

Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 14 octobre 2022

Par **Sarah MAFI**

Née le 03/03/1994 à Talence (33).

Evaluation prospective du risque d'infection à cytomégalovirus du sujet transplanté rénal R+ par le test QuantiFERON®-CMV et la PCR Torque teno virus.

Thèse dirigée par le Pr. Sébastien HANTZ

Examineurs :

Pr. Sophie ALAIN, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Médecine, Université de Limoges

Pr. Sylvie ROGEZ, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges

Pr. Franck SAINT-MARCOUX, PU-PH, Pharmacologie-Toxicologie-Pharmacovigilance, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges

Pr. Sébastien HANTZ, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Médecine, Université de Limoges

Dr. Jérôme DARREYE, PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Université de Limoges



Faculté de Pharmacie

Année 2022

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 14 octobre 2022

Par **Sarah MAFI**

Née le 03/03/1994 à Talence

Evaluation prospective du risque d'infection à cytomégalovirus du sujet transplanté rénal R+ par le test QuantiFERON[®]-CMV et la PCR Torque teno virus.

Thèse dirigée par le Pr. Sébastien HANTZ

Examineurs :

Pr. Sophie ALAIN, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Médecine, Université de Limoges

Pr. Sylvie ROGEZ, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges

Pr. Franck SAINT-MARCOUX, PU-PH, Pharmacologie-Toxicologie-Pharmacovigilance, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges

Pr. Sébastien HANTZ, PU-PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Faculté de Médecine, Université de Limoges

Dr. Jérôme DARREYE, PH, Bactériologie-Virologie-Hygiène, Université de Limoges



Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2021

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

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

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques

Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques
Mme VIANA Marylène	Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier (*)	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme. CHAUZEIX Jasmine	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. JOST Jérémy	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

M. BASLY Jean-Philippe (*)	Chimie analytique et bromatologie
Mme BEAUBRUN-GIRY Karine	Pharmacie galénique
Mme BÉGAUD Gaëlle	Chimie analytique et bromatologie
M. BILLET Fabrice	Physiologie
M. CALLISTE Claude	Biophysique et mathématiques
M. CHEMIN Guillaume	Biochimie et biologie moléculaire
Mme CLÉDAT Dominique	Chimie analytique et bromatologie
M. COMBY Francis	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme COOK-MOREAU Jeanne	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme DELEBASSÉE Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme DEMIOT Claire-Elise (*)	Pharmacologie
M. FABRE Gabin	Biophysique et mathématiques
M. FROISSARD Didier	Botanique et cryptogamie
Mme JAMBUT Anne-Catherine (*)	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LABROUSSE Pascal (*)	Botanique et cryptogamie
Mme LAVERDET Betty	Pharmacie galénique
M. LAWSON Roland	Pharmacologie
M. LÉGER David	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MARRE-FOURNIER Françoise	Biochimie et biologie moléculaire
M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
Mme POUGET Christelle (*)	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

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

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche

Mme AUDITEAU Émilie

Épidémiologie, statistique, santé publique

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew

Chargé de cours

Mme VERCELLIN Karen

Professeur certifié

A ma grand-mère,

A mon oncle,

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

A Madame le Professeur Sylvie ROGEZ. Merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Merci pour votre accompagnement au cours de mon internat. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments respectueux.

A Madame le Professeur Sophie ALAIN, merci de m'avoir guidée dans ce travail. Merci pour votre enseignement de qualité, vos remarques éclairantes et toute l'aide que vous m'avez apportée dans la rédaction de cet article. Veuillez recevoir ici l'expression de ma gratitude et de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Franck SAINT-MARCOUX, merci de me faire l'honneur d'apporter votre expertise sur ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Sébastien HANTZ, merci pour ton encadrement et la richesse de tes enseignements. Merci pour tes conseils qui ont été précieux dans l'élaboration de cette thèse et qui ont toujours contribué à alimenter ma réflexion. Travailler à tes côtés est un réel plaisir et un grand privilège. Je te remercie également pour ton soutien moral, ta disponibilité et tes encouragements.

A Monsieur le Docteur Jérôme DARREYE, je te remercie chaleureusement d'avoir accepté de faire partie de ce jury. J'ai énormément appris à ton contact. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et la confiance que tu m'as accordée au centre de prélèvement.

Aux membres du service du Bactériologie-Virologie-Hygiène (BVH),

A Madame le Professeur Marie-Cécile PLOY, je vous remercie sincèrement pour votre accueil au sein du service de BVH pendant plusieurs semestres. Merci pour vos encouragements et toute la bienveillance dont vous avez fait preuve à mon égard. Trouvez ici l'expression de tout mon respect et de mon admiration.

Merci à tous les biologistes du secteur de BVH, au Docteur Nadia HIDRI, au Docteur Aurélie CHABAUD, au Docteur Christian MARTIN, au Docteur Fabien GARNIER, au Docteur Olivier BARRAUD et au Docteur Sylvain MEYER. Merci pour vos enseignements d'une grande qualité en microbiologie.

A tous les techniciens du service de BVH. Merci pour votre accompagnement dans ma formation et votre sympathie.

Aux membres du CNR des Herpèsvirus du CHU de Limoges,

J'adresse mes remerciements à l'ensemble de l'équipe et plus particulièrement à Françoise GARNIER pour sa gentillesse et toute son aide dans le recueil des données du protocole Quantic R+. Je remercie également Melissa GOMES-MAYERAS et Mathieu LAFARGE pour la réalisation des charges virales supplémentaires du protocole. Merci à Sandrine LUCE pour son aide dans la mise à jour des données du protocole.

Au Centre d'Epidémiologie, de Biostatistique et de Méthodologie de la Recherche (CEBIMER),

A Madame Anaïs LABRUNIE, merci pour ta disponibilité et la réalisation des analyses statistiques des données du protocole.

Au personnel du centre de prélèvement du CHU de Limoges,

Merci à l'ensemble de l'équipe du centre de prélèvement du CHU de Limoges. Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse.

A l'équipe de l'UMR 1092,

Merci à l'équipe de Virologie ainsi que l'ensemble du personnel de l'UMR Inserm 1092.

A ma famille, à mes proches.

A mes parents, merci pour tout votre amour, il me porte chaque jour et me permet d'avancer. Merci pour votre soutien à toute épreuve et votre confiance indéfectible dans mes choix. Merci pour toutes les valeurs que vous m'avez inculquées. Je vous aime.

A ma grand-mère et ma grande tante, merci d'avoir été présentes à chaque étape de ma vie, pour votre soutien dans mes projets et vos encouragements. Vous avez comblé mon enfance et je vous en remercie.

A mes deux grands-pères, vous êtes toujours avec moi, je ne vous oublie pas.

A ma grand-mère et à mon oncle, vous me manquez déjà tellement.

A Christine et Stéphane, merci d'être présents depuis de nombreuses années.

A Joseline, toujours présente pour nous. Merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité.

A Justina, mon amie de toujours. Je sais que je peux compter sur toi. Je te souhaite tout le succès que tu mérites pour ta thèse de sciences.

A Emma, merci pour ton amitié, ton soutien et toutes les discussions que nous avons partagées. Ensemble, nous aurons découvert tous les plans d'eau du Limousin !

A Charles, merci pour ton soutien inconditionnel et ta présence durant ces années.

Un merci à tous mes co-internes ainsi qu'à toutes ces belles rencontres limougeaudes. A mes amis bordelais de plus longue date, je ne vous oublie pas.

DROITS D'AUTEURS

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



LISTE DES ABREVIATIONS

ACV	Aciclovir
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ATUn	Autorisation temporaire d'utilisation nominative
CDV	Cidofovir
CI₅₀	Concentration inhibitrice 50%
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CMVH	Cytomégalovirus humain
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
D-	Donneur séronégatif
D+	Donneur séropositif
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
EBV	Virus Epstein-Barr
ECP	Effet cytopathique
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELISpot	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Spot</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	Foscarnet

gB (ou gH, gM, gN, gL, gO)	Glycoprotéine B (ou H, M, N, L, O)
GCV	Ganciclovir
HHV	Herpèsvirus humain
HSV	Virus herpès simplex
ICS	<i>Intracellular Cytokines Staining</i>
IFN	Interf
IgM, IgG	Immunoglobulines de type G, de type M
IRL	<i>Internal repeat long</i>
IRL	<i>Internal repeat short</i>
IS	Index de sensibilité
IV	Intraveineux
Kb	Kilo paire de bases
LB	Lymphocyte B
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LT	Lymphocyte T
LTV	Letermovir
LZ	<i>Leucine zipper</i>
MBV	Maribavir
MCP	<i>Major capsid protein</i>
MIEP	<i>Major Immediate Early Promoter</i>
MRC-5	Fibroblastes diploïdes issus de poumons d'embryons fœtaux humains
pac	<i>Cis-acting packaging element</i>
PAMPS	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
PGF	<i>Platelet growth factor</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
QF-CMV	QuantiFERON-CMV®
R-	Receveur séronégatif
R+	Receveur séropositif
SCP	<i>Small Capsid Protein</i>
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience acquise
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TRL	<i>Terminal repeat long</i>
TRS	<i>Terminal Repeat Small</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TTV	Torque teno virus
UL	Segment unique long
US	Segment unique court
Val-ACV	Valaciclovir
Val-GCV	Valganciclovir
VIH	Virus de l'Immunodéficience humaine
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive
VZV	Virus de la varicelle et du zona
ZF	<i>Zinc finger</i>

TABLE DES MATIERES

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	24
I. LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN.....	25
I.1. Classification.....	25
I.2. Structure du virus.....	26
I.2.1. L'enveloppe.....	26
I.2.2. Le tégment.....	27
I.2.3. La capside.....	27
I.2.4. Le génome.....	27
I.3. Réplication virale.....	30
II. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A CMVH.....	33
III. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A CMVH.....	34
III.1. Modes de transmission.....	34
III.2. Tropisme cellulaire et dissémination virale.....	34
III.3. Latence et réactivation.....	35
IV. REPONSE IMMUNITAIRE AU COURS DE L'INFECTION A CMVH.....	37
IV.1. Réponse immunitaire innée.....	37
IV.1.1. Cellules dendritiques.....	37
IV.1.2. Macrophages.....	37
IV.1.3. Cellules NK.....	38
IV.1.4. Lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$).....	39
IV.2. Réponse immunitaire adaptative.....	40
IV.2.1. Réponse lymphocytaire T CD4+.....	40
IV.2.2. Réponse lymphocytaire T CD8+.....	41
IV.2.3. Réponse humorale spécifique.....	42
IV.2.4. Echappement du CMVH au système immunitaire.....	45

V. MANIFESTATIONS CLINIQUES DE L'INFECTION A CMVH	46
V.1. Infection de l'individu immunocompétent	46
V.2. Infection materno-fœtale	46
V.3. Infection de l'individu immunodéprimé	49
V.3.1. Patient infecté par le VIH	49
V.3.2. Patient receveur de greffe.....	50
V.3.2.1. Patient transplanté d'organe solide	53
V.3.2.2. Patient greffé de CSH.....	53
VI. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'INFECTION A CMVH	55
VI.1. Diagnostic direct	55
VI.1.1. Examen cytologique et histologique des tissus.....	55
VI.1.2. Détection des antigènes viraux	56
VI.1.3. Culture cellulaire	57
VI.1.4. Détection des acides nucléiques viraux par biologie moléculaire.....	58
VI.2. Diagnostic indirect	61
VI.2.1. Techniques sérologiques	61
VI.2.2. Test de mesure d'avidité des IgG anti-CMVH.....	62
VII. TRAITEMENTS DE L'INFECTION A CMVH	64
VII.1. Inhibiteurs de la polymérase virale pUL54.....	64
VII.1.1. Ganciclovir (GCV) et Valganciclovir (Val-GCV).....	64
VII.1.2. Cidofovir (CFV).....	65
VII.1.3. Foscarnet (FOS)	65
VII.1.4. Aciclovir (ACV) et Valaciclovir (Val-ACV)	66
VII.2. Nouvelles molécules	66
VII.2.1. Letermovir (LTV).....	66
VII.2.2. Maribavir (MBV).....	67
VIII. STRATEGIES THERAPEUTIQUES DE L'INFECTION A CMVH	69
VIII.1. Traitement préventif.....	69

VIII.1.1. Traitement prophylactique	69
VIII.1.2. Traitement préemptif.....	69
VIII.2. Traitement curatif.....	70
VIII.3. Immunoglobulines intraveineuses	70
IX. RESISTANCE DU CMVH AUX ANTIVIRAUX.....	72
IX.1. Généralités	72
IX.2. Mécanismes de résistance	73
IX.2.1. Mutations de résistance de la kinase virale pUL97	73
IX.2.2. Mutations de résistance de la polymérase virale pUL54.....	74
IX.2.3. Mutations de résistance dans le complexe terminase	75
IX.3. Détection de la résistance.....	77
IX.3.1. Approche phénotypique.....	77
IX.3.2. Approche génotypique	77
X. EVALUATION DE L'ETAT IMMUNITAIRE	79
X.1. Méthodes basées sur la détection de l'IFN- γ	79
X.1.1. QuantiFERON-CMV® (QF-CMV)	79
X.1.2. ELISpot.....	84
X.1.3. Marquage Intracellulaire des cytokines (ICS)	86
X.1.4. Test de marquage par des multimères du CMH (ou CMH-multimère)	87
X.2. Exploration d'autres marqueurs	88
X.3. Torque teno virus (TTV).....	88
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE.....	91
I. INTRODUCTION.....	94
II. MATERIALS AND METHODS.....	96
III. RESULTS.....	100
IV. DISCUSSION.....	117
V. CONCLUSION DE L'ETUDE.....	127

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	130
SERMENT DE GALIEN	142

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure d'une particule virale de CMVH.	26
Figure 2 : Structure du génome du CMVH.	29
Figure 3 : Cycle de réplication du CMVH.....	32
Figure 4 : Séroprévalence mondiale de l'infection à CMVH chez les adultes.	33
Figure 5 : Physiopathologie de l'infection à CMVH.....	36
Figure 6 : Cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC, <i>antibody-dependant cellular cytotoxicity</i>).	38
Figure 7 : Réponse immunitaire dirigée contre le CMVH.	43
Figure 8 : Physiopathologie de la transmission materno-foetale du CMVH.	48
Figure 9 : Physiopathologie du CMVH en transplantation.....	52
Figure 10 : Cellules infectées par le CMVH révélant de grands corps d'inclusions intranucléaires typiques en « œil de hibou » (HE, x 1920).	55
Figure 11 : Détection de l'antigène pp65 du CMVH dans les polynucléaires du sang circulant.	56
Figure 12 : Isolement du CMVH en culture cellulaire.	57
Figure 13 : Principe de la technologie TaqMan.....	60
Figure 14 : Principe du test d'avidité.	63
Figure 15 : Mécanisme d'action des antiviraux anti-CMVH.....	68
Figure 16 : Carte des mutations de résistance de la kinase virale pUL97.	74
Figure 17 : Carte des mutations de résistance de la polymérase virale pUL54.	75
Figure 18 : Carte des mutations de résistance de pUL56.	76
Figure 19 : Principe du test QF-CMV.....	80
Figure 20 : Principe du test ELISpot.	85
Figure 21 : Principe du test ICS.	86
Figure 22 : Principe du test CMH-multimère.	87
Figure 23 : Particules de TTV visualisées en microscopie électronique, après coloration négative à l'acétate d'uranyle.....	89

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des virus de la famille des <i>Herpesviridae</i> impliqués en pathologie humaine.....	25
Tableau 2 : Recommandations pour la prévention de l'infection à CMVH chez les transplantés d'organe solide.	71
Tableau 3 : Interprétation des résultats du test QF-CMV.....	81

PARTIE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN

I.1. Classification

La famille des *Herpesviridae* est constituée d'une centaine d'espèces virales dont 9 strictement humaines (Tableau 1). Les 9 herpèsvirus strictement humains sont divisés en 3 sous-familles sur la base de certaines propriétés biologiques. Le CMVH ou human herpesvirus 5 (HHV-5) appartient à la sous-famille des *Betaherpesvirinae*, dans laquelle les 6^{ème} et 7^{ème} herpèsvirus humains (HHV-6 et HHV-7) sont également retrouvés.

