'isolement d'une souche qui avait résisté au ganciclovir et chez laquelle avait mis en évidence une délétion de codon sur le gène *UL97* (A591del4). Cette mutation cependant ne fait pas partie des plus communes mais a permis d'attirer l'attention sur ce gène comme principale cible de mutations. Dans les années qui ont suivi cette découverte, les codons 460, 520 et 590-607 ont été identifiés comme ceux les plus fréquemment mutés (elles représentent ensemble plus de 80% des mutations retrouvées). Ces mutations augmentent de 5 à 15 fois la CI50 des souches concernées. Il est supposé que le mécanisme de résistance associé à ces mutations soit une diminution de spécificité de l'enzyme pour son substrat avec conservation cependant de ses diverses fonctions kinases, cette supposition a été confirmée chez quelques mutations grâce à la mise en évidence de l'autophosphorylation d'enzyme mutées. Plus récemment, des recherches se sont intéressées à la partie du gène en amont de la 460 qui code des motifs kinases notamment la boucle P liant l'ATP et le site actif catalytique K355. Certaines mutations ont été identifiées comme conférant une résistance par altération de l'activité de la protéine kinase. Mais malgré cette activité enzymatique diminuée qui a priori pourrait perturber le cycle de réplication, il a été mis en évidence une persistance de la réplication virale.

Des mutations au niveau des positions 409 et 411 (T409M et H411Y) ont été observées après un traitement par maribavir. Elles correspondent aux sites de liaison de l'ATP de la kinase *UL97* et c'est précisément la zone où le maribavir se lie de manière compétitive. Une mutation à ce niveau ne confère pas résistance croisée au ganciclovir. Les mutations usuelles d'*UL97* entraînant une résistance au ganciclovir n'entraînent pas de résistance croisée au maribavir.

La figure 13 répertorie toutes les positions des mutations les plus fréquentes sur le gène *UL97*. Le principal intérêt du foscarnet et du cidofovir est d'avoir une activité antivirale préservée vis-à-vis des souches résistantes mutées au niveau du gène *UL97*. Elles exposent le patient, en revanche, à un risque potentiel de sélection de mutations sur le gène *UL54*.

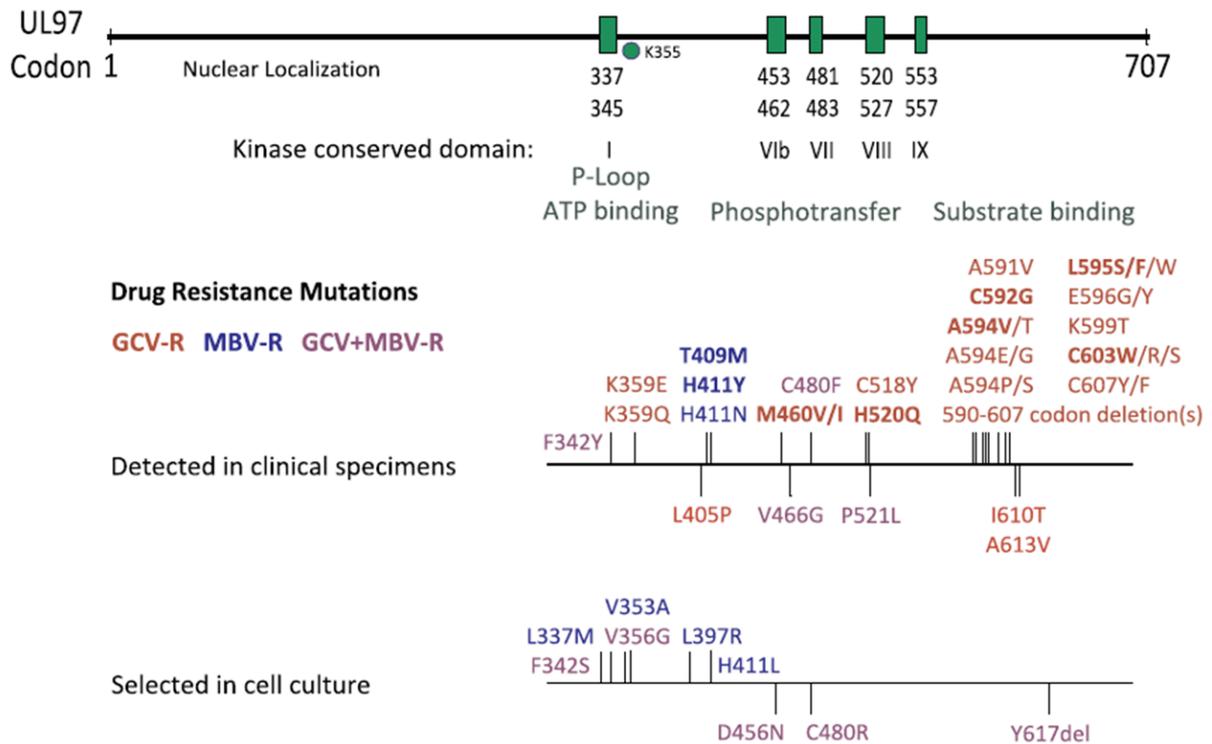


Figure 13 Mutations retrouvées sur le gène *UL97* (51) avec les plus fréquentes en gras

La deuxième région où les mutations confèrent une résistance aux différents traitements est le gène *UL54* codant l'ADN polymérase largement ciblée par les différentes molécules décrites précédemment, les mutations retrouvées sur ce gène sont rarement détectées en premier, elle s'ajoutent aux mutations sur le gène *UL97* (54). Les deux molécules d'intérêt qui dépendent uniquement de ce gène sont le foscarnet et le cidofovir pour assurer leur activité antivirale. Une mutation sur ce gène peut conférer une résistance au ganciclovir, au foscarnet ou au cidofovir mais il peut s'agir également d'une résistance croisée. Par exemple, une mutation au niveau de l'exonucléase en position 408 (N408K) va augmenter la CI50 d'un facteur 3 pour le ganciclovir et 20 pour le cidofovir. Au niveau de mécanisme d'action, il est supposé que les mutations au niveau de l'exonucléase vont permettre au complexe enzymatique de la polymérase de shunter le blocage de la réplication de l'ADN imposé le ganciclovir ou le cidofovir.

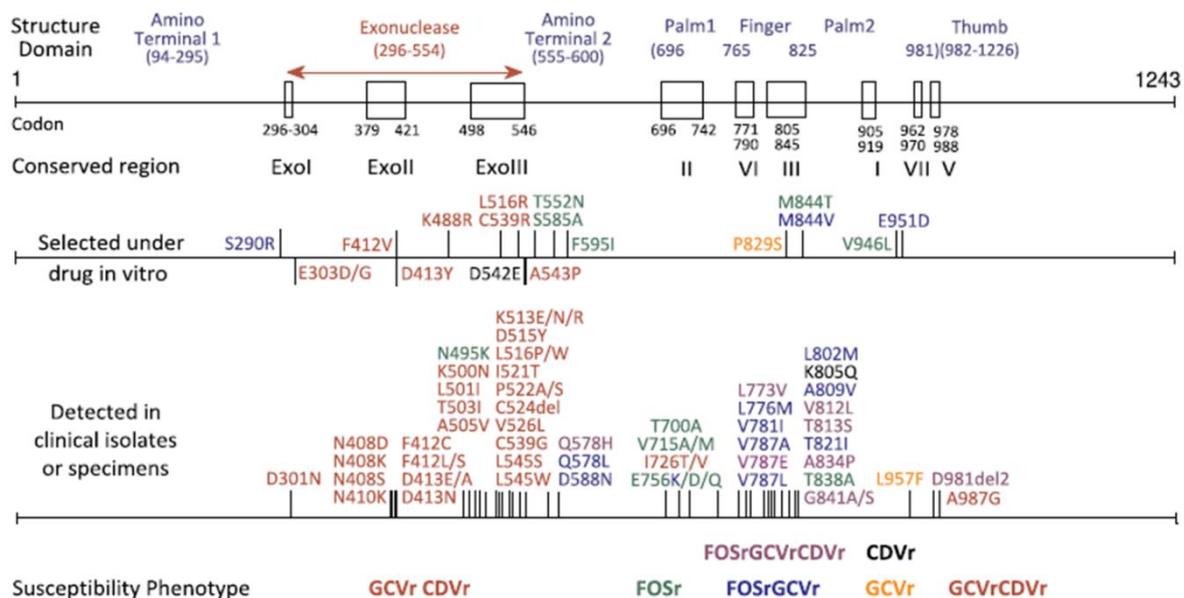


Figure 14 Mutations retrouvées sur le gène *UL54* (51) Nous pouvons remarquer ici que les mutations confèrent, dans la majeure partie des cas, à la souche des résistances croisées (à 2 voir 3 antiviraux).

Parmi les nombreux composés indispensables à la réplication virale et qui sont des potentielles cibles thérapeutiques notamment pour le létermovir et ce qui génère par conséquent des mutations, on peut évoquer les éléments du complexe terminase responsable du clivage de l'ADN viral nouvellement répliqué et de son encapsidation. Ce complexe est codé par les gènes *UL56*, *UL89* et *UL51*, il agit avec des éléments codés par d'autres gènes tels que l'*UL104*. Les principales mutations de résistance qui ont été mises en évidence dans ce complexe sont sur les gènes *UL56* et *UL89*. La principale caractéristique est que plusieurs substitutions différentes de nucléotides simples au niveau du codon 325 de l'*UL56* confèrent une résistance absolue au létermovir avec une CI50 augmentée 3000 fois. Cependant, cette résistance ne semble pas altérer la capacité de réplication virale. De nombreuses études *in vitro* ont mis en évidence la diversité des mutations génétiques qui concernent le gène *UL56* (51).

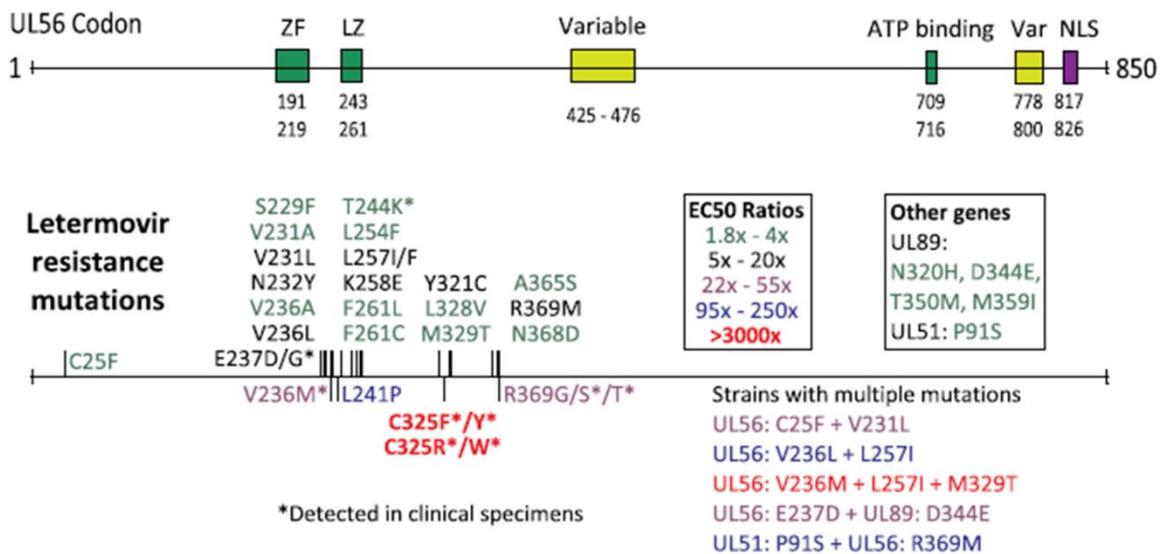


Figure 15 Mutations retrouvées sur le gène *UL56* (51)

L'algorithme suivant est issu des recommandations du troisième consensus international de la gestion du CMV chez les patients transplantés d'organes solides. Il propose une stratégie à suivre lors d'une non réponse à traitement antiviral mis en place.

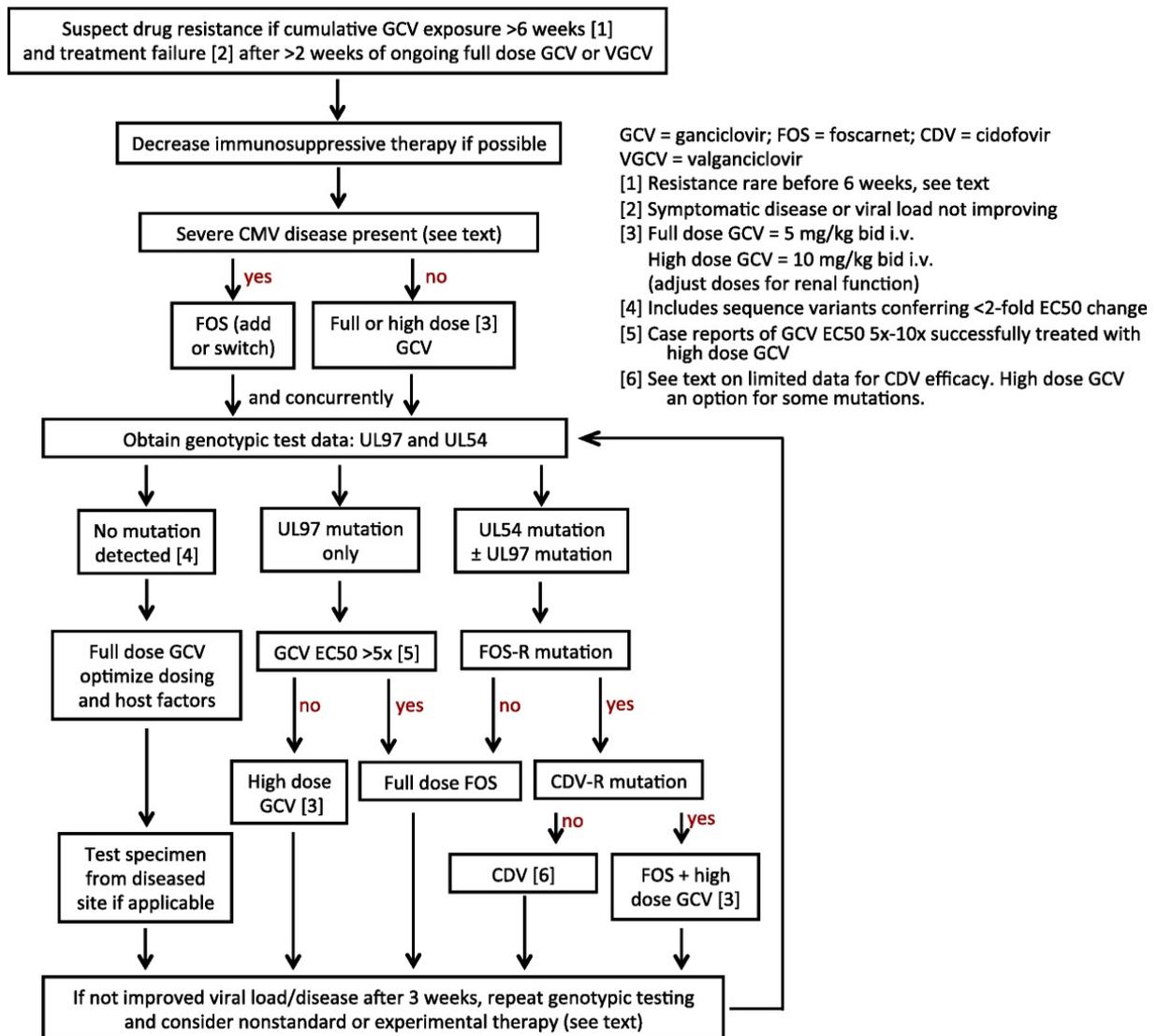


Figure 16 Recommendations proposées lors d'une suspicion de résistance (48)

I.8. Rôle de la surveillance immunologique

Nous savons maintenant que la capacité d'un sujet à maîtriser la réplication virale du CMV dépend de sa réponse immunitaire. De ce fait, il a été pensé que des méthodes de surveillance de la réponse immunitaire adaptative au CMV pouvaient permettre l'identification précoce de patients qui risquaient de développer une réplication virale. Le monitoring immunitaire des réponses des cellules T spécifiques au CMV va permettre de prédire la présence ou l'absence de réponse immunitaire et donc de prédire si un patient présente un risque accru de maladie à CMV après la greffe, ce qui est utile pour orienter la prophylaxie et les thérapies préemptives. Plusieurs tests ont été développés, nombreux sont maintenant passés du cadre expérimental à la pratique clinique. La stratégie la plus utilisée repose sur la détection de l'IFN- γ après stimulation des cellules mononucléaires du sang total ou du sang périphérique avec des antigènes spécifiques du CMV. S'ajoute à l'IFN- γ , d'autres marqueurs, tels l'IL-2, le TNF- α , le CD107, le PD-1 (*programmed death*) et le CD154 sont utilisés pour corrélérer la réponse des cellules T spécifiques du CMV avec le risque d'infection à CMV.

Le groupe d'experts qui a travaillé pour émettre des recommandations lors du dernier consensus international a estimé que le test idéal devait fournir des informations quantitatives et mais aussi fonctionnelles sur les cellules T CD4+ et CD8+ spécifiques du CMV. Il faut également que le test soit peu coûteux, standardisé et facilement réalisable (48). Le tableau 5 résume les avantages et les inconvénients de tous les tests disponibles à ce jour.

Tableau 5 Comparaison des tests immunologiques développés (48)

Assay	Advantages	Limitations	Comments	Predict viremia	Predict disease
ICS	Whole blood assay with low blood volume (1 mL) or PBMC Short incubation time Results available after 8 hours Identification of CD4+ and CD8+ T cells Knowledge of HLA not necessarily required Quantitative and qualitative characterization	Needs access to a flow cytometer Not standardized	Most data available with this technique Potential to freeze PBMCs and ship to reference lab for testing	Yes	Yes
QuantiFERON-CMV (Qiagen, USA)	Whole blood assay with low blood volume (3 mL) Simple to perform Results available after 30-40 hours Can be done in any center and stimulated plasma can be sent to reference lab	CD8+ responses only. Sensitive to lymphopenia. Rare patients whose HLA types are not covered in assay	Approved in Europe	Yes	Yes
ELISpot	Identifies both CD4+/CD8+ T cells Knowledge of HLA not necessarily required Results available after 30-40 hours	Need for purified PBMC from 10 mL blood (in reality 5-10 mL) Cannot differentiate CD4+ and CD8+ T cells Not standardized	Potential to freeze PBMCs and ship to reference lab for testing; Commercial availability (T-Track CMV, Lophius CE marked in Europe; T-SPOT.CMV is LDT in U.S.) and CE marked in Europe	Yes	Yes
MHC multimer staining	Fast assay (1-2 h) Whole blood assay with low blood volume (0.5-1 mL) or PBMC	CD8+ responses only Needs access to a flow cytometer HLA and epitope-specific. No information about function unless combined with ICS Not standardized	Unlikely to be used on a widespread basis	No, Only in combination with functional or phenotypical markers	No

I.8.1. Test QuantiFERON™ QIAGEN®

Le test QuantiFERON™ CMV est un kit disponible dans le commerce, bénéficiant d'un marquage CE. Il n'a pas reçu l'autorisation de la FDA et n'est disponible qu'à des fins expérimentales aux États-Unis. Il s'agit d'un test immuno-enzymatique (ELISA) basé sur la libération d'IFN-γ détectant les cellules T CD8 après stimulation antigénique. Ce test proposé pour prédire l'apparition d'une infection à CMV, utilise 3 tubes spécifiques d'environ 1 mL. La surface interne de ces tubes est couverte de peptides qui vont stimuler les épitopes CD8+ spécifiques des protéines du CMV. Ce tube est nommé familièrement le tube Antigène. Les deux autres tubes sont des tubes de contrôle. L'un est un témoin négatif dit tube Nul dépourvu de tout épitope, sa valeur doit rester nulle. Et l'autre est un tube témoin de la réponse immunitaire cellulaire du patient, il fait office de contrôle positif, c'est le tube dit Mitogène (55). Une fois les tubes remplis de sang, une dizaine d'agitation est nécessaire afin que la totalité du sang ait recouvert la paroi du tube pour que tous les antigènes soient dissous. Les tubes sont incubés à 37°C (dans un délai de 16h) entre 16 et 24h. Après incubation les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes (après cette étape ils sont stables 28 jours s'ils sont conservés entre 2 et 8°C)), le plasma est testé avec un kit (QuantiFERON™ CMV ELISA, Europe) sur

l'automate d'immuno-analyse Etimax 3000 (Diasorin) ou plus récemment Liaison XL (Diasorin). Pour qu'un résultat soit exploitable, le tube nul doit rester négatif ($< 0,2$ UI/mL). La réponse au Mitogène évalue la réponse immunitaire cellulaire, une réponse est dite positive lorsque le résultat était supérieur à $0,5$ UI/mL. Le tube antigène évalue la réponse spécifique contre le CMV, il est positif lorsque sa valeur est supérieure à $0,2$ UI/mL selon les recommandations du fabricant. Les trois résultats des tubes s'interprètent dans la globalité avec plusieurs règles à respecter (56).

En effet pour qu'une absence de réponse spécifique au CMV soit prouvée, le tube antigène doit rester négatif mais pas seulement. Il faut que le tube Mitogène ait une valeur supérieure à $0,5$ UI/mL, ceci est une preuve que l'incubation ait été bien effectuée, le test est donc validé techniquement. En revanche une détection de réponse immunitaire spécifique est validée dès que la valeur de l'antigène est positive peu importe celle du Mitogène. Si la valeur du Mitogène n'est pas positive, deux hypothèses sont alors à envisager, soit le test n'a pas été bien incubé, soit le patient est incapable de fournir une réponse immunitaire cellulaire, qu'elle soit globale ou spécifique. C'est le principal inconvénient de ce test. En effet cela provoque des difficultés d'interprétation. La non-réponse au Mitogène peut potentiellement être un marqueur de l'immunosuppression cellulaire, et a été associée à une incidence plus élevée de maladie à CMV. Enfin la sensibilité du test diminue chez les patients lymphopéniques car il faut un nombre adéquat de cellules est nécessaire pour la production d'IFN- γ (48) .

Certaines conditions rendent le test invalide : en effet un délai trop long avant l'incubation va rendre des résultats incohérents et un mélange trop brutal va libérer mécaniquement de l'interféron ce que faussera le résultat. Le seul moyen de remédier à ces erreurs est de bien insister sur les conditions pré-analytiques idéales auprès des préleveurs.

Tableau 6 Principe d'interprétation des résultats du QuantiFERON™ CMV (57)

Valeur Antigène (UI/mL)	Valeur Mitogène (UI/mL)	Résultat	Interprétation
$< 0,2$	$\geq 0,5$	Négatif	Absence de réponse immunitaire spécifique au CMV
$\geq 0,2$	Toutes	Positif	Réponse immunitaire spécifique au CMV détectée
$< 0,2$	$< 0,5$	Mitogène non répondeur	Détection de réponse immunitaire impossible (cellulaire globale et spécifique)

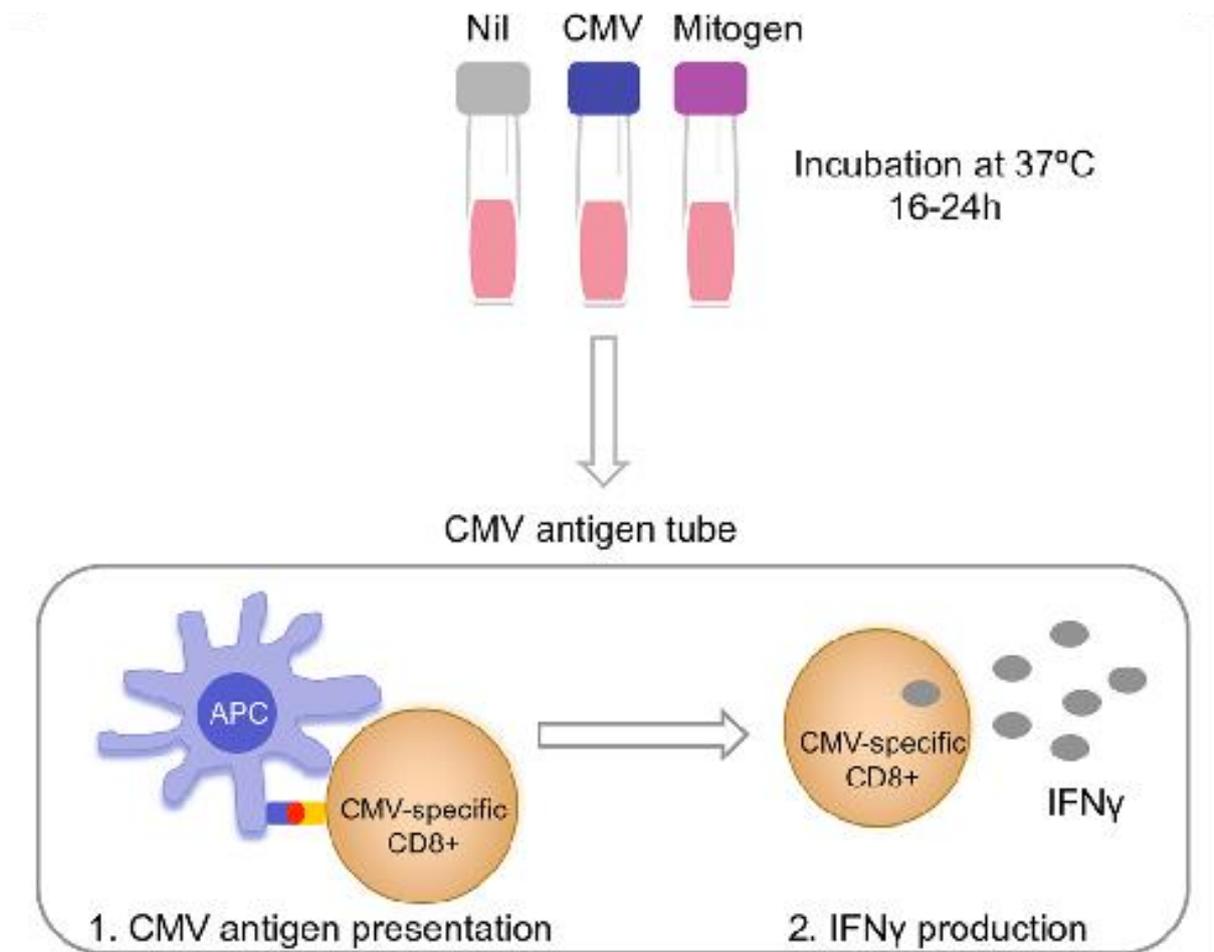


Figure 17 Représentation schématique du test QuantiFERON™ (58)

I.8.2. ELISpot

Le test ELISpot (enzyme-linked immunosorbent spot) quantifie les cellules T CD4+ et CD8+ produisant de l'IFN- γ en réponse au CMV. Les cellules de l'échantillon sont stimulées par des peptides spécifiques du CMV ou des lysats d'antigènes entiers, l'IFN- γ est ensuite capturé, détecté et quantifié à l'aide d'un marquage grâce à un anticorps. A l'instar du test QuantiFERON™ un contrôle Mitogène indique la réactivité générale des cellules T. Le test ELISpot ne peut pas différencier les cellules T CD4+ et CD8+. Deux tests ont reçu le marquage CE : T-Track CMV (Lophius Biosciences, Allemagne) et T-SPOT.CMV (Oxford Immunotec, Royaume-Uni) (48).