Tableau 1 : Classification des virus de la famille des *Herpesviridae* impliqués en pathologie humaine.

Sous-famille	Genre	Espèce
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Virus herpès simplex 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2)
	<i>Varicellovirus</i>	Virus de la varicelle et du zona (VZV)
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Cytomégalovirus humain (CMVH)
		Herpèsvirus humain 6A (HHV-6A)
	<i>Roseolovirus</i>	Herpèsvirus humain 6B (HHV-6B) Herpèsvirus humain 7 (HHV-7)
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Virus Epstein-Barr (EBV)
	<i>Rhadinovirus</i>	Herpèsvirus humain 8 (HHV-8)

I.2. Structure du virus

Le virion du CMVH a une morphologie similaire à celle des autres membres de la famille des *Herpesviridae*. Il mesure entre 150 et 200 nm de diamètre et se compose d'une enveloppe comportant des glycoprotéines, d'une substance amorphe appelée tégument, et d'une nucléocapside icosaédrique renfermant le génome viral (Figure 1).

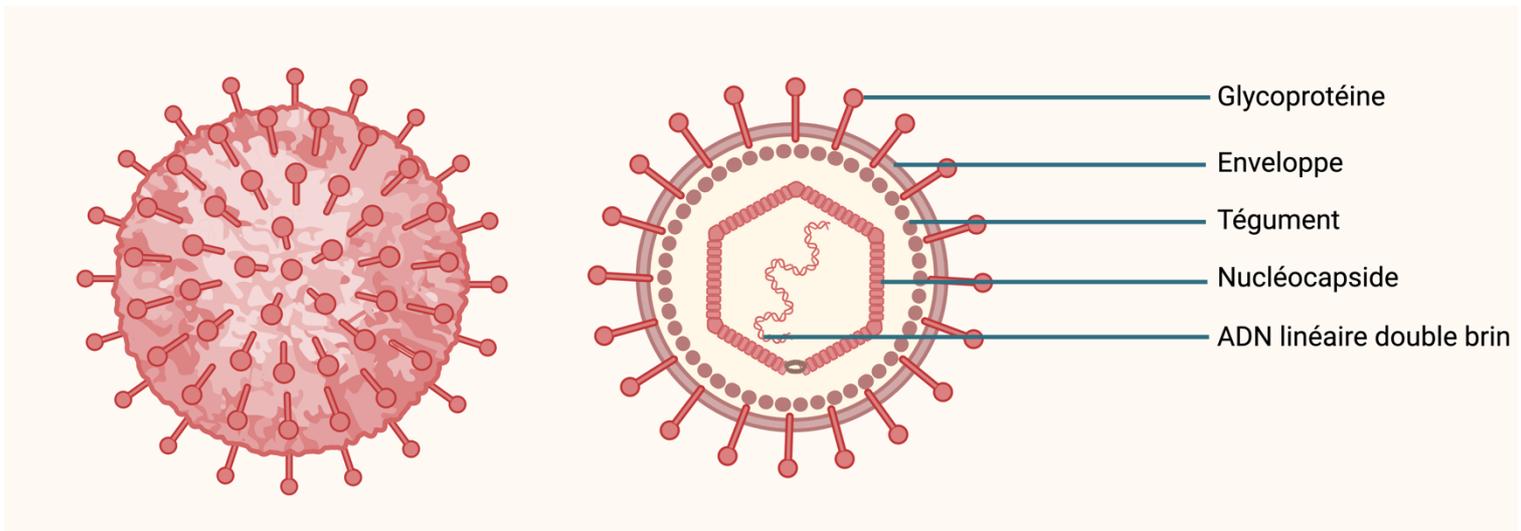


Figure 1 : Structure d'une particule virale de CMVH.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

I.2.1. L'enveloppe

L'enveloppe est constituée d'une bicouche phospholipidique dérivée des membranes nucléaires et intracytoplasmiques de la cellule infectée. Elle confère au virion une sensibilité aux solvants, aux pH acides et à la chaleur. L'enveloppe porte des glycoprotéines virales, en particulier gpUL55 (gB), gpUL75 (gH), gpUL100 (gM), gpUL73 (gN), gpUL115 (gL), gpUL74 (gO) et pUL128/pUL130/pUL131. Les principales glycoprotéines sont gB et gH, celles-ci sont impliquées dans l'attachement et la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte. La glycoprotéine gB, particulièrement immunogène, constitue la cible majeure des anticorps neutralisants (1,2).

I.2.2. Le tégument

Le tégument (ou matrice) est une structure amorphe située entre l'enveloppe et la capsid. Il comporte au moins 25 phosphoprotéines qui interviennent dans toutes les étapes du cycle viral et dont les principales sont pp65 (ppUL83), pp150 (ppUL32) et pp71 (ppUL82) (3). La phosphoprotéine pp65 est la protéine la plus abondante du tégument (95% de la masse du tégument) et du virion. Cette protéine, très immunogène, est impliquée dans les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire innée et adaptative au cours de l'infection à CMVH. La protéine pp150 est la deuxième protéine la plus abondante du tégument (20% des protéines totales du virion) et est également très immunogène. La protéine pp71 joue, quant à elle, un rôle important dans l'activation des gènes IE lors de la phase très précoce du cycle de réplication virale (4,5).

I.2.3. La capsid

La capsid icosaédrique mesure environ 100 nm de diamètre et se compose de 162 capsomères (1 penton aux 12 sommets de l'icosaèdre et 150 hexons). Elle est constituée de deux protéines principales : la protéine majeure de capsid (MCP : *Major Capsid Protein* ; pUL86) et la protéine mineure de capsid (mCP : *Minor Capsid Protein* ; pUL85). La MCP est le constituant principal des pentamères et hexamères (90% des protéines de capsid). La mCP est située à l'intérieur de la capsid et joue un rôle dans l'ancrage de l'ADN à la capsid. La mC-BP (*minor capsid binding protein* ; pUL46) est une protéine mineure de capsid. Elle est liée à la mCP et assure le maintien des pentamères et des hexamères. D'autres protéines, la pUL80a (p30), la pUL48/49 (SCP : *smallest capsid protein*), sont impliquées dans l'assemblage de la capsid (6).

I.2.4. Le génome

Le génome est une molécule d'ADN bicaténaire linéaire de 230 à 250 kpb. Il code 180 protéines dont 35 constitutives de la particule virale, les autres intervenant dans la réplication virale. Il s'agit de l'un des génomes les plus longs et les plus complexes parmi les *Herpesviridae* connus à ce jour (3). Sa teneur en G+C est de 57%. Il se compose de deux segments uniques :

le segment long U_L (*unique long*, 82% de la molécule) et le segment court U_S (*unique short*, 18% de la molécule) (Figure 2). Les segments U_L et U_S peuvent adopter deux conformations ; il en résulte 4 formes isomériques de l'ADN viral.

Les segments uniques sont flanqués par des séquences inversées et répétées : IRS (*Internal Repeat Short*) et TRS (*Terminal Repeat Short*) pour le segment U_S et IRL (*Internal Repeat Long*) et TRL (*Terminal Repeat Long*) pour le segment U_L . Le génome du CMVH comporte, à ses deux extrémités et entre les éléments IRL et IRS, des séquences répétées appelées séquences « a » qui contiennent des éléments cis-régulateurs nommés « *pac* » ou « *cis-acting packaging element* ». Ces séquences régulatrices sont impliquées dans le processus d'encapsidation de l'ADN, en intervenant dans le clivage des concatémères d'ADN produits lors de la réplication virale.

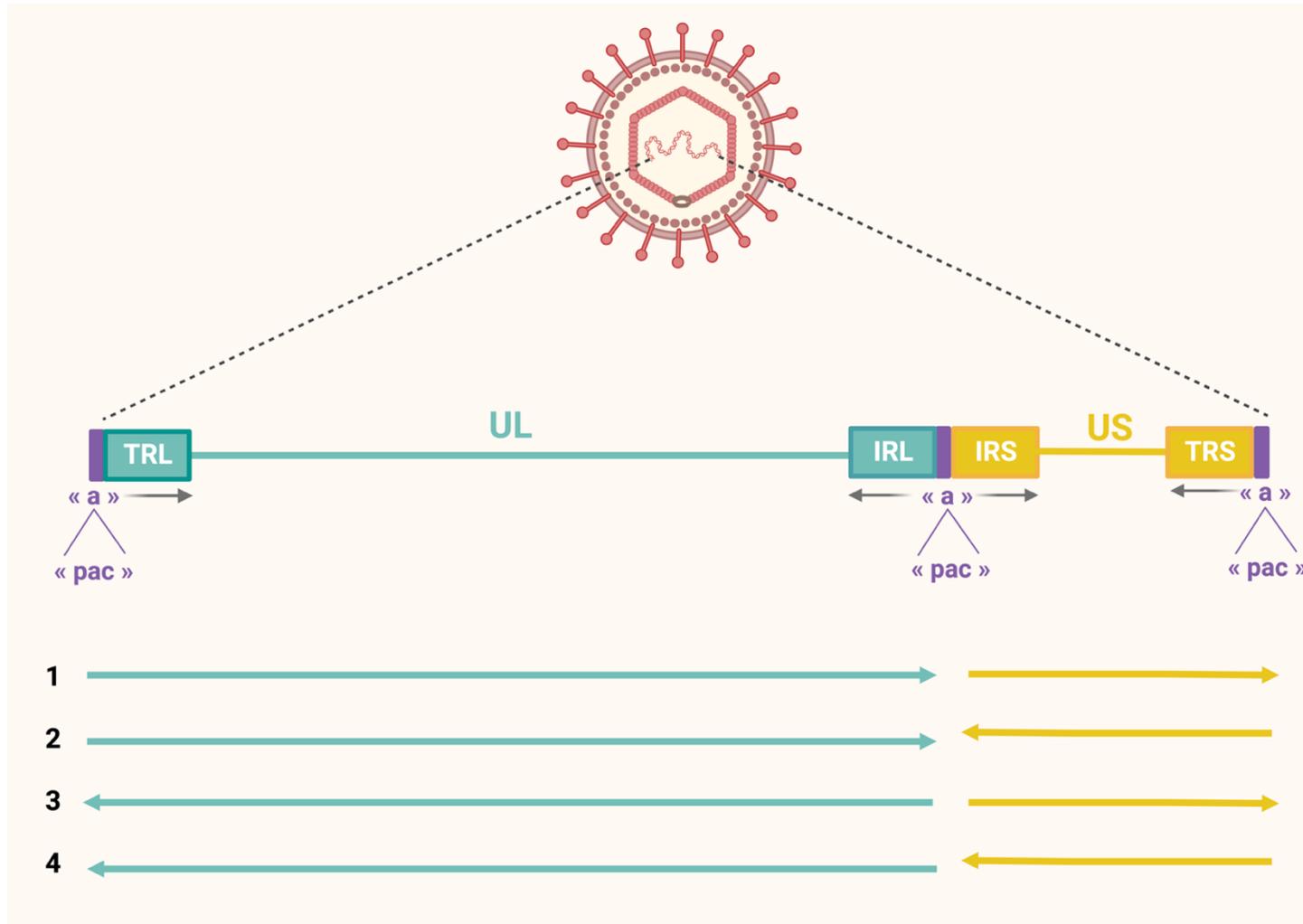


Figure 2 : Structure du génome du CMVH.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

U_L (Unit Long), U_S (Unit Short), TRL (Terminal Repeat Long), IRL (Internal Repeat Long), IRS (Internal Repeat Short), TRS (Terminal Repeat Short).

1, 2, 3 et 4 correspondent aux 4 isomères. L'orientation des gènes est représentée par une flèche.



I.3. Réplication virale

Le CMVH ne se réplique que dans des cellules humaines. Seuls les fibroblastes embryonnaires humains permettent une production de virions à titre élevé en culture cellulaire. Le virus se multiplie lentement *in vitro* (96 à 120 heures), par contraste avec le temps de doublement *in vivo* de 24h.

L'infection virale débute par la fixation de la particule virale sur la cellule cible (Figure 3). Les récepteurs et corécepteurs du CMVH, sont multiples, et probablement encore incomplètement connus. Ils incluent le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*), du PGF (*platelet growth factor*) et de l'intégrine $\alpha_5\beta_3$ (3). La pénétration du virus se fait par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire ou endocytose selon le type cellulaire. Les protéines du tégment sont ensuite libérées dans le cytoplasme. La nucléocapside virale est transportée via le réseau de microtubules jusqu'au noyau, où l'ADN viral est libéré et circularisé. Le virus bloque le cycle cellulaire en inhibant la transcription des cyclines A et E et séquestre dans le noyau les protéines cellulaires nécessaires à sa réplication. Le cycle réplcatif du CMVH se décompose, comme pour les autres *Herpesviridae*, en 3 phases coordonnées en cascade :

- La phase très précoce α ou *Immediate Early* (IE) où se déroule la synthèse de protéines transactivatrices et régulatrices. La phosphoprotéine du tégment ppUL82 stimule la transcription des gènes IE. Les régions IE1 (20% des gènes IE) et IE2 (80% des gènes IE) sont abondamment transcrites à partir d'un promoteur-activateur puissant (MIEP : *Major Immediate Early Promoter*). Les gènes IE codent des protéines très précoces telles que IE86, IE72 et IE55, qui sont impliquées dans l'activation et la répression des gènes viraux et cellulaires.
- La phase précoce β ou *Early* (E) où se déroule la synthèse de protéines intervenant dans la réplication du génome viral, dont l'ADN polymérase (pUL54), sa protéine accessoire (pUL44), le complexe hélicase-primase (pUL105-pUL102-pUL70) et la phosphoprotéine (pUL97).
- La phase tardive γ ou *Late* (L) où se déroule la synthèse des protéines de structure du virion avec les protéines de capsid, les protéines de l'enveloppe et les protéines du tégment.



La réplication, selon le modèle du cercle roulant, dépend de plusieurs protéines et plus particulièrement du complexe hélicase-primase (pUL105-pUL102-pUL70) et l'ADN polymérase virale pUL54 (7). L'origine de réplication, unique, est située dans la région U_L. La réplication aboutit à la formation de concatémères d'ADN, formés d'enchaînements d'unités génomiques virales.

L'encapsidation du génome a lieu dans le noyau. Le complexe terminase composé de plusieurs protéines (pUL56-pUL89-pUL51 et des protéines partenaires) permet la reconnaissance et le clivage des unités de génomes dans des capsides néoformées. Le processus d'encapsidation implique un clivage site-spécifique au niveau de séquences riches en AT des éléments « pac » (7). Le complexe terminase effectue un premier clivage site-spécifique au niveau de ces motifs et recrute une capside vide. Un second clivage de l'ADN est alors réalisé et l'ADN est libéré dans la capside via une interaction avec les protéines pUL104 (protéines portails). Le complexe terminase se dissocie ensuite pour permettre une nouvelle encapsidation.

L'exportation de la capside hors du noyau est réalisée via la phosphotransférase pUL97 et sa protéine accessoire pUL27. Le transport de la nucléocapside dans le cytoplasme est pris en charge par le réseau des microtubules. Les protéines du tégment sont acquises dans le cytoplasme. L'enveloppe définitive et les protéines virales de l'enveloppe sont acquises au niveau du réticulum endoplasmique rugueux et/ou l'appareil de Golgi. Les néovirions sont rassemblés dans des vésicules intracellulaires avant d'être excrétés hors de la cellule par fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique ou par exocytose. Des particules virales appelées corps denses sont produites au cours des cycles de multiplication. Ces structures enveloppées de 400 à 600 nm sont constituées majoritairement de protéines du tégment et peuvent représenter jusqu'à 50% de la production virale en culture cellulaire.

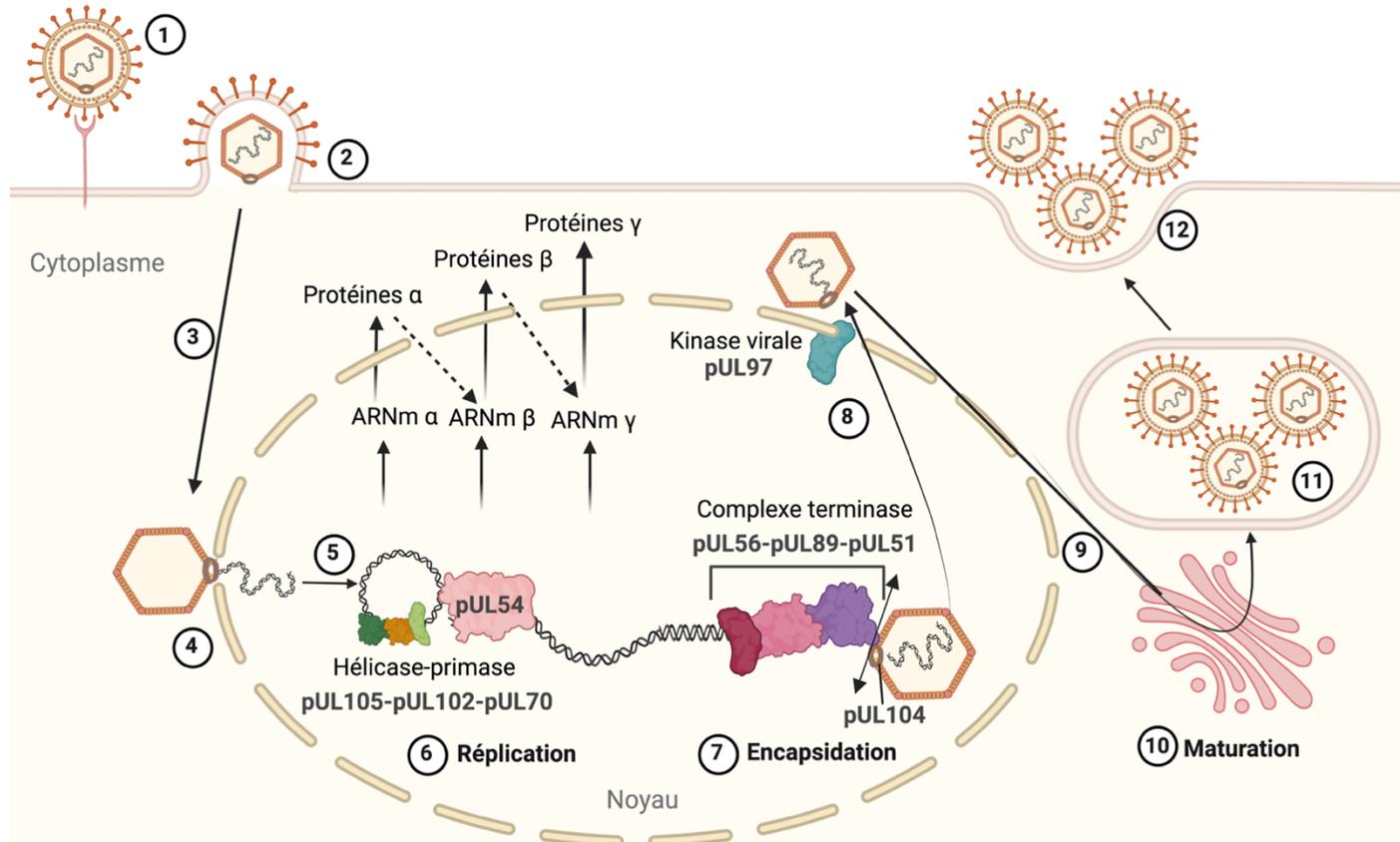


Figure 3 : Cycle de réplication du CMVH.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

Après l'attachement (1), la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire aboutit à la pénétration du virus (2). La nucléocapside est transportée jusqu'au noyau (3). Après décapsulation (4), l'ADN viral libéré est circularisé (5). Les gènes viraux sont exprimés de manière séquentielle (phases α , β et γ). La réplication (6) dépend notamment du complexe hélicase-primase (pUL105-pUL102-pUL70) et de l'ADN polymérase (pUL54). Le complexe terminase (pUL56-pUL89-pUL51) participe à l'encapsulation du génome viral (7). La translocation de l'ADN dans la capsid est réalisée par l'interaction entre le complexe terminase et les protéines pUL104. La sortie du néovirion nécessite la kinase virale pUL97 (8). Le néovirion est transporté dans le cytoplasme (9) permettant sa maturation et son enveloppement au niveau du réticulum endoplasmique rugueux et/ou l'appareil de Golgi (10). Les néovirions sont rassemblés dans des vésicules intracellulaires (11) avant leur exécution hors de la cellule (12).



II. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A CMVH

Les infections à CMVH sont endémiques, présentes dans le monde entier et surviennent tout au long de l'année sans recrudescence saisonnière (8). La séroprévalence est corrélée au niveau socio-économique (9) et augmente avec l'âge (10). L'acquisition du virus se fait principalement dans la petite enfance par l'allaitement et les contacts rapprochés en collectivité, avec en deuxième pic entre 16 et 25 ans par transmission sexuelle. Dans les pays industrialisés, plus de 50% des femmes en âge de procréer sont séronégatives (8). En 2010, la séroprévalence chez les femmes françaises âgées de 15 à 49 ans était estimée à 45,6% (11). Dans les pays en voie de développement, la séroprévalence peut dépasser 95% à l'âge adulte (12) (Figure 4).

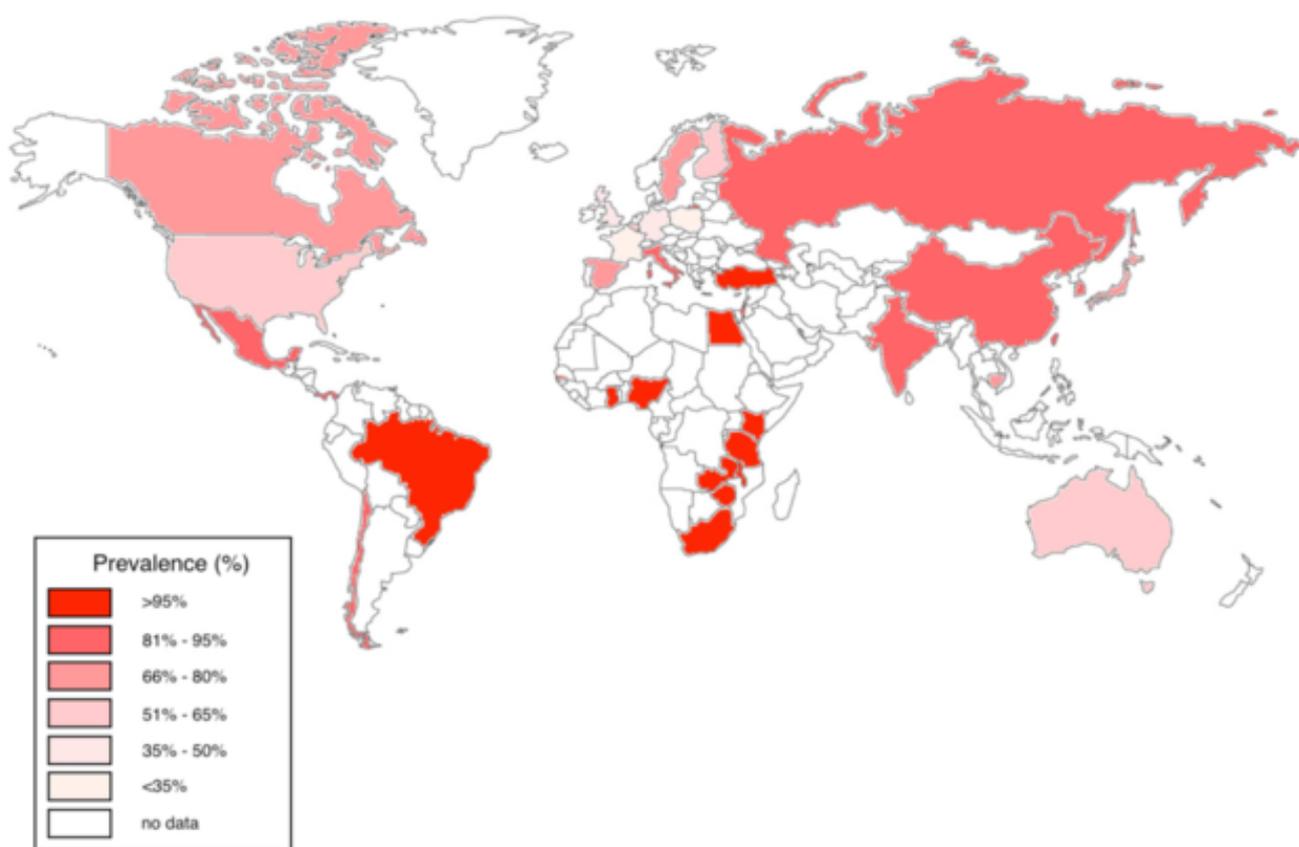


Figure 4 : Séroprévalence mondiale de l'infection à CMVH chez les adultes.

D'après Adland *et al.*, 2015 (12).



III. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A CMVH

III.1. Modes de transmission

En raison de sa haute spécificité d'espèce, l'unique réservoir du CMVH est l'Homme. Très fragile, le CMVH ne conserve pas son pouvoir infectieux dans le milieu extérieur. La transmission nécessite donc un contact étroit ou intime avec des sujets excréant du virus au cours d'une primo-infection ou à l'occasion d'une réactivation souvent asymptomatique. Le virus est transmissible par voie naturelle, verticalement de la mère à l'enfant (*in utero*, lors de l'accouchement ou en *post-partum*) ou horizontalement par contact direct avec des liquides biologiques contaminés tels que les larmes, la salive, les sécrétions respiratoires, le lait maternel, les urines, les sécrétions cervico-vaginales et le sperme.

La transmission iatrogène survient après une allogreffe ou plus rarement, lors d'une transfusion. La transfusion de produits sanguins labiles non déleucocytés a permis de réduire considérablement le risque de transmission. La transplantation d'organes de donneurs séropositifs reste un facteur de risque majeur de transmission.

III.2. Tropisme cellulaire et dissémination virale

De nombreux types cellulaires sont permissifs à l'infection *in vivo* (cellules endothéliales, épithéliales, fibroblastiques, dendritiques, macrophagiques, cellules nerveuses, cellules musculaires lisses et hépatocytes). Ce large tropisme contribue à la diversité des manifestations cliniques rencontrées.

L'acquisition du virus par voie respiratoire, hématogène, sexuelle ou materno-fœtale est suivie d'une phase de dissémination sanguine transitoire (Figure 5). Cette capacité de dissémination dans tout l'organisme est liée à la distribution ubiquitaire des cibles cellulaires du virus. Une fois les cellules cibles atteintes, la diffusion se fait de cellule à cellule, le virus étant véhiculé par les cellules endothéliales, les polynucléaires et les monocytes-macrophages. Les cellules endothéliales infectées recrutent les polynucléaires neutrophiles, par sécrétion de cytokines, telles que l'IL-8. Les polynucléaires, qui acquièrent le virus par contact direct, ne sont pas le siège d'une réplication virale mais contribuent à la dissémination

du virus. Les cellules endothéliales infectées transmettent le virus aux monocytes circulants, eux-mêmes capables de multiplier le virus lorsqu'ils se différencient en macrophages ou cellules dendritiques. Les cellules endothéliales dans lesquelles le virus se réplique fortement, peuvent se détacher de la paroi vasculaire, circuler et, après séquestration dans les capillaires, induire l'infection d'un organe (3,13).

III.3. Latence et réactivation

Après la primo-infection, le CMVH persiste à l'état latent dans l'organisme. La latence, caractérisée par le maintien du génome viral sous forme épisomale, s'établit dans de nombreux types cellulaires et notamment dans les cellules endothéliales, les progéniteurs médullaires (cellules CD34+) et les monocytes circulants. Les mécanismes moléculaires de maintien de la latence et de la réactivation restent à ce jour peu connus.