I.8.3. ICS

De nombreuses études qui se sont intéressées à la réponse des cellules T spécifiques au CMV ont utilisé la coloration intracellulaire des cytokines (ICS) de l'IFN- γ en utilisant la cytométrie de flux. Les cellules stimulées sont colorées avec des fluorochromes dirigés contre l'IFN- γ . Cette technique est rapide, polyvalente et peut être étendue à d'autres cytokines et molécules de la surface cellulaire. Contrairement aux tests ELISpot ou QuantiFERON™, l'ICS peut donc fournir les caractéristiques quantitatives et qualitatives des cellules T spécifiques du CMV (48).

I.8.4. Tests basés sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Les tests basés sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) colorent directement les cellules T spécifiques des peptides en utilisant des tétramères ou pentamères CMH de classe I conjugués à des peptides. Ils peuvent déterminer les réponses des cellules T CD8 mais sont spécifiques de l'épitope, En revanche il est nécessaire de connaître le typage HLA du patient. Il a été démontré que les tests multimères ne permettent de prédire la virémie du CMV que lorsqu'ils sont combinés à l'analyse de marqueurs de surface, tels que le PD-1 évoqué plus haut.

Enfin ces deux dernières techniques nécessitent un cytomètre en flux ce qui peut limiter leur utilisation généralisée dans les centres de diagnostic (48).

I.8.5. Numération des lymphocytes et tests d'immunité non spécifique

La lymphopénie, qui est un biomarqueur couramment utilisé dans la pratique clinique, comme facteur de risque de développement d'une infection à CMV a été évaluée dans sa capacité de prédiction. Dans une analyse multivariée, la lymphopénie pré transplantation était le plus fort prédicteur non spécifique du CMV parmi 276 patients ayant subi une greffe (48). Ce paramètre est très facilement réalisable puisqu'il est dosé à chaque NFS demandée, l'évolution peut être suivie de manière rapprochée et quantifiée ce qui en fait un bon paramètre.

Des tests de fonction immunitaire sont également disponibles. Par exemple, le test ImmuKnow (Cylex/Viracor-Eurofins, USA) n'est pas spécifique du CMV, il est disponible dans le commerce aux États-Unis ainsi que dans certains pays européens. Il mesure la fonction immunitaire cellulaire et sert de marqueur d'immunosuppression en déterminant la quantité d'ATP produite par les cellules T CD4+ en réponse à une stimulation du sang total par la phytohémagglutinine. Toutefois, aucune étude n'indique que ce test soit prédictif d'une éventuelle réplication CMV. Il n'y a donc pas suffisamment de preuves pour recommander ce test dans le cadre d'un patient susceptible de développer une réplication à CMV (48).

I.8.6. Valeur clinique du test QuantiFERON™

Notre étude se base sur le test QuantiFERON™.

En 2019, une étude randomisée australienne a étudié l'intérêt du test QuantiFERON™ CMV dans la durée du traitement prophylactique chez des patients à haut risque de développer une infection à CMV post-greffe pulmonaire. Les patients étaient séparés en deux groupes, l'un bénéficiait d'une prophylaxie de 5 mois et l'autre avait une durée de prophylaxie qui s'étendait de 5 à 11 mois en fonction de la réponse de leur test QuantiFERON™. Si celui-ci était positif, la prophylaxie était stoppée, si celui-ci était négatif elle était poursuivie. Les résultats ont mis en évidence une incidence d'infection à CMV moindre dans le bras géré par le test QuantiFERON™ (37% versus 58%). Il a aussi été mis en évidence que parmi les patients qui avaient arrêté la prophylaxie à 5 mois, l'incidence d'une infection à CMV était significativement moins élevée chez les patients qui avaient eu un test QuantiFERON™ positif (13% versus 67%). Ce qui a permis de conclure qu'une surveillance par le QuantiFERON™ pouvait rendre possible une stratégie prophylactique individuelle plus efficace notamment dans la durée de l'exposition à l'antiviral. Les valeurs prédictives négatives et positives du QuantiFERON™ ayant été très utiles dans la gestion de la durée de la prophylaxie (59).

Le test QuantiFERON™ se révèle donc être un outil de taille dans la prédiction de la réponse immunitaire de l'hôte face au CMV. Cependant peu d'études se sont intéressées à sa valeur

et à son utilité chez les populations de patients greffés qui ne répondaient pas au traitement antiviral mis en place ainsi qu'à une éventuelle différence d'efficacité entre une population porteuse d'une souche résistante versus une population non porteuse. C'est ce que nous avons voulu expérimenter à travers une étude rétrospective que nous allons maintenant aborder.

II. Partie 2 : Etude rétrospective

II.1. Introduction à l'étude

Le CNR des Herpèsvirus du CHU de Limoges reçoit de toute la France chaque année des demandes recherche de résistance et de test QuantiFERON™ pour des patients transplantés et immunodéprimés non-répondeurs au traitement antiviral. La définition de la non-réponse qui a été retenue est une persistance de réplication pendant plus de 3 semaines consécutives sous traitement antiviral bien conduit peu importe les antécédents. Comme nous l'avons décrit, la non-réponse peut être expliquée par une souche résistante ou non.

Le but de cette étude a été d'évaluer de manière rétrospective la capacité du test QuantiFERON™ à prédire l'évolution de l'infection au sein de cette population de non-répondeurs tout en séparant les résistants des non résistants que nous nommerons réfractaires.

Introduction

Le Cytomégalovirus Humain (HCMV) ou Herpes Virus Humain 5 (HHV5), est le virus le plus fréquemment impliqué dans les complications infectieuses post transplantation. Il a été prouvé que l'un des facteurs de risque de développer une réplication virale était un système immunitaire altéré, notamment par les traitements immunosuppresseurs (60). Parmi les autres facteurs de risque, nous pouvons citer l'âge, le type de greffe et la combinaison des statuts sérologiques donneur séropositif et receveur séronégatif (D+/-) (61). Depuis quelques années, des stratégies de prophylaxie antivirale ont été mises en place (ganciclovir et aciclovir) ce qui a contribué à diminuer significativement l'apparition de maladie à CMV et la virémie moyenne des patients atteints d'une infection à CMV (62). Mais le traitement antiviral au long court est un facteur favorisant la sélection de souches porteuses de mutations permettant de résister aux traitements (52) ce qui a complexifié les stratégies thérapeutiques. Dans le but de mieux comprendre les facteurs de non réponse au traitement, il a été développé depuis quelques années des tests immunologiques capables d'évaluer la réponse immunitaire de l'hôte face au CMV afin de savoir s'il était en mesure de contrôler sa réplication ou si il fallait explorer d'autres étiologies. Dans cette étude, nous avons voulu déterminer chez les patients présentant une non-réponse aux antiviraux (charge virale persistante sous traitement antiviral) la capacité du test immunologique QuantiFERON™ CMV à prédire l'évolution de l'infection.

II.2. Matériels et Méthodes

II.2.1. Recrutement population et définitions des termes

La population étudiée a été recrutée de manière prospective par le CNR Herpèsvirus de Limoges de 2014 à 2019. En effet il a été proposé chez tous les patients transplantés étiquetés « non répondeurs » (persistance d'une réplication pendant plus de 3 semaines sous traitement antiviral bien conduit peu importe les antécédents) à la suite d'un traitement antiviral d'associer la recherche de résistance à un test QuantiFERON™ CMV dans un délai d'un mois autour de la recherche pour documenter la réponse immunitaire du sujet. Au total, 81 patients transplantés avec une charge virale CMV non contrôlée par un traitement antiviral, originaires de 18 centres différents ont eu entre 2014 et 2019 une recherche de résistance associée à un test QuantiFERON™ CMV contemporain.

Ces patients ont ensuite été répartis en deux groupes : résistants et réfractaires. Ce statut a été défini par les résultats de la recherche de résistance. Les patients dont la recherche de résistance s'est avérée positive ont été définis comme le groupe « Résistants » et ceux dont la recherche de résistance était négative étaient définis comme le groupe « Réfractaires ».

L'évolution post test QuantiFERON™ a été définie de la manière suivante :

Une « Réponse » à la stratégie mise en place après retour du génotypage et du QuantiFERON™ à trois et six mois est définie selon les critères du CNR sur la base de l'analyse des cohortes françaises comme : diminution d'au moins deux log copies ou UI/mL de la charge virale CMV sur une durée de trois semaines ou négativation de la charge virale sur deux PCR consécutives.

Une « Non réponse » ou une rechute est définie comme la persistance pendant trois semaines d'une charge virale détectable sous traitement bien conduit (dose adaptée et bonne

observance) ou l'augmentation significative de la charge virale sur trois semaines sous traitement à partir de la troisième semaine.

II.2.2. Recherche de résistance

La recherche de résistance par approche génotypique s'effectue par un génotypage qui séquence l'intégralité des gènes *UL97* codant la kinase virale et *UL54* codant l'ADN polymérase par méthode Sanger. Cette méthode a l'avantage de détecter toutes les mutations de résistance. On compare ensuite les séquences à une base de données du CNR Herpèsvirus qui répertorie toutes les mutations connues.

II.2.3. Test immunologique

Le test utilisé pour contrôler l'état de la réponse cellulaire T spécifique était le QuantiFERON™ CMV (Qiagen), qui est un test marqué CE. Il détecte la production de l'interféron (INF) gamma relargué par les lymphocytes CD8+ après stimulation via une technique ELISA. Ce test comporte trois tubes, le premier tube contient des antigènes de CMV (tube Antigène), le deuxième des antigènes non spécifiques du CMV (tube Mitogène) et le dernier tube est dépourvu d'antigène (tube nul). Une fois les tubes remplis de sang, ils sont incubés à 37°C entre 16 et 24h. Après incubation les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes, l'interféron est dosé dans le plasma sur l'automate d'immuno-analyse Etimax 3000 (Diasorin). Pour qu'un résultat soit exploitable, le tube nul doit rester négatif (< 0,2 UI/mL). Le tube Mitogène évalue la réponse immunitaire cellulaire, une réponse est dite positive lorsque le résultat était supérieur à 0,5 UI/mL. Le tube antigène évalue la réponse spécifique contre le CMV, il est positif lorsque sa valeur est supérieure à 0,2 UI/mL.

II.2.4. Test statistiques

Les valeurs des populations étaient comparées grâce au test de Student avec un risque de 5%, qui est capable de poser l'hypothèse d'une différence entre deux moyennes de deux groupes non appariés. Pour pouvoir comparer les deux moyennes, l'homogénéité des deux variances devait être prouvée par le test de Fisher.

Pour vérifier l'homogénéité des effectifs c'est le test du Khi 2 qui a été utilisé avec comme condition que tous les effectifs soient supérieurs à 5.

Après avoir comparé la charge virale moyenne (en log UI/mL), l'âge moyen (en années) et les valeurs moyennes des Antigène et Mitogène (en UI/mL) des tests QuantiFERON™ des deux groupes entre eux, nous avons voulu dans un deuxième temps voir si le test QuantiFERON™ était capable de prédire une évolution favorable ou défavorable à 3 et 6 mois. Pour ce faire, nous avons décidé de calculer la VPP (valeur prédictive positive) c'est-à-dire, sur tous les QuantiFERON™ positifs, combien ont une évolution favorable ou « réponse » à 3 ou 6 mois. Et la VPN (valeur prédictive négative) c'est-à-dire, sur tous les tests négatifs, combien ont une absence d'évolution favorable (non réponse) à trois et six mois et de les comparer.