Le virus se réactive périodiquement chez l'individu immunocompétent, conduisant à des épisodes d'excrétion intermittente de virus dans les différents liquides biologiques (salive, urine, sécrétions cervicales, sperme...), sources potentielles de transmission du virus. Le système immunitaire de l'hôte contrôle de manière complexe l'état de latence mais également la réactivation. En effet, différents stimuli tels qu'une immunodépression ou une stimulation allogénique peuvent provoquer une réactivation et aboutir à une nouvelle virémie (13).

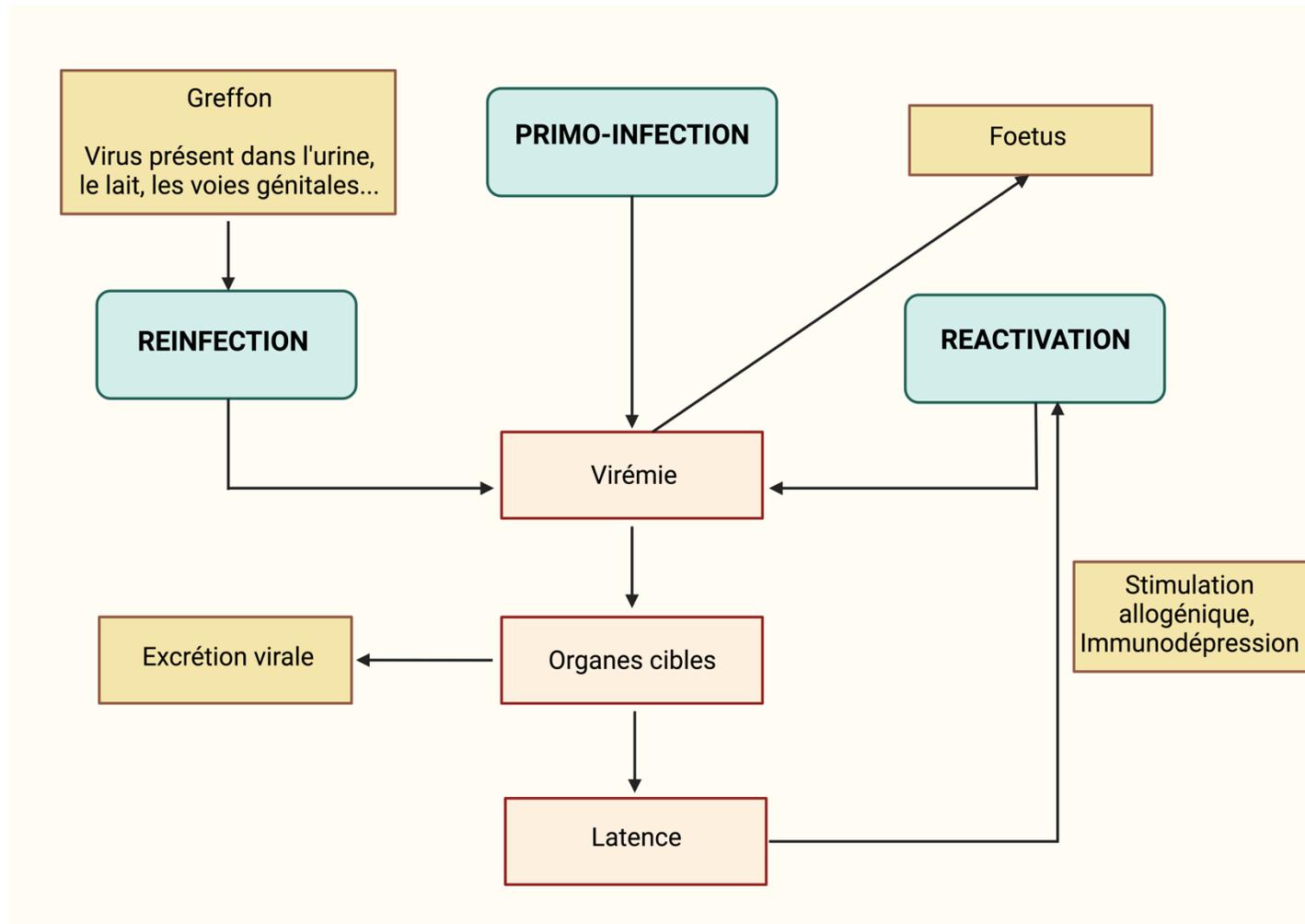


Figure 5 : Physiopathologie de l'infection à CMVH.

Adapté de Mazon *et al.*, 2015 (13).

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).



IV. REPONSE IMMUNITAIRE AU COURS DE L'INFECTION A CMVH

IV.1. Réponse immunitaire innée

L'immunité innée constitue une première barrière contre l'infection virale et permet la bonne mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

L'initiation de la réponse immunitaire innée est permise par la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes appelés PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) par des récepteurs PRR (*pattern recognition receptor*). Parmi les récepteurs d'activation, les molécules TLR (*Toll-like receptors*), exprimées principalement par les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages, jouent un rôle majeur. La stimulation des TLR par le CMVH active les voies de transduction de signaux induisant la production de cytokines pro-inflammatoires. Ce mécanisme permet le recrutement des cellules du système immunitaire inné sur le site de l'infection ainsi que leur activation. De plus, les TLR opèrent une régulation positive des molécules de co-stimulation telles que CD80 ou CD86, qui interviennent dans la réponse immunitaire adaptative (1). Chez l'Homme, l'interaction entre le TLR2 et les protéines virales gB/gH entraîne l'activation de la voie NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) et la production de cytokines pro-inflammatoires (1,14–16). L'activation du système immunitaire inné induit ainsi l'activation des cellules dendritiques, des macrophages, des cellules NK (*Natural Killer*) et des lymphocytes T $\gamma\delta$.

IV.1.1. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sécrètent des cytokines, notamment de l'IFN- γ , permettant le développement de la réponse immunitaire spécifique.

IV.1.2. Macrophages

Les macrophages, cellules différenciées à partir des monocytes, jouent un rôle central dans la réponse immunitaire. Ils interviennent, d'une part, dans l'immunité innée par leur fonction de phagocytose et, d'autre part, ils initient la réponse adaptative par leur fonction de présentation des antigènes viraux aux lymphocytes T de type CD4+ (LT CD4+) et par la



production de cytokines, en particulier l'IL-1 (6). Les macrophages peuvent également servir d'effecteurs pour les anticorps monoclonaux *via* un mécanisme de cytotoxicité médié par l'anticorps (*antibody-dependant cellular cytotoxicity*, ADCC) (Figure 6). Les macrophages possèdent des récepteurs spécifiques pour le fragment Fc des IgG. Les anticorps anti-CMV fixés aux macrophages *via* leur fragment Fc, peuvent se fixer *via* leurs fragments Fab sur les antigènes viraux exprimés par les cellules infectées. L'anticorps réalise ainsi un « pont » entre la cellule infectée et le macrophage, qui peut exercer une activité cytotoxique sur celle-ci (6).

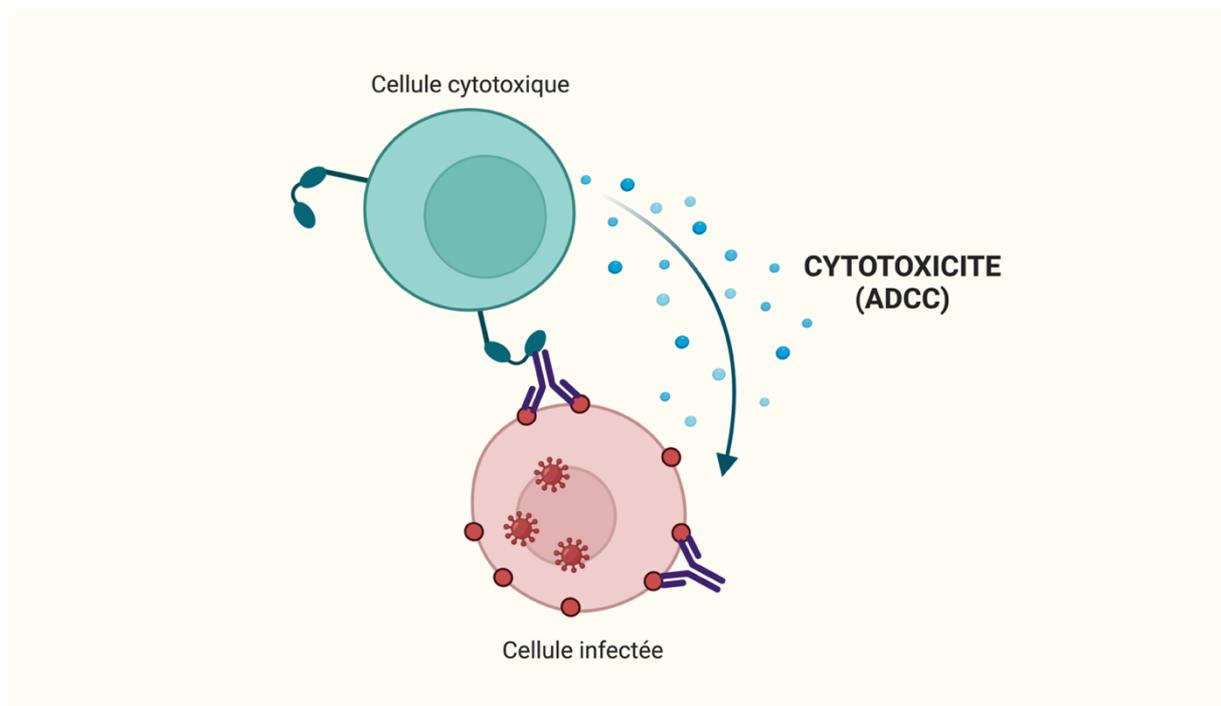


Figure 6 : Cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC, *antibody-dependant cellular cytotoxicity*).

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

IV.1.3. Cellules NK

Les cellules NK représentent 5 à 10% des lymphocytes circulants. Elles ont pour vocation d'éliminer les cellules anormales (tumoraux ou infectées) qui présentent une expression altérée des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Les IFN α/β , ainsi que d'autres cytokines telles que l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, ont un effet activateur sur les cellules NK (1).

Le CMVH inhibe l'expression des molécules de CMH-I à la surface cellulaire. Cette inhibition est due à l'expression des gènes US2, US3 et US11 du CMVH, qui sont responsables de la séquestration et de la dégradation des molécules de CMH-I dans la cellule infectée (6). Cette inhibition de l'expression des molécules de CMH-I crée des conditions propices à l'activité cytotoxique des cellules NK. La cytotoxicité des cellules NK s'exerce également par le mécanisme ADCC. En effet, les cellules NK peuvent fixer le fragment Fc des anticorps par leur récepteur CD16 (17) et lyser les cellules exprimant à leur surface les protéines virales reconnues par ces anticorps.

Les déficits de l'immunité cellulaire (traitements immunosuppresseurs, patient VIH+) sont habituellement associés à un déficit de la fonction NK ; ce déficit pourrait être impliqué dans la sensibilité accrue à l'infection à CMVH. Chez les sujets transplantés rénaux, il a été démontré que l'activité des cellules NK augmentait lors d'une primo-infection ou d'une réactivation à CMVH, suggérant leur implication dans la résolution de l'infection (1,18).

IV.1.4. Lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$)

Les LT $\gamma\delta$ sont une sous-population de lymphocytes T (LT), faiblement représentée dans le sang périphérique (1 à 5 % des LT circulants). Ils sont essentiellement localisés au niveau des muqueuses et des épithéliums. Le TCR $\gamma\delta$ définit cette lignée par opposition au TCR $\alpha\beta$ des LT conventionnels. Le TCR $\gamma\delta$ reconnaît l'antigène de façon indépendante du CMH. Les LT $\gamma\delta$ présentent à la fois des caractéristiques des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Leur localisation tissulaire et leur capacité à reconnaître des antigènes natifs permettent une réponse rapide à l'agression virale. L'activation spécifique du TCR avec amplification clonale et acquisition d'un phénotype mémoire permettent un contrôle plus efficace de l'infection lors d'un nouveau contact avec le CMVH (19). Les LT $\gamma\delta$ sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) et sont capables de cytotoxicité (20) .

En transplantation rénale, une augmentation de la proportion des cellules T $\gamma\delta$ circulantes de moins de 5 à 40% a été démontrée au cours d'une infection active à CMVH (21). Il a par ailleurs été mis en évidence une expansion des cellules LT $\gamma\delta$ concomitamment à la résolution de l'infection et de la maladie à CMVH (22,23).

IV.2. Réponse immunitaire adaptative

IV.2.1. Réponse lymphocytaire T CD4+

La réponse lymphocytaire T *helper* joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire anti-CMVH puisqu'elle active la réponse cytotoxique des LT CD8+ et la réponse anticorps des lymphocytes B (LB) (Figure 7).

Les LT CD4+ reconnaissent des antigènes viraux présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par des molécules de CMH classe II (CMH-II). Les épitopes reconnus appartiennent notamment aux glycoprotéines d'enveloppe gB et gH, aux protéines très précoces IE1, IE2 et UL69, et à la protéine tégumentaire ppUL83 (13). L'interaction du TCR avec le complexe CMH-II/épitope viral, en présence d'IL-1 produite par la CPA, conduit à l'activation du LT CD4+. Cette activation entraîne une phase d'expansion clonale des LT CD4+ spécifiques de l'épitope viral et leur différenciation en cellules effectrices et mémoires. Les LT CD4+ effecteurs produisent alors des cytokines qui vont activer la réponse cytotoxique des LT CD8+ (réponse TH1 : IFN- γ , IL-2, IL-12) ou induire la réponse anticorps par activation des LB (réponse TH2 : IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). Par ailleurs, les LT CD4+ peuvent exercer une action cytotoxique directe sur les cellules exprimant les épitopes du CMVH associés aux molécules du CMH de classe II (24).

La réponse lymphocytaire T CD4+ est essentielle pour conférer une protection contre le CMVH. Les déficits immunitaires touchant les LT CD4+ (traitement immunosuppresseur, patient au stade SIDA) s'accompagnent d'infections à CMVH sévères et persistantes, témoignant de l'absence de contrôle de la réplication virale par le système immunitaire de l'hôte. La restauration même partielle du nombre et de la fonction des LT CD4+ s'accompagne d'une disparition de la virémie et des manifestations cliniques associées (6). Après une transplantation rénale, il a été démontré que les symptômes cliniques d'une infection à CMVH étaient précédés d'une diminution des LT CD4+ spécifiques et d'une augmentation de la charge virale (25). La quantification du nombre de LT CD4+ spécifiques pourrait ainsi être utile pour prédire le risque de maladie à CMVH.

IV.2.2. Réponse lymphocytaire T CD8+

La réponse lymphocytaire T CD8+ est indispensable au contrôle de la réplication virale. Les LT CD8+ exercent une activité cytotoxique sur les cellules infectées par le CMVH (Figure 7). Les infections sévères à CMVH chez les patients immunodéprimés sont associées à un déficit des LT CD8+ spécifiques du CMVH (6). Chez le patient transplanté rénal, la réponse T CD8+ permettrait de limiter la virémie et de protéger contre la maladie à CMVH (1,26–28). Chez les patients greffés de moelle osseuse, le transfert adoptif de clones de LT CD8+ spécifiques permet de reconstituer l'immunité cellulaire et participe au contrôle de l'infection (29,30). Néanmoins, il a été montré que le maintien des LT CD8+ transférés était dépendant de l'activité de la réponse lymphocytaire T auxiliaire (30).

L'activité des LT CD8+ est, en effet, dépendante des cytokines produites par les LT CD4+ et notamment l'IFN- γ , l'IL-2 et l'IL-12. Les LT CD8+ reconnaissent des antigènes peptidiques viraux présentés en association avec une molécule de CMH de classe I. La réponse cellulaire T CD8+ est dirigée contre une variété d'antigènes du CMVH, tels que IE-1, IE-2, pp65, pp28, pp50, pp150, la gH, la gB, US2, US3, US6, US11, UL16 et UL18 (1,31–33). Des épitopes immunodominants portés par IE1, IE2 et pp65 ont été identifiés (1). Les LT CD8+ exercent leur action cytolytique par la production de perforine et de granzyme B, ou en bloquant la réplication virale par la sécrétion d'IFN- γ ou de TNF- α (34).

Comme cela a été observé avec les LT CD4+, les LT CD8+ spécifiques du CMVH représentent une fraction importante de la population T (de l'ordre de 9 à 10% des LT mémoires) (32). Cette immunité cellulaire majoritairement dirigée contre le CMVH, pourrait expliquer en partie l'immunodépression induite par le CMVH favorisant l'infection par d'autres agents opportunistes. Par ailleurs, la proportion de LT CD8+ mémoires spécifiques de certains épitopes du CMVH augmenterait avec l'âge, et pourrait atteindre plus de 40% du pool de LT CD8+ (1,35–37). La stimulation antigénique chronique du système immunitaire en raison d'épisodes de réactivation répétés favoriserait, en effet, l'expansion périphérique d'une population oligoclonale de LT anti-CMVH au détriment des autres populations lymphocytaires T. Ce phénomène appelé « inflation de la réponse mémoire » conduirait à la perte du caractère polyclonal du répertoire T et contribuerait ainsi à l'accélération de l'immunosénescence par le CMVH (1,36,38).

IV.2.3. Réponse humorale spécifique

Les LB expriment à leur surface des immunoglobulines qui représentent le récepteur de surface pour l'antigène. En présence de cytokines produites par les LT CD4+, l'interaction entre l'immunoglobuline de surface et l'antigène de CMVH entraîne l'activation du LB et sa différenciation en plasmocyte sécréteur d'anticorps (Figure 7). La réponse anticorps est majoritairement dirigée contre les protéines du tégument ppUL32 (pp150), ppUL83 (pp65) et ppUL99 (pp28) (13). La majorité des sujets infectés possèdent des anticorps dirigés contre ppUL32. Les glycoprotéines d'enveloppe, gB (gpUL55) et gH (gpUL75) (1), ainsi que le complexe gH/gL/UL128/UL130/UL131A (39–41) sont les principales cibles des anticorps neutralisants.

La réponse immunitaire humorale ne joue qu'un rôle secondaire dans l'immunité dirigée contre le CMVH. Seules les particules virales extracellulaires sont la cible des anticorps neutralisants. Or, peu de particules virales libres sont présentes dans le milieu extracellulaire puisque la dissémination du virus s'effectue essentiellement par passage de cellule à cellule par les monocytes, les polynucléaires et les cellules endothéliales circulantes (6). Chez les sujets séropositifs pour le CMVH, la présence d'anticorps neutralisants à titre élevé ne permet pas une protection contre les réinfections ou réactivations, mais pourrait en limiter les conséquences (13,42).

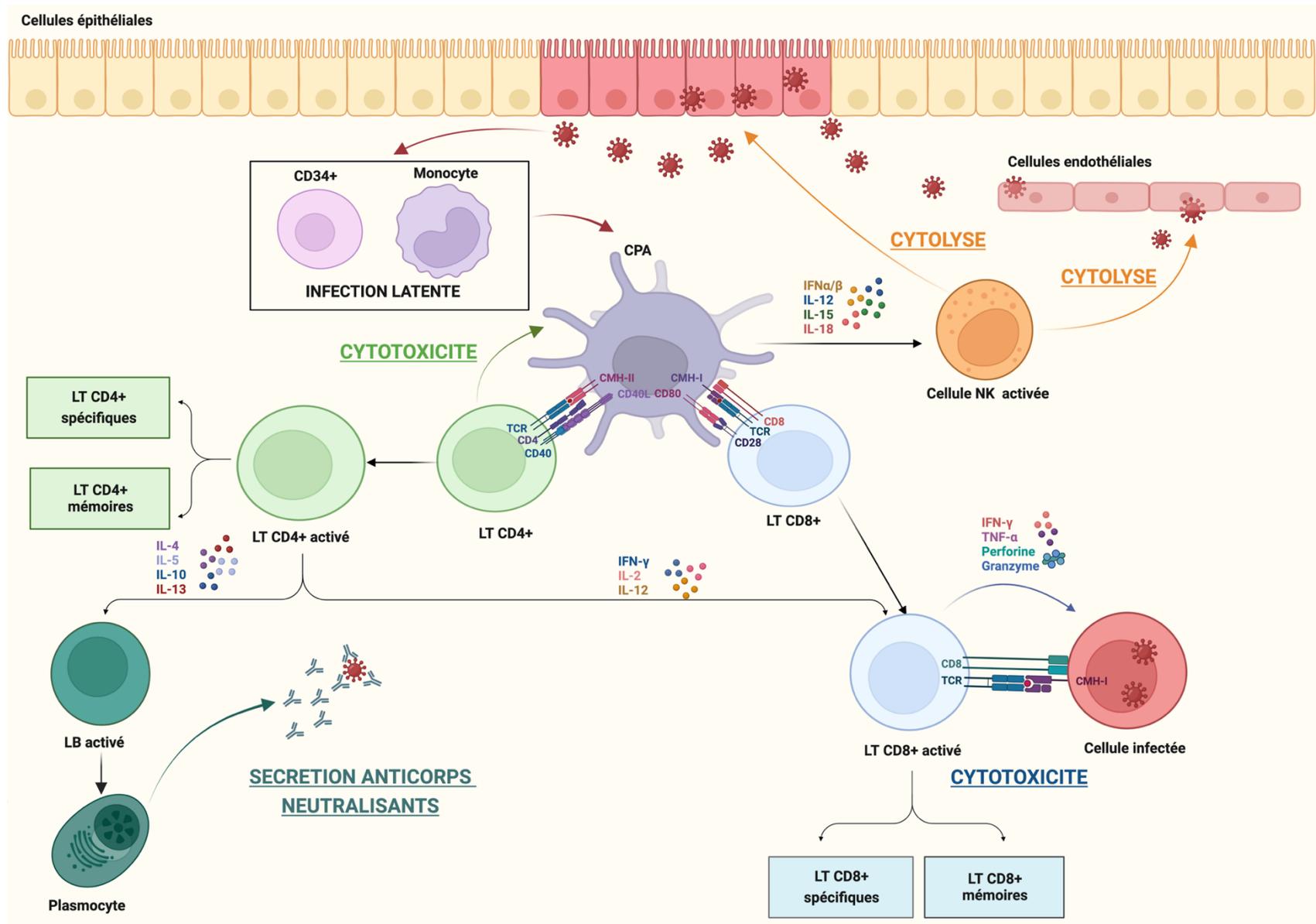


Figure 7 : Réponse immunitaire dirigée contre le CMVH.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).



L'infection primaire débute dans les cellules épithéliales des muqueuses et se dissémine vers d'autres types cellulaires. La différenciation des monocytes infectés en macrophages ou cellules dendritiques peut initier l'infection productive. Après avoir été internalisés, les peptides antigéniques sont apprêtés dans des CPA et présentés à la surface cellulaire en association à une molécule du CMH. Les CPA qui expriment des peptides antigéniques en association à une molécule de CMH-I peuvent stimuler les LT CD8+. Ces derniers exercent une action cytotoxique sur la cellule cible par sécrétion de médiateurs cytotoxiques tels que la perforine et le granzyme B. Les CPA qui expriment des peptides antigéniques en association à une molécule de CMH-II peuvent induire l'activation et la différenciation des LT CD4+. Les LT CD4+ activés produisent des cytokines qui induisent la réponse cytotoxique CD8+ ou la synthèse d'anticorps neutralisants par activation des LB. Par ailleurs, les LT CD4+ peuvent exercer une action cytotoxique sur les cellules exprimant des épitopes du CMVH associés à des molécules du CMH-II. Les cellules NK activées exercent une action cytotoxique sur les cellules infectées qui présentent une expression altérée des molécules du CMH-I.

IV.2.4. Echappement du CMVH au système immunitaire

Le CMVH a co-évolué pendant des milliers d'années avec son hôte et a développé de nombreux mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire. Le virus est capable de mettre à profit 10 à 20% de son génome en vue de cette évasion immunitaire.

L'infection par le CMVH induit une augmentation du nombre de LT CD8+, une inversion du rapport T CD4+/CD8+ et une diminution de la réponse proliférative aux antigènes et mitogènes des LT CD8+ (3). L'expression des molécules du CMH-I et -II est diminuée dans les cellules infectées. Les protéines codées par les gènes US2, US3, US6 et US10 et US11 entraînent la rétention et la dégradation des molécules du CMH-I dans la cellule, ainsi qu'une inhibition du transport des peptides viraux (1,3,43–47). Le CMVH réduit l'induction par l'IFN- γ de la synthèse des molécules CMH-II. De plus, l'IFN- α , produit en réponse à l'infection, inhibe l'expression des molécules CMH-II par l'IFN- γ (13). L'homologue viral de l'IL-10 cellulaire, pUL111a (48), diminue l'expression des molécules du CMH-I et -II (3). Le défaut d'expression des molécules CMH-I devrait rendre les cellules infectées plus vulnérables à lyse médiée par les cellules NK. Cependant, le CMVH met en place diverses stratégies pour y échapper. La protéine virale pUL40 se lie à la molécule de classe I HLA-E et régule positivement son expression à la surface cellulaire. L'interaction entre le HLA-E et le récepteur NKG2A/CD94 des cellules NK aboutit à l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK. Le gène *UL18* du CMVH code une glycoprotéine homologue des molécules du CMH-I, qui se lie à un récepteur des cellules NK et protège les cellules infectées de leur cytotoxicité (49). Par ailleurs, la glycoprotéine membranaire virale pUL16 est capable de bloquer le récepteur d'activation NKG2D des cellules NK, en masquant les récepteurs MIC (*MHC class I related*) (3). Enfin, le virus est capable d'interférer avec des chimiokines procytotoxiques. Le récepteur de chimiokines gpUL28 capte et séquestre les chimiokines RANTES (ou CCL5, *chemokine ligand 5*), MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) et MIP (*macrophage inflammatory protein*), qui normalement attireraient les cellules NK et les LT CD8+ (3). La sécrétion d'IL-8 dans les cellules permet le recrutement des polynucléaires neutrophiles circulants qui interviennent dans la dissémination virale.



V. MANIFESTATIONS CLINIQUES DE L'INFECTION A CMVH

Les conséquences cliniques de l'infection par le CMVH varient considérablement selon le statut immunitaire de l'individu concerné. Souvent asymptomatique chez le sujet immunocompétent, l'infection peut conduire à des complications sévères en cas de transmission materno-fœtale ou chez les patients immunodéprimés (3).

V.1. Infection de l'individu immunocompétent

L'infection est asymptomatique dans 90% des cas (3). Lorsqu'elles existent, les manifestations cliniques sont essentiellement observées à l'occasion d'une primo-infection. L'incubation est de 3 à 8 semaines. La forme typique consiste en une fièvre en plateau, parfois élevée, mais bien tolérée (3 semaines) et associée à des céphalées et des myalgies diffuses. Une splénomégalie est palpée dans 15 à 25% des cas, une hépatomégalie beaucoup plus rarement, exceptionnellement des ganglions infra-centimétriques. Le syndrome mononucléosique, caractérisé par une hyperlymphocytose supérieure à 50% avec 10 à 15% de grands lymphocytes hyperbasophiles, est presque constant. Une thrombopénie modérée est fréquente. L'atteinte biologique hépatique est présente dans plus de 90% des formes symptomatiques avec une élévation modérée des transaminases sériques. Des anomalies immunologiques non spécifiques (titre élevé de facteur rhumatoïde, hypergammaglobulinémie polyclonale, présence d'anticorps antinucléaires) sont souvent retrouvées. Les complications sont rares (colites, hépatites aiguës, méningo-encéphalites, polyradiculonévrite de Guillain-Barré, pneumopathies, myocardites, rétinites) (13).

V.2. Infection materno-fœtale

L'infection à CMVH est la cause la plus fréquente d'infection virale congénitale dans le monde, avec une prévalence de 0,3 à 1% (50). Elle est acquise *in utero* au cours d'une virémie maternelle, lors d'une infection primaire ou secondaire (réactivation ou réinfection). Le risque de transmission fœtale est bien plus élevé en cas de primo-infection maternelle (30% à 40%) mais n'est pas négligeable au cours des infections secondaires (1 à 2%) (Figure 8). Bien que le



risque de passage transplacentaire augmente avec le terme de la grossesse (30 à 40% au premier trimestre, 50% au deuxième trimestre, 70 à 80% au troisième trimestre), les infections fœtales du premier trimestre sont les plus sévères (51). Ainsi, le risque de conséquences cliniques délétères pour le fœtus est maximal lorsqu'une primo-infection maternelle survient avant la 20^{ème} SA (51).

A la naissance, l'infection est symptomatique dans 10 à 15% des cas (52). Environ la moitié des nouveau-nés symptomatiques présentent une atteinte disséminée sévère nommée maladie des inclusions cytomégaliqes (MIC) (52). Les anomalies cliniques les plus souvent observées sont alors : un retard de croissance intra-utérin, une hépatosplénomégalie, un ictère, des pétéchies, une chorioretinite et des signes neurologiques (microcéphalie, hypotonie, léthargie, convulsions). Cette forme grave est associée à une mortalité de 20 à 30% et à des séquelles neurologiques majeures chez 90% des enfants survivants (retards mentaux et/ou déficit auditif ou visuel) (52). Dans les autres cas, les atteintes sont plus limitées et responsables de séquelles neurosensorielles dans 30% des cas (53). Parmi les nouveau-nés présentant des formes asymptomatiques à la naissance, 10 à 15% développent malgré tout des séquelles à type de perte auditive neurosensorielle, retard de développement psychomoteur et altération visuelle (52,54–57). Ainsi, la majorité des infections asymptomatiques *in utero* n'auront pas de conséquence sur le développement ultérieur de l'enfant (53).