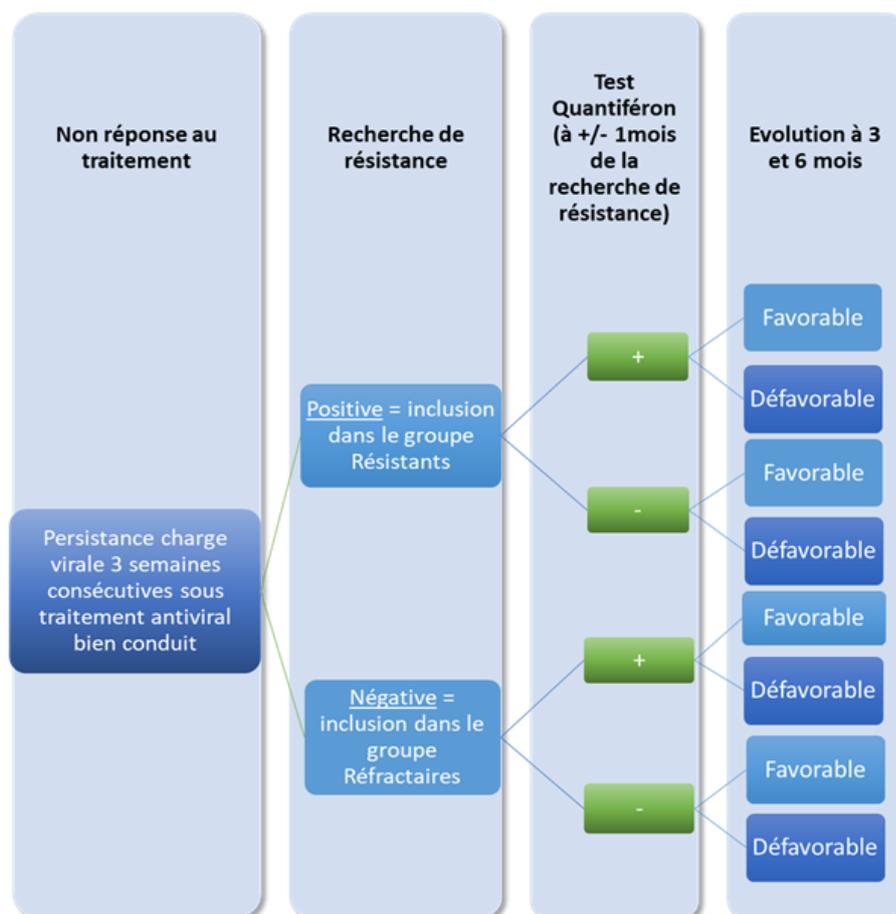


Figure 18 Design de l'étude

II.2.5. Charge virale

Les évolutions des charges virales ont été demandées *a posteriori* aux prescripteurs pour évaluer l'évolution à 3 et 6 mois après la date de prélèvement du premier Quantiféron™ du patient. La virémie est déterminée par une PCR quantitative standardisée avec des résultats en UI/mL et en copies/mL ce qui permet de comparer les données entre les différents centres.

II.3. Résultats

II.3.1. Analyse descriptive de la population

La population totale analysée comporte 81 patients. Une mutation responsable de résistance a été trouvée pour 42 d'entre eux : ils ont été associés au groupe « Résistants », les 39 autres ont été inclus dans le groupe « Réfractaires ».

II.3.2. Description des mutations retrouvées chez les résistantes

Parmi les 42 patients résistants, 28 avaient une mutation au niveau du gène *UL97*, 5 sur le gène *UL54* et 9 sur les deux (Fig. 18). Pour le gène *UL97*, la mutation la plus régulièrement trouvée est l'alanine remplacée par la valine en position 594 (11 mutations sur 30) (Tableau 7). On retrouve dans notre population plusieurs autres mutations comme la substitution de la leucine par la serine, la phénylalanine ou la tyrosine en position 595. Il y a également plusieurs substitutions trouvées au niveau de la méthionine en position 460 qui appartient au sous

domaine VI. Pour le gène *UL54*, il n'y a pas de mutation prédominante retrouvée dans notre groupe. Toutes les résistantes retrouvées excepté la Cys592Gly, sont des résistances dites de haut niveau (CI_{50} multipliée entre 5 et 15 fois contre moins de 5 fois pour Cys592Gly).

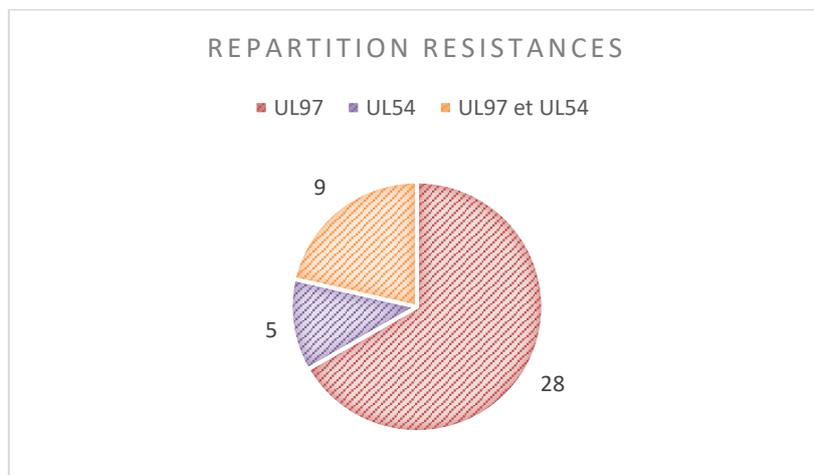


Figure 19 Répartition des résistances retrouvées dans le groupe "Résistants"

Tableau 7 Détail de l'ensemble des mutations retrouvées dans le groupe "Résistants" * : *bas niveau de résistance surmontée par une augmentation de Ganciclovir, résistance au GCV (ganciclovir), résistance au MBV (maribavir), résistance au FOS (foscarnet), résistance au GCV FOS et CDV (cidofovir), résistance au GCV CDV*

UL97	Effectif	UL54	Effectif	UL97 et UL54	Effectif
Ala594Val	9	Thr700Ala	1	Ala594Val et Pro522Ser	2
Leu595Ser	7	Ala809Val	1	Cys603Trp et Pro522Ser	1
Cys603Trp	3	Gly841Ala	1	Cys603Trp et Leu545Ser	1
Met460Val	3	His520Gln	1	Cys603Trp et Lys513Asn	1
Thr409Met	2	Thr503Ile	1	Met460Ile Lys513Asn	1
Met460Ile	1			Cys603Arg et Lys513Arg	1
Leu595Try	1			His520Gln et Asp515Tyr	1
Cys592Gly*	1			Leu595Ser et Pro522Ser	1
Leu595Phe	1				

II.3.3. Caractérisation des populations

II.3.3.1. Analyse de la population globale (résistants versus réfractaires)

Les paramètres des deux groupes sont décrits dans le tableau 8. La greffe rénale représente environ la moitié de chaque effectif (27 patients vs 18). Un test d'homogénéité Khi 2 (Khi 2

calculé = 2,69 < Khi 2 observé à 5% = 3,84) confirme que les proportions de greffés rénaux dans les deux groupes sont homogènes.

Tableau 8 Résultats des paramètres comparés groupe résistants vs groupe réfractaires (RR : recherche résistance) (1) 8 Valeurs manquantes, (2) 10 Valeurs manquantes, (3) 4 Valeurs manquantes, (4) 6 Valeurs manquantes, * différence statistique

	RESISTANTS (N=42)	REFRACTAIRES (N=39)
AGE (ANS)	55,81 (9,32)	56,72 (13,25)
HOMME	28 (66.67%)	27 (69,2%)
STATUT CMV		
D+/-	14	15
D+/+	4	6
D-/-	2	2
D+/?	0	1
D-/+	0	1
D ?/+	0	1
D-/?	2	0
INCONNU	20	13
TYPE DE GREFFE		
REIN	27 (64,3%)	18 (46,1%)
CŒUR	3 (7,1%)	6 (15,4%)
POUMON	5 (11,9%)	1 (2,6%)
FOIE	4 (9,5%)	6 (15,4%)
CSH	3 (7,1%)	8 (20,5%)
MOYENNE VIREMIE (UI/ML) *	3,92 (1,25) ⁽¹⁾	3,06 (1,45) ⁽²⁾
DELAIS GREFFE/RR (JOURS)	202,1 (147,5) ⁽³⁾	242,8 (192) ⁽⁴⁾

En utilisant un test Fisher pour montrer l'homogénéité de nos variances et un test de Student pour comparer nos valeurs moyennes entre deux groupes, nous avons mis en évidence à un risque de 5% en unilatéral une charge virale moyenne, chez les résistants supérieure, à celle des réfractaires (p-value : 0,008). Les autres paramètres (Age, Valeur moyenne Antigène et valeur moyenne Mitogène) après tests de Student n'ont pas mis en évidence d'autres différences statistiques.

Nous avons comparé au sein des deux populations la distribution des valeurs des réponses Antigène et Mitogène (Fig 20). Nous savons que le signal du test au-delà d'une valeur de 1 UI/mL est saturé (selon les données fabricants). Cependant, en comparant des valeurs qui ont été réalisées dans les mêmes conditions, nous pouvons apprécier des tendances semi-quantitatives sans se prononcer sur des valeurs numériques précises.

Au niveau de la réponse Mitogène on voit que les deux distributions des valeurs semblent homogènes, en effet 90% des valeurs se situent sensiblement entre les mêmes écarts. En revanche on observe une tendance lorsque l'on confronte les valeurs de la réponse Antigène, la distribution des valeurs du groupe Réfractaire (Rf) s'étend sur des valeurs plus élevées que celle du groupes Résistant (Rs).

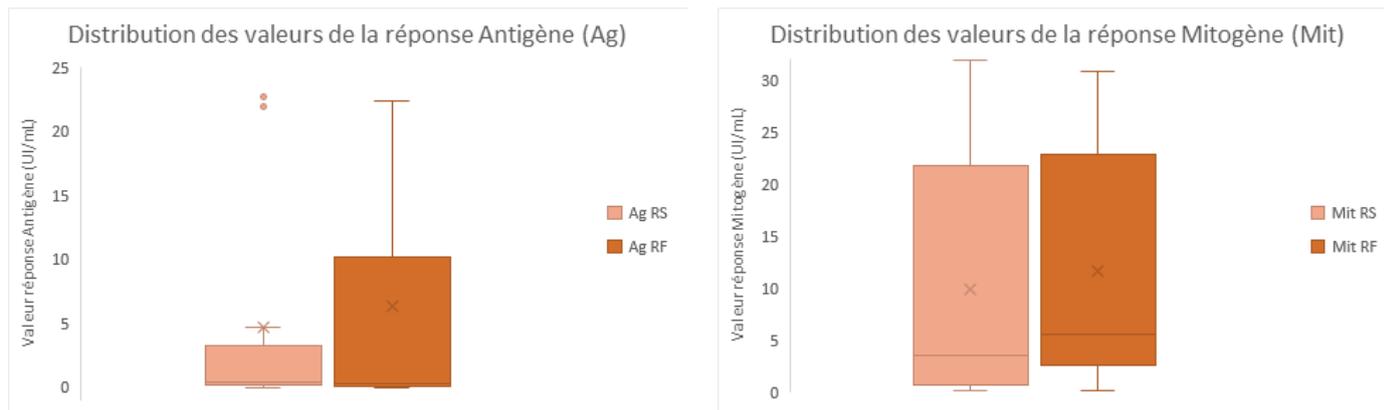


Figure 20 Distribution des valeurs des réponses Antigène et Mitogène Résistants (RS) versus Réfractaires (Rf)

Nous avons regardé également si l'apparition d'une non-réponse à un traitement antiviral était plus précoce chez les patients résistants que chez les patients réfractaires. Pour ce faire nous avons calculé le délai entre la date de la greffe et la date de la première recherche de résistance (correspondant à une non-réponse à un traitement antiviral puisqu'il s'agit d'un envoi au CNR après demande d'avis). Malgré un test de Fisher montrant que les variances étaient homogènes, il n'y pas de différence statistique entre les deux délais (p value à 0,12). Nous observons une tendance qui se profile : les patients qui ont été étiquetés résistants ont un délai d'apparition de non réponse probablement plus court que ceux pour lesquels la recherche de résistance est restée négative.

Pour les résultats du QuantiFERON™ CMV dans le groupe des résistants, il y a eu 22 positifs, 12 négatifs, 8 Mitogènes non répondeur (NR) qualifiés d'indéterminés (Tableau 9). Les Mitogènes non répondeurs traduisent une absence totale d'immunité (cellulaire globale et spécifique). Compte tenu du fait que les centres qui envoyaient les tests confirmaient que l'incubation avait été bien menée, on peut exclure l'hypothèse d'un test non fonctionnel. Chez les réfractaires il y a eu 16 positifs, 13 négatifs et 10 Mitogène non répondeur (indéterminés).

Un test d'homogénéité Khi 2 a révélé un Khi observé à 0,888 (Valeur théorique avec 4 ddl et risque 5% = 14,86), ce qui rend ces deux populations homogènes dans les proportions des résultats des QuantiFERON™, donc comparables.

Enfin, les évolutions à trois et six mois favorables (absence de répllication ou baisse de la charge virale de 2 log) ou défavorables (augmentation ou persistance de charge virale) n'ont pas différencié entre les groupes.

Tableau 9 Résultats Test QuantiFERON™ des deux groupes

	RESULTAT QTF	TOTAL	
REFRACTAIRES	Indéterminé	10	25%
	Négatif	13	33%
	Positif	16	41%
RESISTANTS	Indéterminé	8	19%
	Négatif	12	28,6%
	Positif	22	52,4%

II.3.3.2. Analyse de la sous-population des greffés rénaux (résistants versus réfractaires)

Du fait de la grande disparité en termes de prise en charge, de traitement immunosuppresseur ou même de comorbidité, nous avons décidé de comparer plus finement un sous-groupe : les greffés rénaux résistants (27 patients) et les greffés rénaux réfractaires (18 patients) afin de voir si nos hypothèses se confirment au sein d'une population plus homogène.

Cette population est fortement sujette aux infections par les herpès virus. En effet 30 à 60% des transplantés rénaux développaient une maladie à CMV avant l'introduction d'une prophylaxie antivirale (63).