En dehors de la contamination *in utero* à l'origine d'atteintes cliniques potentiellement sévères, l'infection à CMVH peut être contractée pendant l'accouchement lors de l'exposition à des sécrétions génitales contaminées, ou en *post-partum* lors de l'allaitement ou par contacts rapprochés (52,55,58). Cette infection périnatale, très fréquente, est généralement sans traduction clinique et n'est pas suivie de séquelles neurologiques (54).

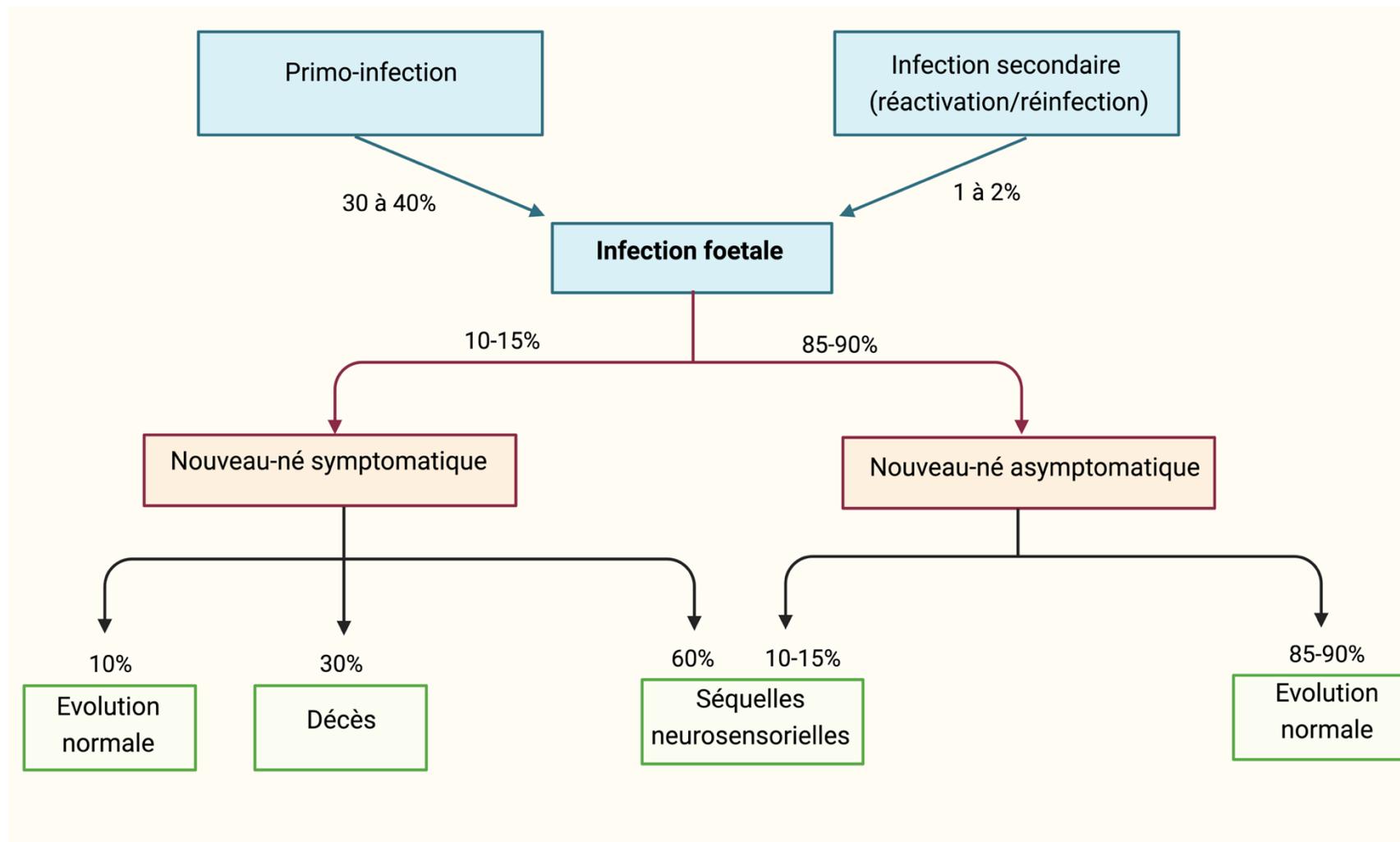


Figure 8 : Physiopathologie de la transmission materno-foetale du CMVH.



V.3. Infection de l'individu immunodéprimé

Le CMVH représente une des principales étiologies infectieuses chez les sujets immunodéprimés, en particulier chez les sujets infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au stade SIDA, les patients transplantés d'organe solide ou les receveurs de cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'altération de la réponse lymphocytaire T au cours d'une immunodépression prolongée favorise, d'une part, la réactivation du virus endogène latent chez les sujets préalablement infectés par le CMVH et, d'autre part, l'infection primaire chez les patients séronégatifs. L'infection à CMVH est définie par la détection d'une réplication virale par un test diagnostique direct positif (PCR, isolement en culture cellulaire ou détection antigénique) quel que soit le prélèvement, sans autre manifestation (3,59). La maladie à CMVH correspond à la détection du virus dans le compartiment sanguin en présence d'un syndrome clinique infectieux isolée (syndrome CMVH) ou d'une atteinte viscérale (maladie invasive à CMVH). Le syndrome CMVH est caractérisé par au moins deux critères parmi les suivants : fièvre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ pendant au moins deux jours, asthénie ou altération de l'état général, leucopénie ou neutropénie estimée à 24 heures d'intervalle, $\geq 5\%$ de lymphocytes atypiques, thrombopénie, élévation des transaminases ≥ 2 fois la normale (sauf chez l'individu greffé hépatique) (60). La maladie invasive à CMVH est définie, quant à elle, par une infection d'un ou plusieurs organes (signes cliniques + diagnostic virologique orienté). La distinction entre maladie prouvée et possible a récemment été introduite par les experts. La maladie est prouvée sur une biopsie à l'aide de l'histologie, l'immunohistochimie ou l'isolement en culture cellulaire. La maladie est possible lorsque seule la PCR est positive (biopsie, LBA, LCR, urines...). Le pronostic fonctionnel et vital est en jeu dans les formes sévères.

V.3.1. Patient infecté par le VIH

Au sein de la population de patients infectés par le VIH, la séoprévalence pour le CMVH est très élevée, de l'ordre de 85% (13). Les signes cliniques de l'infection à CMVH surviennent à un stade d'immunodépression avancé, lorsque la numération des lymphocytes T CD4+ est inférieure à $100/\text{mm}^3$ et surtout à $50/\text{mm}^3$ (3). Depuis l'avènement de la trithérapie antirétrovirale en 1996, l'incidence de la maladie à CMVH a été réduite de plus de 80% (3). Ces traitements permettent une restauration du taux et la fonctionnalité des lymphocytes T



CD4+ à l'origine d'une reconstitution au moins partielle de la réponse immunitaire. Actuellement, la maladie à CMVH est principalement observée chez les personnes dépistées ou prises en charge tardivement, les patients traités par corticoïdes ou en situation d'échec thérapeutique (61,62).

Les manifestations cliniques sont variées et dépendent de l'organe atteint. La rétinite est la localisation la plus fréquente (70-80%) (13). En l'absence de traitement, elle peut aboutir à une nécrose rétinienne progressive subaiguë irréversible et conduire à une cécité. Un examen régulier du fond d'œil est indispensable chez les patients dont le nombre de lymphocytes CD4+ est inférieur à 50/mm³. Les atteintes digestives constituent 15 à 30% de l'ensemble des localisations à CMVH avec, par ordre de fréquence, la colite, l'œsophagite, la gastrite, l'anorectite et l'atteinte bilio-pancréatique (6). Les atteintes neurologiques représentent 5-10% des manifestations dues au CMVH et surviennent généralement à un stade plus tardif de l'infection à CMVH. Elles peuvent toucher le système nerveux central (encéphalite, méningo-encéphalite) ou périphérique (myélite, myéloradiculite, neuropathie multifocale) (6). Plus rarement, le CMVH peut être responsable d'atteintes hépatobiliaires, de pneumopathie interstitielle, de myocardite et de pancréatite. Des cas de microangiopathies thrombotiques et d'hémorragies intra-alvéolaires ont également été décrits au stade SIDA (6).

V.3.2. Patient receveur de greffe

Les traitements immunosuppresseurs destinés à prévenir le rejet de greffe, favorisent la réplication du CMVH à partir d'une réactivation endogène d'une souche latente, d'une infection d'origine exogène ou d'une contamination transmise par le greffon (53). En l'absence de traitement préventif, l'infection survient dans les 3 mois suivant la greffe. Les manifestations cliniques dépendent du type de greffe, du protocole immunosuppresseur et du statut sérologique CMVH du couple donneur/receveur (D/R). Outre ses effets pathogènes directs, le CMVH, par ses effets pro-inflammatoires et immunosuppresseurs, est associé à des effets indirects (Figure 9) (63,64). Ces effets sont indépendants du niveau de virémie. Ils peuvent ainsi survenir chez des patients présentant, pendant une période prolongée, une réplication virale persistante. Les conséquences indirectes se traduisent par la survenue d'infections opportunistes (bactériennes, virales, fongiques), par un risque accru de

lymphomes post-transplantation (PTLD) induits par l'EBV, par le retentissement sur la survie du greffon (rejet aigu ou chronique, dysfonction chronique du greffon), et par la contribution à la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD).

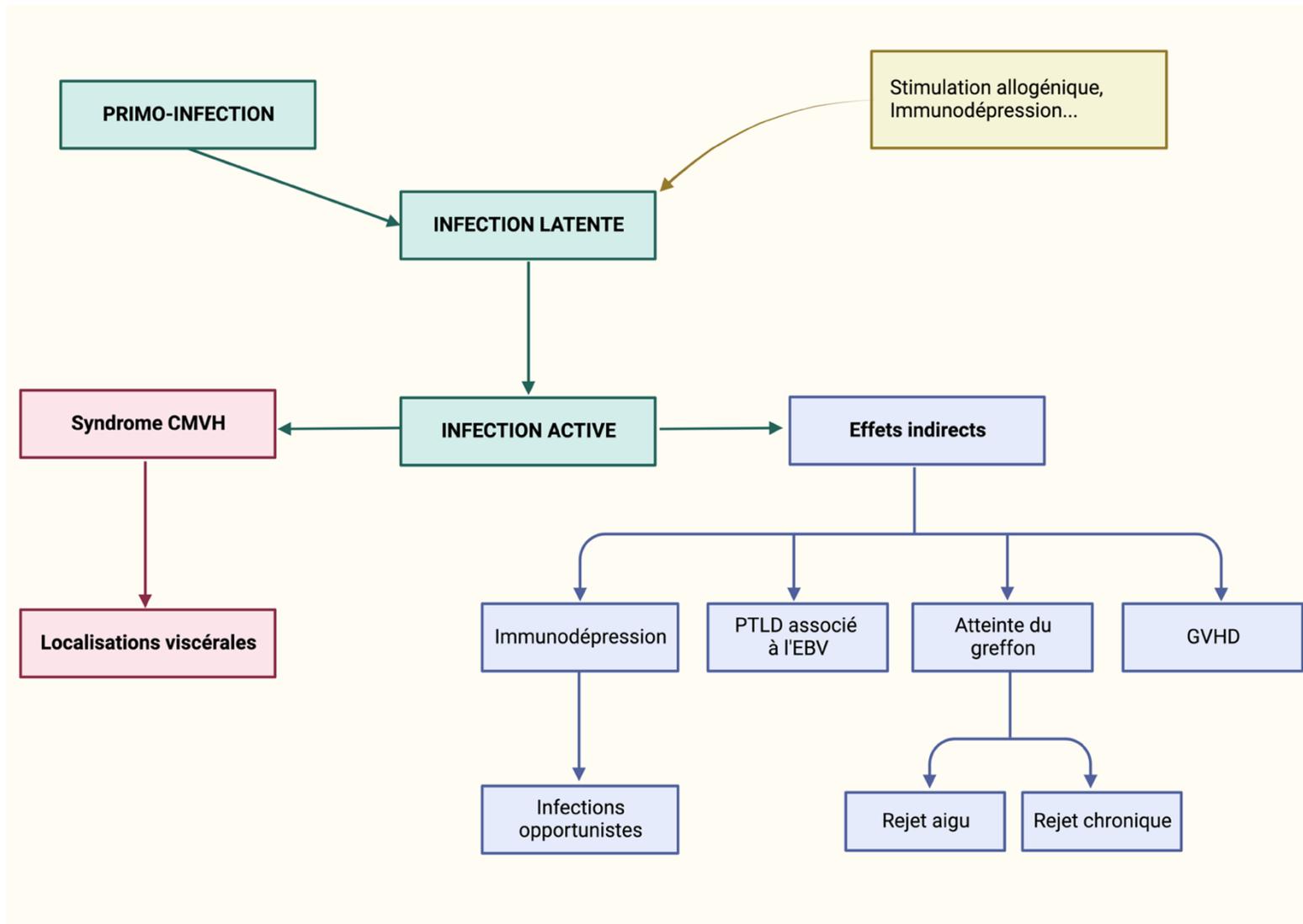


Figure 9 : Physiopathologie du CMVH en transplantation.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).



V.3.2.1. Patient transplanté d'organe solide

Le facteur de risque majeur de l'infection à CMVH est représenté par le statut sérologique du couple D/R (65). Le taux d'infection le plus élevé survient pour la combinaison D+/R- dans laquelle un receveur séronégatif pour le CMVH (R-) reçoit un organe d'un donneur séropositif (D+). Les receveurs séropositifs (R+) sont considérés comme étant à risque intermédiaire (couples D+/R+ ; D-/R+) et les patients du groupe D-/R- à risque le plus faible (65).

L'infection est symptomatique dans 67% des primo-infections (D+/R-), 40% des réinfections (D+/R+) et dans moins de 20% des cas de réactivations (R+) (3). L'incidence de la maladie à CMVH augmente avec l'intensité de l'immunodépression, et en particulier avec l'utilisation de sérum anti-lymphocytaire, la survenue d'épisodes de rejet aigu impliquant un renforcement global de l'immunosuppression, l'importance de la virémie, l'existence de co-infections par les virus HHV-6 et HHV-7 et les infections bactériennes (13). Elle serait globalement plus fréquente et sévère dans les transplantations cardiaques, pulmonaires ou multi-organes que dans les greffes hépatiques et surtout rénales (3).