Les paramètres de ces deux sous-groupes sont résumés dans le tableau 10. Statistiquement on retrouve une différence significative avec un risque inférieur à 5% (p value : 0,016) entre les deux valeurs moyennes des âges en unilatéral. Autrement dit, le groupe des patients résistants est statistiquement plus jeune que les patients réfractaires (- 7,241 ans). Nous avons essayé durant notre recueil de données de compléter le statut sérologique de chaque patient. Sur tous les greffés rénaux (45 patients) nous avons réussi à définir ce statut seulement sur 25 patients. On remarque que la proportion de patients séropositifs semble plus élevée chez les patients réfractaires (27,3%) que les résistants (14,2%) (Tableau 11). Une deuxième remarque est à mentionner et concerne les délais entre la date de la greffe et la première demande de recherche de résistance comme dans la population globale. En effet la tendance qui décrivait une non-réponse au traitement antiviral plus précoce chez le groupe des résistants se retrouve encore plus dans le groupe des greffés rénaux (221 jours versus 288 jours). Le test de Student ne trouve cependant pas de différence significative (p value : 0,151).

Tableau 10 Valeurs moyennes des paramètres observés chez les greffés rénaux * *différence significative*

	RESISTANTS (N=27)	REFRACTAIRES (N=18)
AGE (ANS) *	56,037 (10,275)	63,278 (8,216)
HOMME	19 (70,4%)	11 (61,1%)
STATUT CMV		
<i>D+/-</i>	11	8
<i>D+/+</i>	2	1
<i>D-/-</i>	1	0
<i>D-/+</i>	0	1
<i>D ?/+</i>	0	1
<i>D-/?</i>	1	0
INCONNU	12	7
MOYENNE VIREMIE (UI/ML) *	3,851 (1,080)	2,938 (0,979)
DELAIS GREFFE/RR (JOURS)	221 (173,4)	288 (187)

Tableau 11 Répartition des statuts sérologiques des greffés rénaux (25 données sur 81)

	Réfractaires	Résistants
Receveurs séropositifs	3	2
Receveurs séronégatifs	8	12

La charge virale moyenne chez les patients résistants est également plus élevée que chez le groupe des réfractaires : 3,851 UI/mL chez les résistants versus 2,938 UI/mL chez les réfractaires (p value : 0,018), cette différence a déjà été retrouvée dans la comparaison globale. De façon similaire à l'analyse de la population globale, nous avons décidé de comparer au sein des deux groupes, les distributions des valeurs des réponses Antigène et Mitogène (Fig. 21). L'appréciation semi-quantitative observée en globalité s'accroît chez les greffés rénaux (distribution de la réponse Antigène étendue sur des valeurs plus élevée chez les Réfractaires, malgré une distribution des valeurs de la réponse Mitogène relativement homogène).

Les autres comparaisons ne sont pas statistiquement significatives.

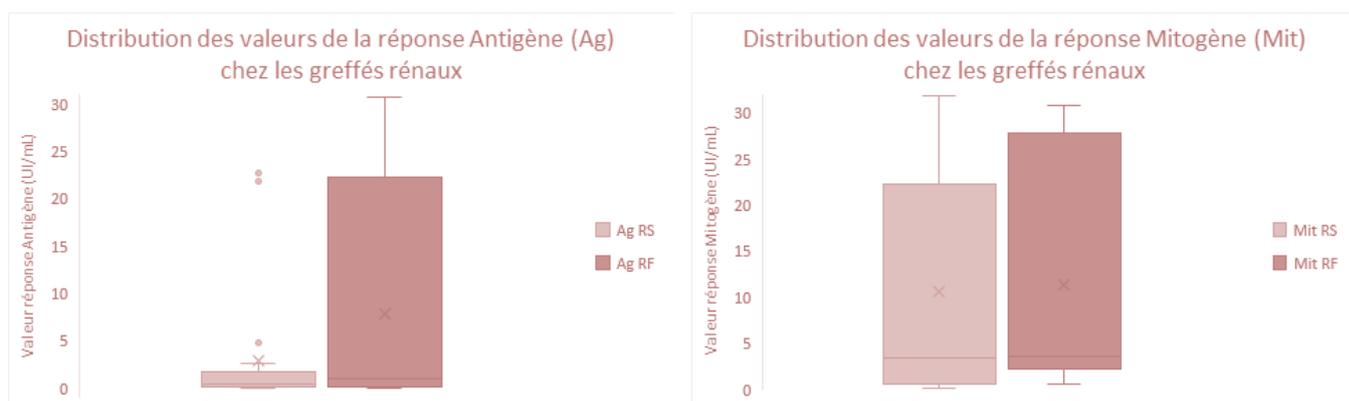


Figure 21 Distribution des valeurs des réponses Antigène et Mitogène chez les greffés rénaux, Résistant versus Réfractaire

II.3.4. Evaluation des performances prédictives du test QuantiFERON™ CMV sur l'évolution de la virémie à 3/6

Dans un deuxième temps nous avons voulu voir s'il y avait une différence de prédiction du QuantiFERON™ CMV entre les patients résistants et les patients réfractaires sur la population globale de l'étude indépendamment du type de greffe. Nous avons calculé les VPP (valeur prédictive positive) et VPN (valeur prédictive négative) de chaque groupe (Tableau 12). La figure 22 montre l'évolution dans le temps de chaque paramètre.

Nous avons considéré les Mitogènes non répondeurs (absence de réponse Mitogène et Antigène) comme des tests négatifs.

Tableau 12 Comparaison des VPP et VPN en population globale

	3 mois		6 mois	
	VPP	VPN	VPP	VPN
Réfractaires	57,14% (4/7)	73,33% (11/15)	57,14% (4/7)	76,5% (14/17)
Résistants	50% (4/8)	80% (12/15)	44,4% (4/9)	57,1% (8/14)

Comparaison VPP/VPN Résistants versus Réfractaires

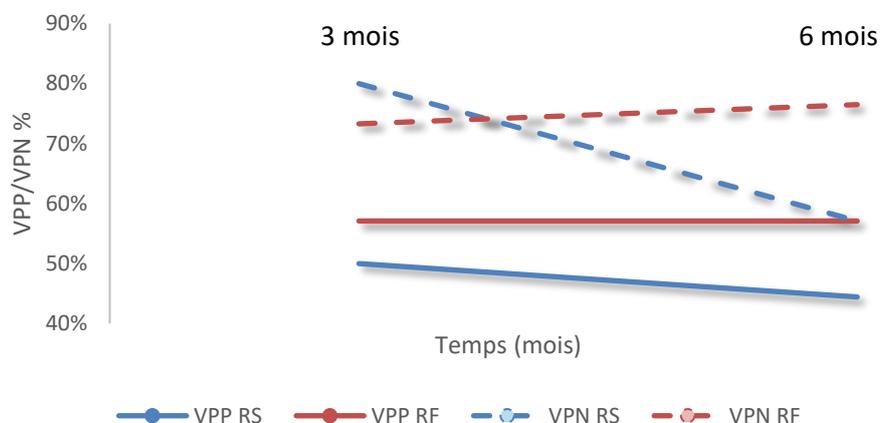


Figure 22 Evolution des VPP et VPN chez les Résistants (Rs) et les Réfractaires (Rf)

On remarque que de manière générale ce test a une meilleure VPN que VPP. En d'autres termes, lorsqu'un test QuantiFERON™ est négatif (absence d'immunité spécifique), il y a de fortes chances qu'il persistera une réplication virale active à 3 et 6 mois. Cependant on observe une différence non significative entre les deux groupes. La VPP est de l'ordre de 50% pour les résistants à 3 mois et 44,44% à 6 mois. Ces résultats semblent montrer qu'un QuantiFERON™ positif donne peu d'information sur la réponse du patient lorsque le patient est atteint d'une souche résistante. Avec nos effectifs, il y a une tendance à une meilleure prédiction chez les réfractaires que chez les résistants à 3 mois. On remarque aussi une équivalence des performances de VPP et VPN chez les réfractaires et une diminution des performances chez les résistants.

Nous nous sommes intéressés aux patients pour lesquels à 3 et 6 mois il n'y avait pas eu une bonne prédiction, c'est-à-dire une évolution favorable alors que le QuantiFERON™ était négatif ou, une absence d'évolution favorable alors que le QuantiFERON™ était positif. A trois mois le QuantiFERON™ avait donné une mauvaise prédiction pour 15 patients, parmi eux, 11 d'entre eux étaient greffés rénaux, deux étaient greffés pulmonaires, un était greffé de CSH, un greffé hépatique. Tous types de greffe confondus, il y avait 5 patients résistants et 7 patients réfractaires. A six mois, il y avait 17 mauvaises prédictions. 13 chez les greffés rénaux, 1 greffé cardiaque, deux greffés CSH. Tous types de greffe confondus, il y avait 10 patients résistants et 7 patients réfractaires. La proportion de greffés rénaux semble plus importante dans les mauvaises prédictions que dans la population globale de 81 patients (55,56% contre 73%).

Nous avons voulu confronter les VPP et VPN des patients greffés rénaux versus les autres greffes. Plusieurs observations sont remarquables (Tableau 13).

Hors greffe rénale, nous obtenons de meilleures valeurs à trois mois plutôt qu'à six mois que ce soit chez les résistants, les réfractaires et en globalité. Cette observation avait déjà été objectivée avec la première analyse.

Les effectifs sans les greffés rénaux des patients résistants et réfractaires étant très faibles, il n'est pas possible de tirer des conclusions sur des différences entre les deux populations. Nous avons décidé de ne pas tenir compte des valeurs pour lesquelles l'effectif était inférieur à 5.

Les VPP et VPN calculées sans les Mitogènes non répondeurs n'apportent pas d'observations remarquables supplémentaires.

Tableau 13 Résultats complémentaires : VPP et VPN à trois et six mois Résistant versus Réfractaires sans les Mitogènes non répondeurs

	VPP 3MOIS	VPN 3MOIS	VPP 6MOIS	VPN 6MOIS
RS	40% (4/10)	83% (10/12)	50% (4/8)	67% (6/9)
RF	50% (3/6)	63% (5/8)	57% (4/7)	78% (7/9)

Au cours du recueil de données, les traitements immunosuppresseurs avaient été renseignés dès que cela était possible. Nous avons réussi à obtenir le traitement immunosuppresseur sur 13 des 15 patients pour lesquels le QuantiFERON™ avait mal prédit l'évolution à trois mois. Parmi ces 13, 10 (dont 8 greffés rénaux) d'entre eux soit 76,9% étaient sous mycophénolate mofétil (MMF). A six mois, nous avons réussi à avoir les traitements immunosuppresseurs de 16 patients, et 12 (dont 11 greffés rénaux) d'entre eux soit 75% étaient sous mycophénolate mofétil.

Tableau 14 Analyse des VPP et VPN avec et sans greffe rénale

	3 MOIS		6 MOIS	
	VPP	VPN	VPP	VPN
HORS REIN				
REFRACTAIRES	75% (3/4)	88,89% (8/9)	66,67% (2/3)	80% (8/10)
RESISTANTS	66,67% (2/3)	100% (4/4)	66,67% (2/3)	66,67% (2/3)
REIN				
REFRACTAIRES	33,33% (1/3)	50% (3/6)	50% (2/4)	71,43% (5/7)
RESISTANTS	40% (2/5)	83,33% (10/12)	33,33% (2/6)	50% (2/4)
REFRACTAIRES+RESISTANTS				
HORS REIN	71,4% (5/7)	92,3% (12/13)	66,67% (4/6)	76,9% (10/13)
REIN	37,5% (3/8)	72,22% (13/18)	40% (4/10)	57,89% (11/19)

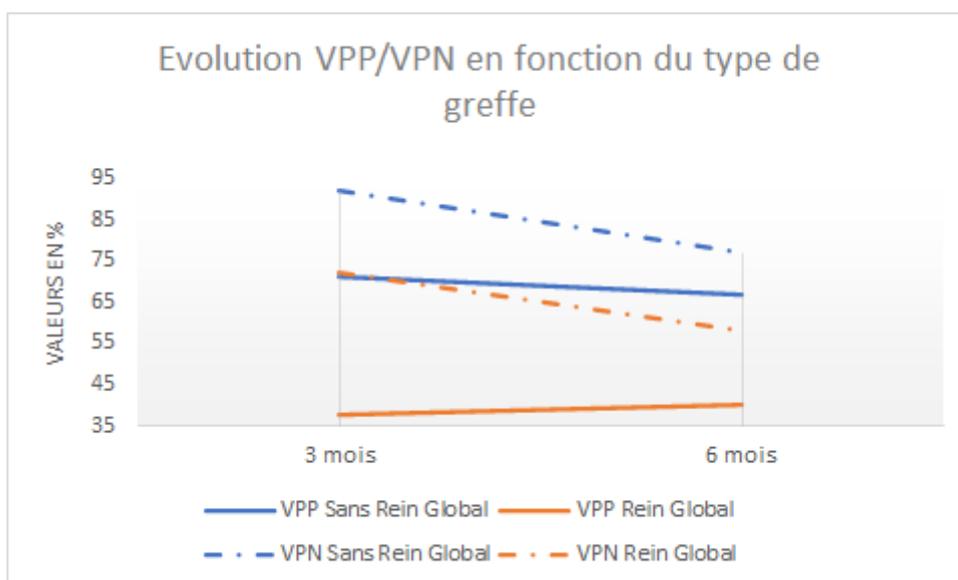


Figure 23 Evolution des VPP et VPN en fonction du type de greffe Rs : résistant, Rf : réfractaire

II.4. Discussion

L'objectif de cette étude était d'évaluer la capacité du test QuantiFERON™ à prédire l'évolution de la charge virale de patients transplantés et immunodéprimés non répondeurs en séparant les malades porteurs de souches résistantes de ceux qui n'en avaient pas afin de voir s'il y avait une différence entre ces deux populations. Avant cette comparaison, nous avons fait une étude descriptive de nos deux populations.

II.4.1. Description des effectifs

II.4.1.1. Population globale

Concernant les proportions assez équivalentes en terme effectif dans les deux groupes (39 patients versus 42 patients), elles sont cohérentes avec le rapport annuel du CNR de 2018 qui évaluait une proportion similaire entre les résistants et les non résistants parmi les greffés non répondeurs à un traitement antiviral bien conduit (8,1% de patients non répondeurs résistants versus 7,8% non répondeurs sans résistance).

Concernant les mutations retrouvées au sein de notre sous population de patients porteurs de résistance, celle retrouvée le plus fréquemment dans notre analyse, est la mutation Ala594Val,. Elle se situe dans la région du sous domaine IX responsable de la liaison de l'enzyme à son substrat. Plusieurs résistances ont été décrites dans ce sous-domaine. De manière générale elles se situent sur les acides aminés 460, 520 et 590 à 607 (53). Dans la littérature, il est décrit que les mutations de la protéine UL97 situées sur les position 460 et 594 et 595 sont les plus fréquentes (60 à 80%) (64). Dans notre groupe, ces mêmes mutations sont retrouvées dans 28 des 42 patients soit plus de 66%, elles sont donc également majoritaires, le GCV étant la molécule la plus utilisée en prophylaxie et en traitement curatif pour une infection à CMV. Ce gène code pour la protéine kinase virale qui est inhibée par le foscarnet qui est un analogue de pyrophosphate (65), le ganciclovir, analogue nucléosidique et le cidofovir analogue nucléotidique (66). Ces molécules étant utilisées en seconde intention,

il est normal que les mutations qui confèrent aux souches une résistance à ces antiviraux soient moins nombreuses.

L'analyse descriptive a pu mettre en évidence significativement à un risque α de 5%, que la charge virale moyenne du groupe Résistant est plus élevée que celle du groupe Réfractaire. En observant de manière semi-quantitative les distributions des valeurs des réponse Antigène (reflet de la réponse immunitaire spécifique du CMV) et Mitogène (reflet de la réponse immunitaire cellulaire), on observe que les valeurs sont plus élevées dans le groupe Réfractaire concernant l'Antigène mais homogènes entre les deux groupes concernant le Mitogène. Ce que l'on peut donc conclure de ces observations, c'est que le groupe Réfractaire serait en mesure de mieux contrôler la réplication virale du CMV, probablement grâce au fait que la réponse immunitaire spécifique semble meilleure dans ce groupe. Ces observations peuvent également être corrélées avec le délai d'apparition de non réponse. En effet, le groupe Résistant a tendance à présenter une non réponse au traitement antiviral en cours plus rapidement que le groupe Réfractaire (40 jours d'écart en moyenne) ce qui renforce l'hypothèse que le groupe Résistant a initialement une moins bonne capacité à contrôler la réplication virale du CMV.

Il existe donc des facteurs de prédisposition au développement d'une résistance. Nous savons déjà que la primo-infection est un facteur de risque majeur d'apparition de résistance. Une primo-infection est responsable d'une réponse immunitaire plus faible et donc d'une charge virale plus élevée que chez un patient séropositif (67). Une limite de notre étude est le faible nombre de statuts sérologiques que nous avons pu recueillir. Cependant, l'analyse de ceux obtenus nous a permis de répertorier 27,3% de séropositifs dans le groupe Réfractaire contre 14,2% dans le groupe Résistant. Même si cet écart n'est pas significatif, on peut supposer que cette différence de statut sérologique pourrait être responsable des différences observées entre les deux groupes (réponse immunitaire moins efficace, non réponse plus précoce, charge virale plus élevée). Il faudrait consolider cette hypothèse avec des effectifs plus élevés.

Il existe probablement d'autres facteurs prédisposants à l'apparition de résistance, tels que des facteurs génétiques, cette remarque sera abordée dans la conclusion.

On peut donc dire, que ces deux populations présentent deux profils de réponses immunitaires différents impliquant donc une prise en charge différente pour ces 2 populations et expliquant la différence de prédiction du test QuantiFERON™ entre ces deux populations.

II.4.1.2. Greffés rénaux

Concernant le fait que la majorité des patients soient des greffés rénaux, les transplantés rénaux sont une population particulièrement à risque du fait de l'immunomodulation provoquée par le CMV. Il favorise la synthèse ainsi que l'expression de l'IL (interleukine) 2 et de son récepteur, des molécules d'adhésion et des antigènes HLA (human leukocyte antigen) de classe II en particulier au sein des cellules endothéliales. Ces modifications favorisent la survenue de rejets aigus et donc de perte du greffon (63).

Cependant, il existe un probable biais de recrutement de fait que le rein soit l'organe le plus greffé en France. En effet selon le dernier rapport de l'agence de la biomédecine (2019), sur les 5901 greffes réalisées au cours de cette année, 3643 étaient des greffes rénales (Soit 61,7%) (68).

Nous avons décidé de nous intéresser à cette sous population en admettant que depuis 2014, un consensus a été mis place concernant les stratégies thérapeutiques des patients greffés

rénaux que ce soit en traitement d'immunosuppression mais également en stratégie antivirale (en prophylaxie et en curatif).

Chez les greffés rénaux, de façon similaire aux observations déjà retrouvées en globalité, on remarque que les patients résistants ont une tendance à être plus jeune (différence significative). Comme évoqué plus haut, cette différence peut être expliquée par le fait qu'un des facteurs de risque d'apparition de résistance est une séronégativité du receveur d'un organe issu d'un donneur séropositif et que la séoprévalence augmente avec l'âge. Plus le patient est jeune, plus il a de chance d'être séronégatif au moment de la greffe et donc de développer une primo infection qui est un facteur de risque d'apparition de résistance. On peut cependant critiquer cette hypothèse dans le sens où la moyenne d'âge de notre population résistante est de 56 ans alors qu'elle est de 63,3 ans chez la population réfractaire. Ces deux âges moyens appartiennent relativement à la même tranche d'âge même si des augmentations de séoprévalence après 60 ans ont été observées (22).

Nous savons que les lymphocytes T (CD4+ et CD8+) sont essentiels pour une réponse immunitaire efficace contre le CMV (60). Il a été notamment mis en évidence que le risque d'apparition de résistance était directement corrélé à une discordance entre les couples donneurs receveurs (D+/R-) (69).

En synthétisant toutes ces informations, nous observons donc, que les patients résistants greffés rénaux sont significativement plus jeunes par conséquent ils ont une proportion plus élevée de séronégatifs donc un risque majoré de développer une primo infection autrement dit une réponse immunitaire plus faible et moins efficace (67) ce qui aura pour conséquence une charge virale moyenne plus élevée. De plus, l'apparition plus précoce de la non-réponse au traitement chez les résistants pourrait laisser supposer qu'il existe des facteurs de prédisposition génétiques rendant une réponse immunitaire moins efficace.

Toutes ces observations nous font donc penser que la non-réponse de la population réfractaire est totalement différente de celle de la population résistante. Elle apparait plus tard et la virémie est moins sévère, elle est peut-être expliquée par d'autres facteurs (observance, pharmacocinétique).

II.4.2. Comparaison des capacités de prédiction du QuantiFERON CMV

En partant du constat que ces deux non-réponses sont différentes, la question qui s'est posée a donc été de savoir si le test QuantiFERON™ CMV présentait la même efficacité chez ces deux populations.

II.4.2.1. Résistant versus Réfractaire

En comparant les différentes prédictions, nous avons pu constater que dans notre échantillon les prédictions étaient meilleures à 3 qu'à 6 mois pour la population Résistante et plus persistante pour la population Réfractaires. Ces résultats suggèrent que la valeur prédictive du QuantiFERON™ s'estompe avec le temps et qu'il faut renouveler un test lorsque le premier a été réalisé il y a plusieurs mois (3 mois). En effet au-delà, le nombre d'évènements (changement de traitement, co-infections) devient trop nombreux pour promettre une stabilité dans la réponse immunitaire du patient.

Nous avons aussi mis en évidence que le fait d'avoir une résistance n'influencerait pas a priori les erreurs de prédiction du QuantiFERON™ en revanche, il semblerait que le type de greffe pourrait l'influencer.

II.4.2.2. Greffés rénaux versus autres types de greffe

A trois mois, la meilleure VPN (92,3%) était pour le groupe des greffés hors rein qu'ils soient résistants ou réfractaires, à six mois la meilleure VPN (80%) concerne les réfractaires greffés hors rein.

En effet, nous avons constaté que les VP des greffés hors greffe rénale étaient bien supérieures à celles retrouvées chez les greffés rénaux (Tableau 13). Par exemple la VPP à trois mois les greffés rénaux est de 37,5% pour 71,4% chez les greffés hors rein sans faire de distinction entre résistants et réfractaires (Figure 23). On peut donc supposer qu'un facteur propre à la greffe rénale et non retrouvé dans les autres greffes pourrait interférer avec le test QuantiFERON™ que le patient soit résistant ou non.

Dans nos résultats nous avons retrouvé une forte proportion de patients sous MMF chez lesquels il y avait eu une mauvaise prédiction du QuantiFERON™. La proportion de greffés rénaux au sein de ce groupe était plus élevée que celle de l'intégralité de nos patients (55,56% contre 73%). Il a été décrit que le MMF par son mécanisme d'action était responsable d'une diminution de la synthèse d'INF gamma (70), qui est dosé justement pour tester le QuantiFERON™. Nous pouvons imaginer que même si le patient est en mesure de contrôler sa charge virale, du fait de l'absence d'un taux normal d'interféron gamma, le test QuantiFERON™ pourrait dans certains cas être faussement négatif.

De plus, même si nos effectifs sont faibles, les tendances semblent montrer une meilleure efficacité du test QuantiFERON™ chez les patients réfractaires hors greffe rénale, puisque les meilleures VPP et VPN ont été obtenues dans ces populations-là.

En résumé, on constate avec les résultats de cette étude, que le test QuantiFERON™ a été plus performant dans sa Valeur Prédicative Négative que Positive. En d'autres termes, il est permis de mieux prédire l'apparition d'une répllication virale lorsqu'il est rendu négatif que de prédire une absence de répllication virale lorsqu'il est positif. De plus, il y a une tendance à une meilleure prédiction chez les patients qui ne sont pas greffés rénaux. Il est aussi ressorti que la capacité de prédiction du test diminuait avec le temps, il donne une visibilité sur la réponse autour de 3 mois.

Le manque d'informations sur le devenir des nombreux patients fait que nos effectifs, malgré un recueil de 81 patients, sont plutôt faibles, ce qui empêche certains résultats d'être exploités. Notamment les VPP des groupes résistants et réfractaires et les conclusions sur les différences de statuts sérologiques entre les deux groupes.

Le manque d'homogénéité des variances a également empêché de prouver des différences statistiques.

Du fait du recueil rétrospectif, il a été difficile d'obtenir une population homogène en terme de traitement immunosuppresseur/antiviral et de répertoire d'autres événements liés aux comorbidités des patients. De ce fait, la comparaison Résistant/Réfractaire n'a pas pu être totalement étudiée. Nous avons cependant étudié une population homogène dans sa prise en charge : les greffés rénaux. Les différences entre les types de greffes ont révélé des tendances qu'il faudrait approfondir avec des effectifs plus élevés et des informations plus complètes.

II.5. Conclusion

En conclusion nous pouvons dire qu'avec cette analyse nous constatons que les patients porteurs d'une souche CMV résistante aux traitements antiviraux sont une population

statistiquement plus jeune chez les greffés rénaux, qui pourrait avoir une non-réponse au traitement antiviral plus précoce, avec une charge virale plus élevée et probablement une réponse immunitaire plus faible. La survenue d'une résistance était souvent liée au fait que le patient fasse une primo-infection dans un délai court après la greffe, ce qui lui confère une réponse immunitaire plus faible donc moins efficace et par conséquent une virémie élevée.

Tous ces signes biologiques pourraient alerter le clinicien dans la prise en charge du patient afin de pouvoir changer plus rapidement de stratégie thérapeutique et suspecter fortement l'apparition d'une résistance. Autrement dit, un patient jeune séronégatif qui développe une infection à CMV avec une charge virale élevée et une non- réponse assez rapprochée de sa greffe est un patient fortement à risque d'apparition de résistance.

Pour ce qui est du QuantiFERONTM, celui-ci a une meilleure performance de prédiction à trois mois qu'à six mois. Il permet de mieux prédire une absence de contrôle de la virémie qu'une réussite de contrôle de la virémie. A priori il n'y a pas de différence de prédiction entre les résistants et les réfractaires même si ces deux populations ont des profils totalement différents. En revanche, il fonctionnerait moins bien chez les greffés rénaux, en particulier chez ceux qui sont traités par MMF à cause de la baisse de synthèse d'INF gamma qui en découle.

Conclusion générale

Nous nous sommes intéressés à une population particulièrement à risque de développement d'infection et de maladie à CMV : la population des receveurs de greffé, connus pour être immunodéprimés et très exposés à ce virus.