La fièvre est la manifestation clinique la plus fréquente. Elle survient généralement entre le premier et le quatrième mois après la greffe. Les atteintes viscérales, témoins du caractère invasif de l'infection, touchent volontiers l'organe greffé (13). Ainsi, la pneumopathie interstitielle est une complication fréquente chez les receveurs de greffe pulmonaire. L'hépatite à CMVH se manifeste préférentiellement après une transplantation hépatique, tandis que les localisations digestives sont essentiellement observées après une transplantation intestinale. Enfin, des lésions glomérulaires sont possibles après transplantation rénale mais plus rares (3).

V.3.2.2. Patient greffé de CSH

Les patients séropositifs pour le CMVH (R+) sont les plus à risque de développer une infection, quel que soit le statut sérologique du donneur. Les autres facteurs de risque sont la GVHD, l'intensité de l'immunodépression, la greffe provenant de donneurs non apparentés ou non compatibles avec le receveur, ainsi qu'un antécédent d'infection à CMVH (59). La manifestation clinique la plus fréquente et la plus sévère est la pneumonie interstitielle



hypoxémiant. Son évolution est souvent mortelle en l'absence de traitement (3). L'inflammation, l'auto-immunité et l'immunodépression sont intriquées à la physiopathologie de cette affection.

Les autres manifestations cliniques de l'infection à CMVH sont plus rares et moins spécifiques. Elles comprennent des atteintes de type hépatite, thrombopénie ou leucopénie fébriles, colite ulcéreuse, cystite hémorragique, rétinite et des atteintes du système nerveux central. Le risque d'infection à CMVH après autogreffe de CSH est identique à celui de l'allogreffe (30 à 50%) mais la maladie à CMVH est moins fréquente (<1%) (59).

VI. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'INFECTION A CMVH

La recherche du CMVH vise à évaluer le risque d'apparition de complications liées aux pathologies à CMVH. Le diagnostic de l'infection à CMVH peut être réalisé à l'aide de techniques directes ou indirectes. Le choix des méthodes diagnostiques qui seront mises en œuvre dépend du stade et des circonstances de l'infection.

VI.1. Diagnostic direct

VI.1.1. Examen cytologique et histologique des tissus

L'examen est effectué sur des frottis, des coupes de biopsie d'organe, ou après cyto-centrifugation ou étalement sur lame de liquides biologiques (urine, salive, LCR, LBA, liquide amniotique). Les cellules infectées sont de grande taille et présentent des inclusions intracytoplasmiques et intranucléaires. L'inclusion intranucléaire peut être entourée d'un halo clair, repoussant le nucléole et réalisant l'image en « œil de hibou » (Figure 10).

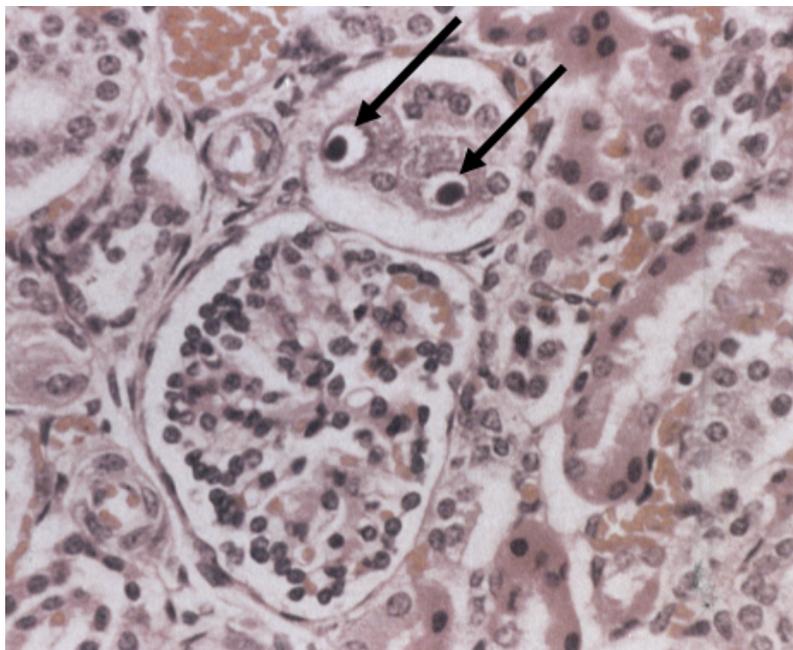


Figure 10 : Cellules infectées par le CMVH révélant de grands corps d'inclusions intranucléaires typiques en « œil de hibou » (HE, x 1920).

Section de rein prélevée lors de l'autopsie d'un nourrisson de 3 mois (infection disséminée à CMVH contractée *in utero*). Adapté de Herriot R et Gray ES, 1994 (66).

VI.1.2. Détection des antigènes viraux

L'antigénémie repose sur la détection de la protéine du tégument pp65 (pUL83) dans le noyau des polynucléaires du sang circulant. Après cytocentrifugation des leucocytes, la phosphoprotéine pp65 est mise en évidence par immunofluorescence directe à l'aide d'anticorps monoclonaux (Figure 11). Le délai entre le prélèvement et la réalisation de la technique doit être inférieur à 2 ou 3 heures pour éviter la dégradation de l'antigène. Les résultats sont exprimés en nombre de polynucléaires positifs pour 2×10^5 leucocytes examinés. Cette technique peut donc être prise en défaut chez les individus en aplasie médullaire. Par ailleurs, ce test n'est pas adapté aux grandes séries en raison de la lourdeur de sa mise en œuvre. La recherche de l'antigénémie pp65 est actuellement abandonnée au profit des techniques d'analyse plus sensibles de biologie moléculaire.

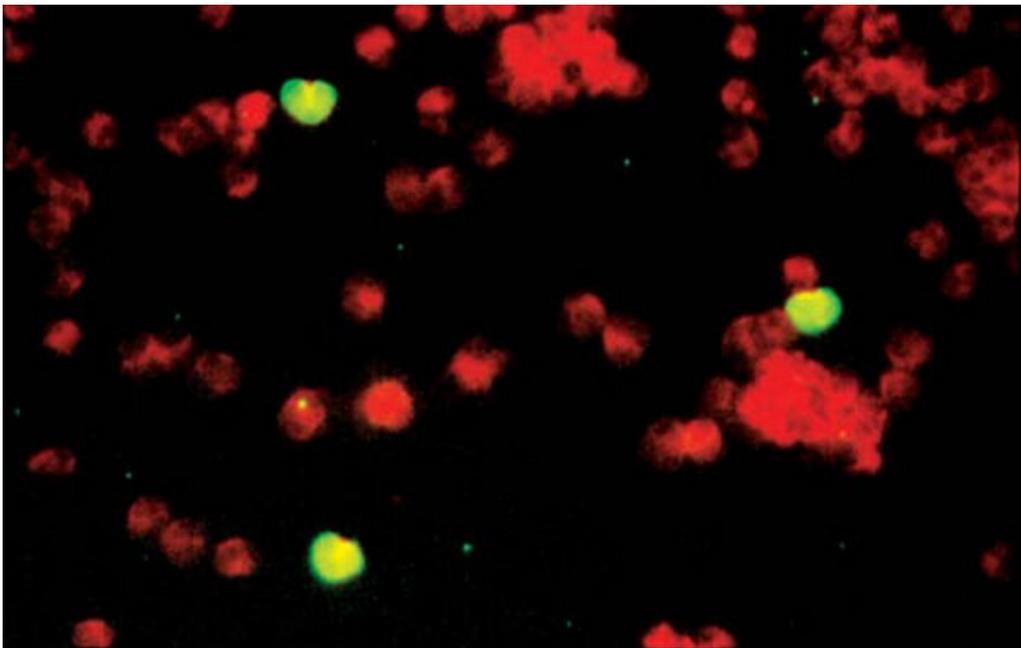


Figure 11 : Détection de l'antigène pp65 du CMVH dans les polynucléaires du sang circulant.

L'antigène pp65 (pUL83) du CMVH est identifié au niveau du noyau des polynucléaires marqués par immunofluorescence directe (Photo LIGHT DIAGNOSTICS CMVH pp65 Antigenemia IFA kit, Sigma-Aldrich).

VI.1.3. Culture cellulaire

La culture cellulaire n'est plus utilisée en routine pour le diagnostic de l'infection à CMVH en raison de son délai de réalisation, de ses contraintes techniques et de sa sensibilité inférieure aux techniques de biologie moléculaire. Elle reste néanmoins indispensable pour conserver les souches virales, les caractériser et réaliser des antivirogrammes pour l'étude des non-réponses au traitement (59).

Les cellules de choix pour la mise en culture sont les fibroblastes embryonnaires humains de poumon (cellules MRC-5) en monocouches confluentes d'au moins 48 h. Ces cellules permettent au CMVH d'effectuer un cycle de réplication complet et une production de virions à titre élevé. La présence du virus se traduit par l'apparition d'un effet cytopathique (ECP) caractéristique, classiquement décrit à foyers en « *banc de poissons* ». Cet ECP, observé en microscopie inversée, est constitué de foyers ovalaires de cellules augmentées de volume et réfringentes dont la croissance suit le grand axe des fibroblastes (Figure 12). Le délai nécessaire à l'observation des premiers foyers d'ECP est de 8 à 20 jours mais peut s'étendre jusqu'à six semaines.

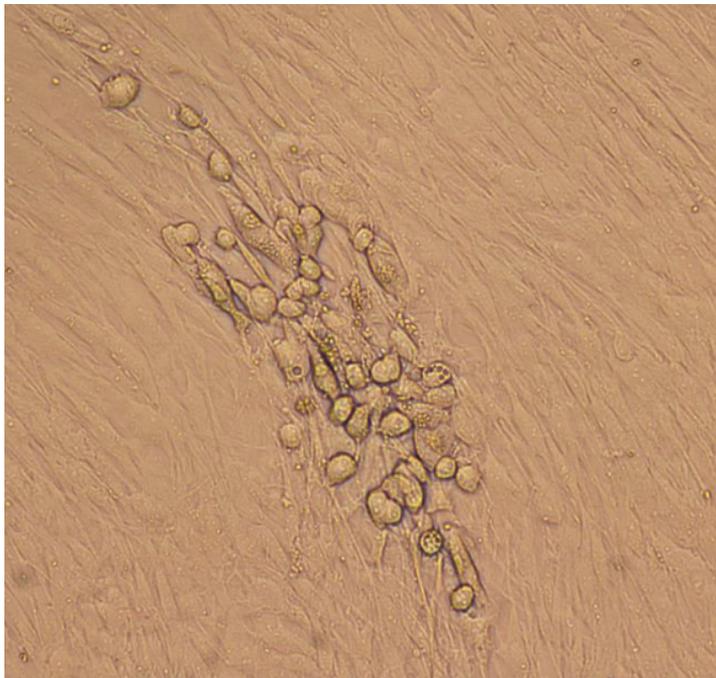


Figure 12 : Isolement du CMVH en culture cellulaire.

L'ECP du CMVH, avec un aspect caractéristique en « *banc de poissons* », est constitué de grandes cellules réfringentes groupées en foyers. (Photo Pr Sébastien Hantz, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges).

La culture rapide associe une centrifugation de l'inoculum sur les fibroblastes, et la détection par immunocytochimie, après 24 à 46 heures d'incubation, des antigènes très précoces synthétisés au cours du premier cycle de réplication virale. Cette technique, plus sensible que l'isolement classique, avec un délai de réponse réduit, est compatible avec une prise en charge thérapeutique des patients. Toutefois, elle ne permet pas l'isolement de la souche et sa mise en œuvre reste assez lourde (13).

VI.1.4. Détection des acides nucléiques viraux par biologie moléculaire

La détection qualitative ou quantitative des acides nucléiques viraux (ADN ou ARN) est communément réalisée grâce à des techniques d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les techniques de PCR en temps réel ont supplanté les techniques de PCR en point final car elles sont plus sensibles, plus précises, plus reproductibles et adaptées aux grandes séries. Le risque de faux positifs par contamination est également réduit. La PCR quantitative (qPCR) en temps réel est l'outil majeur recommandé pour le diagnostic et le suivi des patients. Elle permet la mise en évidence d'une infection active (primo-infection ou infection secondaire). Cette PCR peut être réalisée à partir de sang total, de plasma, de sérum ainsi que sur tout liquide biologique de l'organisme (urines, liquide cébrospinal, liquide amniotique, tissus fœtaux...) selon les circonstances cliniques.

De nombreuses PCR en temps réel « maisons » et troussees commerciales existent et font appel à des technologies variées. La technologie TaqMan est probablement la plus utilisée pour la quantification des génomes viraux. Son principe est résumé sur la figure 13. Une sonde spécifique de la séquence d'ADN à amplifier est marquée en 5' par un fluorophore rapporteur et en 3' par un fluorophore *quencher*. Les amorces et la sonde s'hybrident à l'ADN cible dénaturé. La proximité du *quencher* inhibe la fluorescence émise par le rapporteur. Pendant la phase d'élongation de la PCR, l'activité 5'-3' exonucléasique de la *Taq* polymérase hydrolyse l'extrémité 5' de la sonde. Le rapporteur est ainsi libéré de l'effet *quenching*, ce qui permet de lever l'inhibition de l'émission de fluorescence. L'intensité de fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons d'ADN générés durant la réaction de PCR. La valeur du cycle seuil (Ct, *Cycle Threshold*) correspond au cycle d'amplification à partir duquel la quantité de virus présent dans l'échantillon est détectée. Cette valeur est

inversement proportionnelle à la charge virale. Le résultat est exprimé en nombre de copies de génome viral par rapport à une gamme étalon externe.

La diversité des techniques de PCR mises en œuvre dans les laboratoires, ainsi que des compartiments sanguins analysés, rend la comparaison des résultats quantitatifs entre laboratoires délicate. Pour permettre une standardisation des résultats, le NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*) met à disposition depuis 2010 un standard international OMS pour le CMVH permettant l'expression des résultats en unités internationales (UI) plutôt qu'en copies/ml (3). Il reste toutefois recommandé de réaliser le suivi virologique d'un patient dans un même laboratoire, avec une même technique diagnostique et à partir d'une même matrice biologique. Le seuil de détection des techniques varie entre 150 et 1000 UI/ml. Une charge virale supérieure à 1000 UI/ml est retrouvée lors d'une infection active après transplantation (53).