Nous avons mis en évidence le fait que la pression thérapeutique qui était exercée sur le CMV chez les patients transplantés s'était avérée efficace pour faire baisser le risque d'apparition de maladie à CMV mais qu'une des conséquences de ce progrès était l'apparition de souches résistantes aux antiviraux utilisés.

Nous avons donc voulu comparer deux groupes de malades non répondeurs, ceux résistants et ceux réfractaires et évaluer l'intérêt du test immunologique QuantiFERON™ dans la prédiction de l'évolution de la réplication virale chez ses deux populations différentes.

Cette étude est rétrospective, elle analyse donc des paramètres de la « vraie vie » en absence de protocole bien défini avec des délais bien précis et des populations bien homogènes, ce qui peut rendre ses résultats plus difficiles à interpréter. Cependant nous avons tout de même réussi à mettre en évidence plusieurs points intéressants.

Notamment une population de patients résistants qui serait plus jeune avec une réponse immunitaire a priori plus faible, une virémie plus élevée et une non-réponse au traitement plus précoce.

Ces observations pourraient faire supposer qu'il existe de prédispositions génétiques qui augmenteraient le risque d'acquérir une souche résistante du fait d'une réponse immunitaire de moins bonne qualité. En effet, il a été mis en évidence que certains polymorphismes au niveau des gènes codants pour les récepteurs Toll like entraînaient une diminution de la réponse immunitaire et donc un risque accru de ne pas maîtriser une réplication virale à CMV. A l'inverse, il a aussi été mis en évidence que des receveurs de greffe avec un polymorphisme d'un seul nucléotide de l'IL-28B étaient sensiblement moins exposés au risque de réplication du CMV. De plus, des niveaux inférieurs de lymphocytes natural killer (NK) survenus précocement après la transplantation sont un facteur de risque de maladie à CMV chez les receveurs cardiaques et hépatiques. Enfin, les génotypes KIR de cellules NK inhibitrices ont été décrits comme un facteur de prédisposition d'une réactivation du CMV chez les greffés rénaux tandis que les haplotypes de cellules NK de type B contenant l'activation des gènes KIR des cellules NK se sont révélés être protecteurs chez les receveurs d'organes (48).

Ce que l'on peut supposer, c'est que ces deux sous populations ont des prédispositions génétiques différentes qui font qu'ils ont une meilleure ou une moins bonne réponse immunitaire face au CMV, ainsi cette réponse va conditionner le risque d'apparition de résistance qui est directement corrélé à la valeur de la charge virale. Ces deux populations sont donc deux populations distinctes qui vont réagir tout à fait différemment aux traitements mis en place. Cependant, la performance du test QuantiFERON™ entre ces deux populations dans cette étude n'a pas été modifiée, en revanche elle a été nettement moins efficace pour les greffés rénaux. Le test QuantiFERON™ n'est donc *a priori* pas influencé par cette différence de population.

Des progrès considérables ont été accomplis dans les dernières décennies pour la prise en charge des infections à CMV, cependant le CMV reste un agent infectieux responsable de morbidité et de mortalité importante chez les patients les plus immunodéprimés et d'échec de greffes d'organes. Il reste l'agent infectieux le plus surveillé lors des consultations liées à la

greffe, et il est essentiel de poursuivre les études dans le but de trouver d'améliorer la surveillance des patients greffés et disposer de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Références bibliographiques

1. Définition luétique — Wiktionnaire [Internet]. Disponible sur: <https://fr.wiktionary.org>
2. Ho M. Cytomegalovirus: Biology and Infection. Springer Science & Business Media; 2013. 447 p.
3. Davison AJ, Gary S. Hayward. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *Journal of General Virology*. 2003;(84):17-28.
4. Seigneurin J-M, Morand P. *Virologie moléculaire médicale*. Editions Médicales&Internationales. 1997. 486p. (Génie Génétique).
5. Crough T, Khana R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *American Society for Microbiology*. 2009;22(1):76-88.
6. Image. Boutet E. Cytomégalovirus. In: Wikipédia [Internet]. 2020.
7. Beltran PMJ, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(6):697-711.
8. Faure M. Cytomégalovirus Humain : Variabilité, Recombinaison et Protéine pUL40 [Thèse de Sciences]. Université de Bordeaux 2. 2010.
9. Boehme KW, Compton T. Innate Sensing of Viruses by Toll-Like Receptors. *Journal of Virology*. 2004;78(15):7867-73.
10. Jacobson MA, Maecker HT, Orr PL, D'Amico R, Van Natta M, Li X, et al. Results of a Cytomegalovirus (CMV)-Specific CD8⁺ /Interferon- γ ⁺ Cytokine Flow Cytometry Assay Correlate with Clinical Evidence of Protective Immunity in Patients with AIDS with CMV Retinitis. *J Infect Dis*. 2004;189(8):1362-73.
11. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;202(5):673-85.
12. Basta S, Bennink JR. A survival game of hide and seek: cytomegaloviruses and MHC class I antigen presentation pathways. *Viral Immunol*. 2003;16(3):231-42.
13. Adjei AA, Armah HB, Gbagbo F, Boamah I, Adu-Gyamfi C, Asare I. Seroprevalence of HHV-8, CMV, and EBV among the general population in Ghana, West Africa. *BMC Infect Dis*. 2008;8(1):1-8.
14. Huraux J-M, Nicolas J-C, Agut H, Peigue-Lafeuille H. *Traité de virologie médicale*. ESTEM. 2003. 793 p.
15. Image. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers.
16. Faucher J-M, Abraham B, Segondy M, Jonquet O, Reynes J, Janbon F. Acquired cytomegalovirus infections in immunocompetent adults: 116 cases. *Presse Med*. 1998;27(35):1774-9.

17. Wreghitt TG, Teare EL, Sule O, Devi R, Rice P. Cytomegalovirus Infection in Immunocompetent Patients. *Clin Infect Dis*. 2003;37(12):1603-6.
18. Adler SP, Marshall B. Cytomegalovirus Infections. *Pediatrics in Review*. 2007;28(3):92-9.
19. Emery VC. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Pathology*. 2001;54(2):84-8.
20. Risso K. Qu'est ce qu'un patient immunodéprimé et à quels risques est il exposé? Cours Magistral. Université de Nice
21. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2013;13(s4):93-106.
22. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*. 2010;20(4):202-13.
23. Krech U. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. :4.
24. Yinon Y, Farine D, Yudin MH. Screening, Diagnosis, and Management of Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2010;65(11):736–743.
25. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Reviews in Medical Virology*. 2007;17(4):253-76.
26. Diagnostic par sérologie et/ou par recherche du génome viral de l'infection congénitale à cytomégalo­virus. Haute Autorité de santé. 2015;45.
27. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The « silent » global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):86-102.
28. Giakoustidis D, Antoniadis A, Fouzas I, Sklavos A, Giakoustidis A, Ouzounidis N, et al. Prevalence and Clinical Impact of Cytomegalovirus Infection and Disease in Renal Transplantation: Ten Years of Experience in a Single Center. *Transplantation Proceedings*. 2012;44(9):2715-7.
29. Kaplan B, Barr ML, O'Grady J, Berezan D, Hughes G, Becker B, et al. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. 2009;9:51-155.
30. Kotton CN. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *American Journal of Transplantation*. 2013;13(s3):24-40.
31. Darde M-L. Techniques d'Agglutination. In: *Parasitologie et mycologie médicales*. Elsevier-Masson. 2017. 497 p.
32. Université des Sciences et de la Santé Cambodge. Tests immuno-enzymologiques (ELISA, Exemple de sérologie). 2009.
33. Segondy M. Les difficultés d'interprétation du sérodiagnostic des infections à cytomégalo­virus. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2006(382):45-9.
34. Grangeot-Keros L. L'avidité des IgG: implications en infectiologie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 2001;16(2):87-91.

35. Image. Ygonaar 23:09 7. PCR basic principle with component status versus temperature transition. 2006.
36. Hantz S, Boutolleau D. Le cytomégalo­virus humain. <https://www.sfm-microbiologie.org>
37. Résumé des caractéristiques du produit - GANCICLOVIR SANDOZ 500 mg, poudre pour solution à diluer pour perfusion - Base de données publique des médicaments.
38. Biron KK, Stanat SC, Sorrell JB, Fyfe JA, Keller PM, Lambe CU, et al. Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. PNAS. 1985;82(8):2473-7.
39. Frange P, Leruez-Ville M. Nouvelles perspectives thérapeutiques dans l'infection à cytomégalo­virus. Revue d'Oncologie Hématologie Pédiatrique. 2017;5(2):56-66.
40. VIDAL - Valganciclovir. <https://www.vidal.fr>
41. Lemer­cier V, Tod M, Garraffo R, Petitjean O. Pharmacocinétique et pharmacodynamie du valaciclovir et du famciclovir. Médecine et Maladies Infectieuses. 2000;30(7):455-67.
42. Burnichon N, Marcilly A. DES bactériologie / virologie. 2003;24.
43. Lea AP, Bryson HM. Cidofovir. Drugs. 1996;52(2):225-30; discussion 231.
44. Trofe J, Pote L, Wade E, Blumberg E, Bloom RD. Maribavir: A Novel Antiviral Agent with Activity Against Cytomegalovirus. Ann Pharmacother. 2008;42(10):1447-57.
45. Chene-Bourg. Létermovir pour prévenir les infections à CMV - ProQuest. The Medical Letter on Drugs and Therapeutics. 2020;42(1):4-5.
46. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. Massachusetts Medical Society; 2017;377:25.
47. Lumbreras C, Manuel O, Len O, Berge IJM ten, Sgarabotto D, Hirsch HH. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. Clinical Microbiology and Infection. 2014;20(s7):19-26.
48. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. Transplantation. 2018;102(6):900–931.
49. Janoly-Dumenil A. Optimisation des modalités thérapeutiques de l'infection à CMV en post-transplantation de moelle osseuse pédiatrique par l'étude in vitro des relations PK/PD de l'efficacité antivirale et de la toxicité cellulaire du Ganciclovir. :378. HAL, Université de Lorraine
50. Piketty C, Bardin C, Gilquin J, Gairard A, Kazatchkine MD, Chast F. Monitoring plasma levels of ganciclovir in AIDS patients receiving oral ganciclovir as maintenance therapy for CMV retinitis. Clinical Microbiology and Infection. 2000;6(3):117-20.
51. Chou S. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. Antiviral Research. 2020;176:104711.

52. Limaye AP, Corey L, Koelle DM, Davis CL, Boeckh M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *The Lancet*. 2000;356(9230):645-9.
53. Alain S, Mazon MC, Denis F. Résistance du cytomégalo­virus au ganciclovir. *Antibiotiques*. 2004;6(2):113-9.
54. Göhring K, Hamprecht K, Jahn G. Antiviral Drug- and Multidrug Resistance in Cytomegalovirus Infected SCT Patients. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2015;13.
55. Brochure générale QuantiFERON™ cytomégalo­virus.
56. QuantiFERON-CMV Kits - QIAGEN Online Shop. Notice technique
57. Hantz S, Moret L, Alain S. Prise en charge de l'infection à cytomégalo­virus en transplantation. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2019;(515):36-43.
58. Castón J, Cantisán S, González-Gasca F, Páez-Vega A, Abdel-Hadi H, Illescas S, et al. Interferon-γ production by CMV-specific CD8+ T lymphocytes provides protection against cytomegalovirus reactivation in critically ill patients. *Intensive care medicine*. 2015;42:46-53.
59. Westall GP, Cristiano Y, Levvey BJ, Whitford H, Paraskeva MA, Paul E, et al. A Randomized Study of Quantiferon CMV-directed Versus Fixed-duration Valganciclovir Prophylaxis to Reduce Late CMV After Lung Transplantation. *Transplantation*. 2019;103(5):1005–1013.
60. Meesing A, Razonable RR. Clinical Correlation of Cytomegalovirus Infection With CMV specific CD8+ T-cell Immune competence Score and Lymphocyte subsets in Solid Organ Transplant recipients. *The Transplantation Society*. 2019;103(4): 832-838.
61. Kumar D, Kotton CN. A prospective multicenter observational study of cell-mediated immunity as a predictor for cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2019;2505-2516
62. Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, et al. Efficacy and Safety of Valganciclovir vs. Oral Ganciclovir for Prevention of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. 2004;4(4):611-20.
63. Mourad G, Garrigue V, Delmas S, Szwarc I, Deleuze S, Bismuth J, et al. Complications infectieuses et néoplasiques après transplantation rénale. *EMC - Néphrologie*. 2005;2(4):158-81.
64. Mazon M-C. Résistance du cytomégalo­virus humain aux antiviraux. *Virologie*. 1997;1(2):95-102.
65. Fillet AM. Histoire naturelle de l'infection à VZV: physiopathologie, mécanismes d'action et critères virologiques d'évaluation des antiviraux. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1998;28(11):767-74.
66. P. Lalezari J, J. Stagg R, D. Kuppermann B, N. Holland G, Kramer F, V. Ives D, et al. Intravenous Cidofovir for Peripheral Cytomegalovirus Retinitis in Patients with AIDS. *Annals of Internal Medicine*. 1997;

67. Lochmanova A, Lochman I, Tomaskova H, Marsalkova P, Raszka J, Mrazek J, et al. Quantiferon-CMV Test in Prediction of Cytomegalovirus Infection After Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2010;42(9):3574-7.
68. Rapport Annuel 2019 Agence de la biomédecine. 2020. <https://rapport-annuel.agence-biomedecine.fr>
69. Borade SM, Lurain NS, Jordan A, Leischner J, Villanueva J, Durazo R, et al. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in lung transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2002;21(12):1274-82.
70. Lui SL, Ramassar V, Urmson J, Halloran PF. Mycophenolate mofetil reduces production of interferon-dependent major histocompatibility complex induction during allograft rejection, probably by limiting clonal expansion. *Transpl Immunol*. 1998;6(1):23-32.

Annexes

Annexes.....	76
Annexe 1. Fiche de demande : Recherche de Résistance (CNR des Herpèsvirus)	77
Annexe 2. Fiche de demande : Test QuantiFERON™ CMV (CNR des Herpèsvirus)	81

FORMULAIRE PRESCRIPTEUR CLINICIEN page 2/2

Renseignements cliniques

Molécules reçues jusqu'à ce jour :

- Ganciclovir Oui Non
- Valganciclovir Oui Non
- Aciclovir Oui Non
- Valaciclovir Oui Non
- Foscarnet Oui Non
- Cidofovir Oui Non
- Maribavir Oui Non
- Autres :

Traitement immunosuppresseur actuel :

- Cyclosporine (Néoral, Sandimmun)
- Tacrolimus (Prograf, Advagraf)
- MMF (Cellcept)
- MPA (Myfortic)
- Sirolimus (Rapamune)
- Everolimus (Certican)
- Corticoïdes
- Belatacept
- Autre :

Prophylaxie :

 OUI NON

Molécule	Posologie	Date de début	Créatininémie en début de TTT	Date de fin	Motif du changement de la molécule ou de la dose et réponse au traitement
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :

Traitement(s) préemptif(s) :

 OUI NON

Molécule	Posologie	Date de début	Créatininémie en début de TTT	Date de fin	Motif du changement de la molécule ou de la dose et réponse au traitement
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :

Traitement(s) curatif(s) :

 OUI NON

Molécule	Posologie	Date de début	Créatininémie en début de TTT	Date de fin	Motif du changement de la molécule ou de la dose et réponse au traitement
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :
		/ /		/ /	<input type="checkbox"/> A / <input type="checkbox"/> B / <input type="checkbox"/> C / <input type="checkbox"/> D / <input type="checkbox"/> Autre :

A : Adaptation à la fonction rénale - B : Leucopénie - C : Echec ou inefficacité - D : Adaptation à la concentration résiduelle

FORMULAIRE VIROLOGUE page 1/1

Patient		Virologue	
Nom :		Nom :	
Prénom :		Téléphone :	
Nom de jeune fille :		Adresse :	
Né(e) le : / / Sexe : M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>			
Surveillance des dernières charges virales			
Date :	Charge virale :	Nature et numéro interne des échantillons envoyés :	
□ / □ / □			
□ / □ / □			
□ / □ / □			
□ / □ / □			
□ / □ / □			
□ / □ / □			

Prélèvements envoyés au CNR	Date du prélèvement	Nb tube(s)	T° transport
Génotypage : <input type="checkbox"/> Sang total (prélevé en EDTA, aliquoté, ≥500µl) <input type="checkbox"/> Leucocytes (culot sec) <input type="checkbox"/> Biopsie <input type="checkbox"/> Urine <input type="checkbox"/> LBA <input type="checkbox"/> LCR <input type="checkbox"/> Extrait d'ADN <input type="checkbox"/> Autre :	□ / □ / □ □ / □ / □	□ □ □ □ □ □ □	- 30°C
Phénotypage : <i>De préférence :</i> <input type="checkbox"/> Souche virale sur flacon de culture (compléter le flacon en milieu de culture pour l'envoi) <input type="checkbox"/> Sang total sur tube héparinate de SODIUM <input type="checkbox"/> Salive en milieu de transport CMV <input type="checkbox"/> Urine en milieu de transport CMV <input type="checkbox"/> LBA en milieu de transport CMV <input type="checkbox"/> Souche virale en DMSO	□ / □ / □ □ / □ / □ □ / □ / □ □ / □ / □ □ / □ / □	□ □ □ □ □	Température ambiante (15 à 25°C) - 30°C
Dosage du Ganciclovir : <input type="checkbox"/> Plasma (prélevé en EDTA, décanté, aliquoté, ≥1mL)	□ / □ / □	□	- 30°C

Modalités de transport au CNR (ne rien envoyer le vendredi)

Par COLIBRI TSE Express Médical (si votre centre a un compte Colibri chez TSE) le jour de l'envoi des prélèvements :

- Contacter colibri pour connaître l'heure de passage sur votre site (04 72 76 67 21)
- Se connecter sur le site dédié pour programmer l'enlèvement (<http://portail.tse-medical.net/>)

Par TSE Express Médical la veille de l'envoi des prélèvements (avant 17h):

- Remplir la fiche TSE fournie par le CNR
- Envoyer cette fiche à TSE par mail (exploitation@tse-medical.fr), ou par fax (04 72 72 94 54)

Dans tous les cas : prévenir le CNR (sophie.alain@chu-limoges.fr ou cnr.cmv@chu-limoges.fr)

Médecin virologue (nom et signature) :

Date de l'envoi : / /



Centre National de Référence des Herpèsvirus

Fiche de renseignements :
Liste des non-conformités



En France, tous les laboratoires d'analyses de biologie médicale ont une obligation d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 depuis mai 2013. Notre Centre National de Référence Herpèsvirus est engagé dans cette démarche.

Numéro	Non-conformité	Mineure	Majeure	Action curative proposée
1	Le conditionnement du prélèvement n'est pas respecté (triple emballage).	X		
2	Le conditionnement du prélèvement est ouvert ou cassé.		X	
3	Le délai de transport du prélèvement n'est pas respecté.	X		
4	La feuille de demande est absente.		X	
5	Absence de prescripteur ou information illisible.		X	
6	Absence d'identité patient sur la feuille de demande ou information illisible.		X	
7	Absence de renseignement clinique ou information illisible.	X		
8	Absence de l'historique des charges virales ou information illisible.	X		
9	Absence d'information pour l'encadré des prélèvements ou information illisible.	X		
10	L'ordonnance pour le dosage de GCV est mal remplie ou absente.		X	
11	Absence de prélèvement.		X	
12	Le prélèvement est en quantité insuffisante pour être traité.		X	
13	Le prélèvement est mal identifié ou n'est pas identifié.		X	
14	Discordance d'identification entre le bon et le prélèvement.		X	
15	Le contenant du prélèvement est inapproprié pour l'analyse à effectuer.		X	

CONFORMITE : *cadre réservé au CNR Herpèsvirus*

Réceptionné le : par :

OUI NON Numéro de la non-conformité :

Renseignements cliniques

PROTOCOLE CLINIQUE

- ORPHAVIC Oui Non
- SOLSTICE 303 Oui Non
- Autres :.....

RECHERCHE DE RESISTANCE Oui Non

AUTRE

Prélèvements à transférer à votre laboratoire de virologie dans les 12 heures qui suivent, à température ambiante

Préleveur : Date :/..../..... Heure : ... h.....

A remplir par le virologue

Surveillance des dernières charges virales CMV

Date :	Charge virale :	Observations
/ /		
/ /		

Prélèvements

Les échantillons que vous pouvez envoyer :

- 3 tubes de 1 ml de sang du test QUANTIFERON-CMV incubés
- 3 tubes de 1 ml de sang du test QUANTIFERON-CMV incubés et centrifugés
- 3 aliquotes du plasma des tubes du test QUANTIFERON-CMV

MODALITES DE TRANSPORT AU CNR Herpèsvirus (À la charge du CNR Herpèsvirus)

Coordonnées du transporteur : *(prévenir la veille du jour de l'enlèvement et remplir la fiche TSE)*

TSE Express Médical Code : **CRCMV** Adresse : 40, rue Saint Jean de Dieu, 69366 LYON Cedex 07
Téléphone : 04 72 76 67 17 Fax : 04 72 72 94 54 e-mail : exploitation@tse-medical.fr

3 tubes de 1 ml de sang du test QUANTIFERON-CMV incubés	<i>Température :</i> à 4°C
3 tubes de 1 ml de sang du test QUANTIFERON-CMV incubés et centrifugés	à 4°C
3 aliquotes du plasma des tubes du test QUANTIFERON-CMV	à 4°C ou -30°C

Médecin virologue (nom et signature) :

Date de l'envoi :/..../.....

En France, tous les laboratoires d'analyses de biologie médicale ont une obligation d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 depuis mai 2013. Notre Centre National de Référence Herpèsvirus est engagé dans cette démarche.

Numéro	Non-conformité	Mineure	Majeure	Action curative proposée
1	Le conditionnement du prélèvement n'est pas respecté (triple emballage).	X		
2	Le conditionnement du prélèvement est ouvert ou cassé.		X	
3	Le délai de transport du prélèvement n'est pas respecté.	X		
4	La feuille de demande est absente.		X	
5	Absence de prescripteur ou information illisible.		X	
6	Absence d'identité patient sur la feuille de demande ou information illisible.		X	
7	Absence de renseignement clinique ou information illisible.	X		
8	Absence de l'historique des charges virales ou information illisible.	X		
9	Absence d'information pour l'encadré d'échantillon clinique ou information illisible.	X		
10	L'ordonnance pour le dosage de GCV est mal remplie ou absente.	X		
11	Absence de prélèvement.		X	
12	Le prélèvement est en quantité insuffisante pour être traité.		X	
13	Le prélèvement est mal identifié ou n'est pas identifié.		X	
14	Discordance d'identification entre le bon et le prélèvement.		X	
15	Le contenant du prélèvement est inapproprié pour l'analyse à effectuer.		X	

CONFORMITE :

Réceptionné le :

OUI NON

cadre réservé au CNR CMV

par :

Numéro de la non-conformité :

Serment De Galien

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

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

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

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

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

Intérêt du test QuantiFERON™ CMV dans la prédiction de l'évolution de la charge virale chez des patients transplantés non répondeurs au traitement antiviral

Le cytomégalovirus (CMV) est le virus le plus fréquemment impliqué dans les complications infectieuses chez les patients greffés. Afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique, des tests immunologiques évaluant la réponse immunitaire spécifique au CMV ont été développés pour mieux comprendre les mécanismes de non-réponse au traitement. Dans cette étude nous avons évalué l'intérêt du test QuantiFERON™ CMV dans la prédiction de l'évolution de la charge virale chez deux sous populations de patients transplantés non répondeurs au traitement antiviral (avec mutation de résistance = patients résistants ; sans mutation de résistance = patients réfractaires). De façon rétrospective, 81 patients greffés (dont 56% de greffés rénaux) ont été inclus avec les critères suivants : recherche de résistance et analyse contemporaine par QuantiFERON™ CMV de la réponse immune (42 résistants et 39 réfractaires). L'analyse globale de la population a montré une charge virale moyenne significativement supérieure chez les patients résistants par rapport aux réfractaires ($p=0,008$). Quelle que soit la population considérée, le test QuantiFERON™ CMV présente de meilleures valeurs prédictives négatives (VPN) que positives (VPP). L'évaluation à 3 mois retrouve une VPN de 80% chez les résistants et 73,33% chez les réfractaires alors que les VPP sont respectivement de 50 et 57,14%. Les VPN et VPP évaluées à 6 mois sont inférieures à celles calculées à 3 mois. L'analyse de la sous-population des greffés rénaux n'est pas informative compte tenu de l'effectif réduit de chaque sous-groupe de patients dans cette population. Le test QuantiFERON™ est donc plus performant pour prédire une absence de contrôle de la virémie à 3 mois pour des patients greffés présentant ou non une résistance virologique aux antiviraux.

Mots-clés : Cytomégalovirus, QuantiFERON CMV, Résistance, Transplantation

Interest of the QuantiFERON™ CMV test in the prediction of the evolution of the viral load in transplanted patients who do not respond to antiviral treatment

Cytomegalovirus (CMV) is the virus most frequently implicated in infectious complications in transplant patients. In order to optimize therapeutic management, immunological tests evaluating the CMV-specific immune response have been developed to better understand the mechanisms of non-response to treatment. In this study, we evaluated the value of the QuantiFERON™ CMV assay in predicting viral load evolution in two sub-populations of transplant patients who did not respond to antiviral treatment (with resistance mutation = resistant patients; without resistance mutation = refractory patients). Retrospectively, 81 transplant patients (of which 56% were renal transplant patients) were included with the following criteria: search for resistance and contemporary analysis by QuantiFERON™ CMV of the immune response (42 resistant and 39 refractory). The overall population analysis showed a significantly higher mean viral load in resistant patients compared to refractory patients ($p=0.008$). Regardless of the population considered, the QuantiFERON™ CMV test has better negative predictive value (NPV) than positive predictive values (PPV). The 3-month evaluation found a NPV of 80% in resistant and 73.33% in refractory patients, while the PPVs were 50 and 57.14% respectively. The VPNs and VPPs evaluated at 6 months are lower than those calculated at 3 months. Analyses performed on the renal transplant sub-population are not informative given the small size of each patient subgroup in this population. The QuantiFERON™ test is therefore better able to predict a lack of viremia control at 3 months for transplant patients with or without virological resistance to antivirals.

Keywords : Cytomegalovirus, QuantiFERON CMV, Resistance, Transplantation