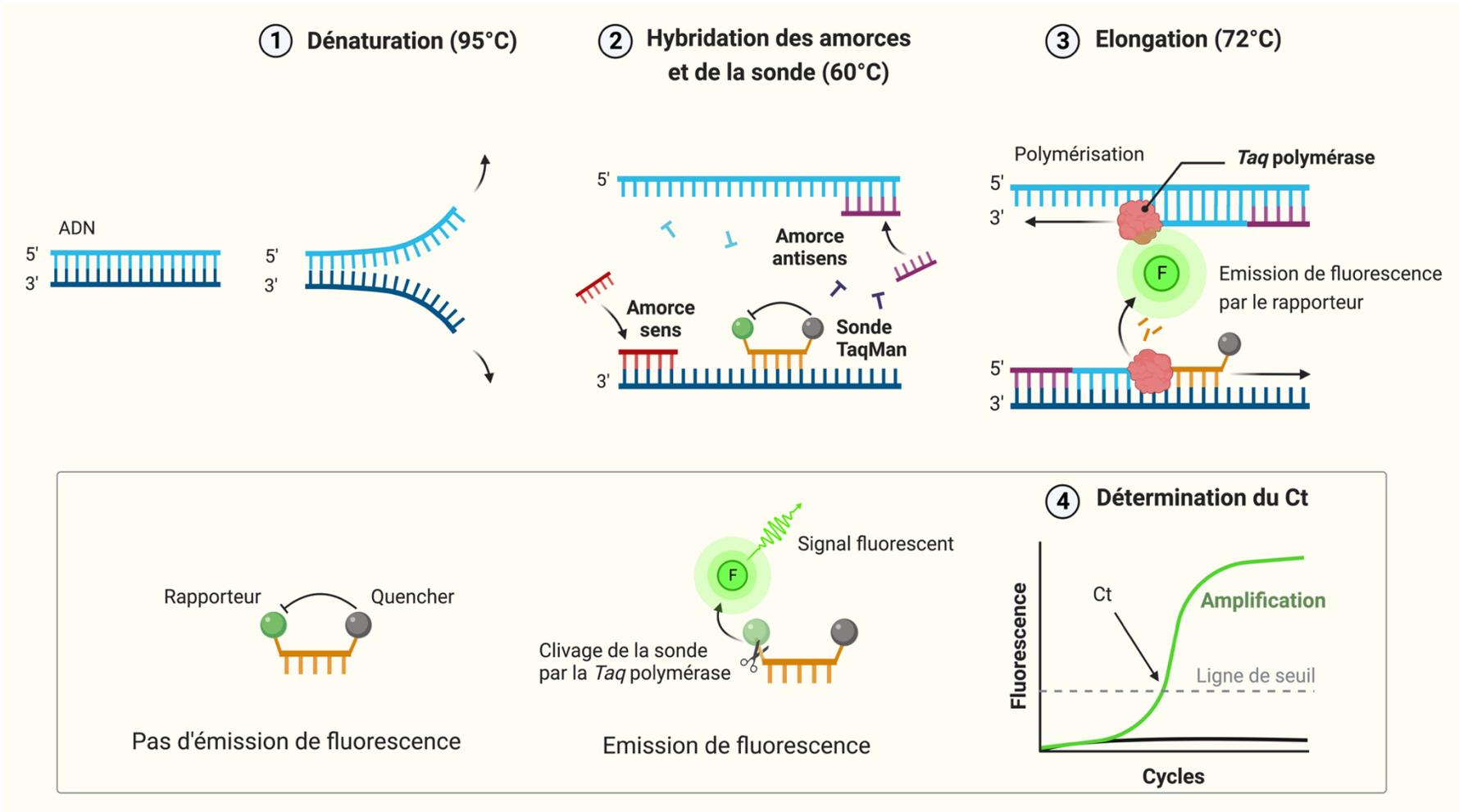


Figure 13 : Principe de la technologie TaqMan.

La sonde TaqMan est marquée à son extrémité 5' par une molécule fluorescente (rapporteur) et munie en 3' d'un *quencher* qui empêche l'émission de fluorescence. Après dénaturation de l'ADN (1), les amorces et la sonde TaqMan s'hybrident de façon spécifique à l'ADN cible (2). La polymérisation par la *Taq* polymérase à partir des amorces de PCR déplace la sonde TaqMan qui est clivée par l'activité exonucléasique 5'-3' de la *Taq* polymérase. Le fluorophore rapporteur, séparé du *quencher*, émet un signal fluorescent (3). L'émission de fluorescence est proportionnelle à l'amplification de l'ADN cible. La valeur du cycle seuil (Ct) correspond au nombre de cycles à partir duquel la fluorescence est détectable (4).

(Adapté de "Fluorescent Probe-Based Real Time PCR", [BioRender.com](https://www.biorender.com)).



VI.2. Diagnostic indirect

VI.2.1. Techniques sérologiques

L'infection à CMVH induit la production d'anticorps de type IgM suivie par une production d'anticorps de type IgG. Les techniques sérologiques actuellement utilisées dans les laboratoires sont de type immuno-enzymatiques. Les tests ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) ou EIA (*Enzyme ImmunoAssay*) permettent soit la détection des anticorps totaux, soit des anticorps de type IgM ou IgG séparément. La recherche d'IgA, d'IgE et d'IgD n'est pas de pratique courante. De nombreuses trousse sont commercialisées avec des performances variables et une réalisation généralement automatisée. Pour la détection des IgM, les techniques d'immunocapture sont à privilégier pour limiter le risque de réactivités non spécifiques liées à la présence de facteur rhumatoïde. Comme source protéique antigénique, les trousse utilisent soit des lysats de cellules infectées, lysats peu précisément définis sur le plan antigénique et pouvant comporter des protéines ayant des homologies avec les antigènes des autres herpèsvirus, soit des protéines recombinantes ou des peptides synthétiques correspondant aux déterminants antigéniques essentiels de la réponse humorale. Du fait de la diversité des préparations antigéniques, des discordances sont observées entre les résultats des différents kits pour les valeurs proches du seuil de positivité (13).

La mise en évidence d'une séroconversion signe la primo-infection. Néanmoins, en l'absence d'un sérum précoce négatif, la présence des anticorps de type IgM ne permet pas d'affirmer avec certitude le diagnostic de primo-infection. En effet, les IgM peuvent persister plusieurs mois après la primo-infection et une réapparition des IgM avec une ascension du taux des IgG est habituellement observée au cours des réactivations et des réinfections. Par ailleurs, des IgM peuvent également être détectées à l'occasion d'une stimulation polyclonale du système immunitaire ou lors d'une primo-infection avec un autre virus (virus Epstein-Barr, Parvovirus B19), par réactivité croisée.

Dans le cadre de la transplantation, la recherche des IgG anti-CMVH avant la greffe permet de déterminer le statut immunitaire du donneur et du receveur vis-à-vis du CMVH. L'interprétation des sérologies en pré-greffe après administration d'immunoglobulines ou transfusion d'autres produits sanguins doit être particulièrement critique. Par ailleurs, le



sérodiagnostic n'est pas adapté au suivi du patient transplanté en raison d'une réponse humorale souvent retardée.

VI.2.2. Test de mesure d'avidité des IgG anti-CMVH

Réalisée lorsque des IgM anti-CMVH sont détectées, la mesure de l'indice d'avidité des IgG anti-CMVH peut aider à distinguer une primo-infection récente d'une infection secondaire ou ancienne. Son principe repose sur la mesure de l'effet d'un agent dénaturant (exemple : urée à concentration élevée) sur la liaison antigène-anticorps, par une technique de dosage des IgG spécifiques de type ELISA (Figure 14). Une faible avidité est révélatrice de la faible affinité fonctionnelle des IgG récemment produites. Ainsi, après le début de l'infection primaire, les anticorps ont une faible avidité pour l'antigène et acquièrent progressivement une avidité supérieure. Les niveaux d'avidité sont rapportés comme des indices d'avidité, exprimant le pourcentage d'IgG lié à l'antigène (52) :

$$\text{Indice d'avidité (\%)} = (\text{Densité optique (DO) en présence d'agent dénaturant} / \text{DO sans agent dénaturant}) \times 100$$

Le test d'avidité des IgG est particulièrement utile pour dater une primo-infection de plus ou moins 3 mois au cours du premier trimestre de grossesse (52,56). Un faible indice d'avidité mesuré au premier trimestre de grossesse est en faveur d'une phase aiguë de primo-infection maternelle survenue en période péri- ou post-conceptionnelle. Par conséquent, le risque de transmission de l'infection maternelle au fœtus est élevé (56). A l'inverse, la mesure d'un indice de forte avidité au premier trimestre de grossesse correspond *a priori* à une phase aiguë virémique de la primo-infection maternelle antérieure au début de grossesse et ainsi, à un risque faible de transmission materno-fœtale de l'infection à CMVH. Si l'indice d'avidité est intermédiaire, la primo-infection récente (< 3 mois) ne peut être exclue. Malgré la mise sur le marché de trousse commerciales destinées à la mesure de cet indice, l'interprétation des résultats en termes de datation de l'infection maternelle n'est pas toujours aisée. En effet, le résultat de l'avidité est à interpréter en fonction du terme de la grossesse et des techniques utilisées (56). Il est donc souhaitable que l'avidité soit réalisée par un laboratoire expérimenté.

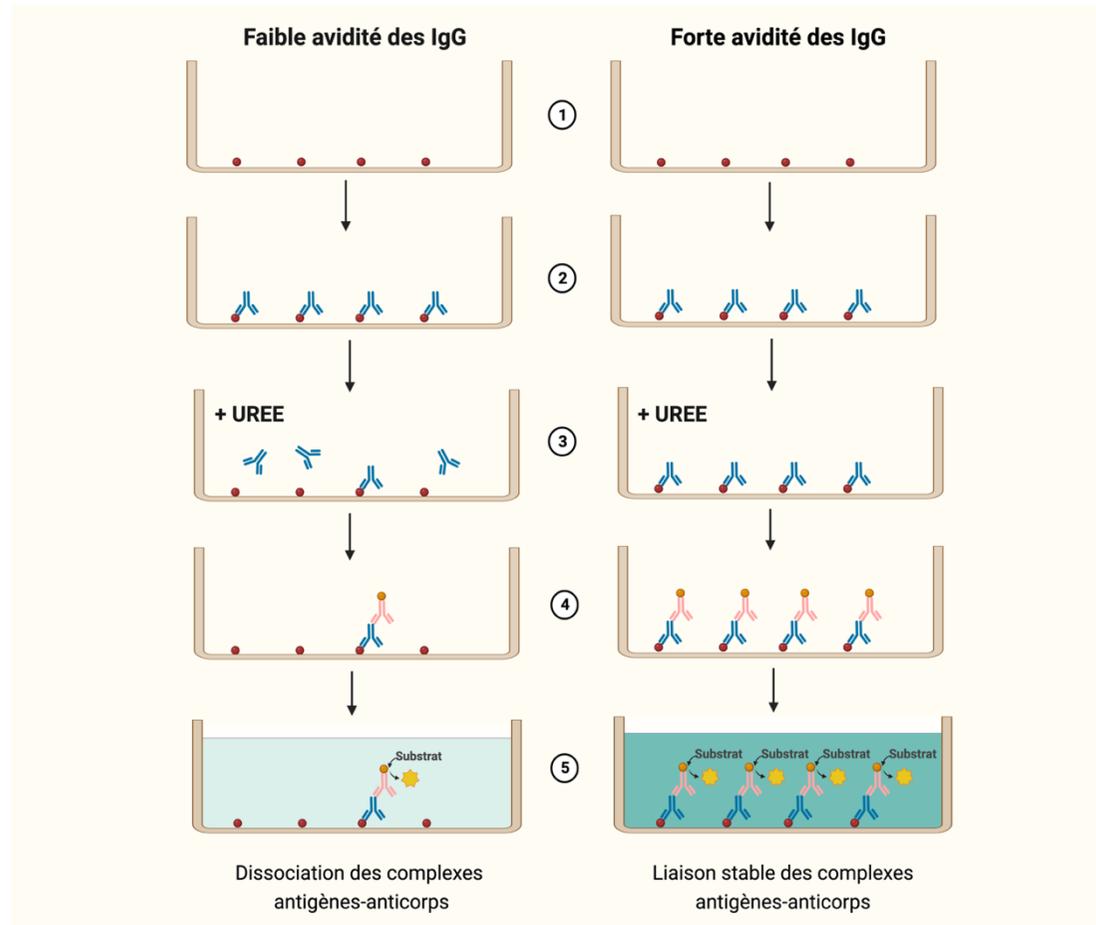


Figure 14 : Principe du test d'avidité.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

Le puits est coaté avec un antigène de CMVH (1). Le sérum du patient est déposé dans le puits : les IgG anti-CMVH présentes dans l'échantillon se lient à l'antigène de CMVH (2). La solution dénaturante (urée) est ajoutée : seuls les anticorps de forte avidité restent fixés (3). Après lavage, le conjugué est déposé dans le puits : l'anticorps marqué vient se lier aux IgG sériques ayant réagi avec l'antigène de CMVH (4). Après lavage, la présence des complexes immuns (antigène CMVH/IgG sérique anti-CMVH/conjugué anti-IgG) est révélée par une solution enzymatique. La densité optique est proportionnelle à la quantité d'IgG anti-CMVH présente dans le puits (5). L'indice d'avidité est calculé par le rapport des densités optiques mesurées avec et sans solution dénaturante.



VII. TRAITEMENTS DE L'INFECTION A CMVH

Les molécules antivirales permettant de prévenir et traiter l'infection à CMVH sont virostatiques et ciblent essentiellement la polymérase virale pUL54. De nouvelles molécules dirigées contre d'autres protéines virales sont disponibles dans un cadre d'utilisation bien précis ou en cours d'essais cliniques.

VII.1. Inhibiteurs de la polymérase virale pUL54

VII.1.1. Ganciclovir (GCV) et Valganciclovir (Val-GCV)

Le GCV ou 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)méthyl] guanine, analogue acyclique de la désoxyguanosine, est le traitement de référence de l'infection à CMVH. Le GCV est actif sous forme triphosphate (Figure 15). La primo-phosphorylation est réalisée par la sérine/thréonine kinase virale pUL97, uniquement exprimée dans les cellules infectées par le CMVH. Le GCV monophosphate est ensuite di- puis triphosphorylé par des kinases cellulaires. Le GCV triphosphate agit au niveau du site catalytique de l'ADN polymérase par compétition avec la désoxyguanosine et inhibe ainsi l'élongation de la molécule d'ADN en cours de synthèse. *In vitro*, sa concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) est comprise entre 2,5 et 8 µM sur les souches sensibles. Le GCV peut être administré par voie orale, intraveineuse ou intravitréenne. La biodisponibilité du GCV n'excède pas 10% par voie orale.

Le Val-GCV est un L-valyl ester (prodrogue) du GCV. Après administration orale, il est rapidement métabolisé en GCV par des estérases intestinales et hépatiques (Figure 15). Sa biodisponibilité, de l'ordre de 60%, permet d'atteindre des concentrations plasmatiques similaires à celles du GCV intraveineux. Comme le GCV, le Val-GCV est prescrit chez le sujet transplanté et indiqué dans le traitement de la rétinite à CMVH chez le patient atteint du SIDA. Ces deux molécules ont également démontré leur efficacité chez le nouveau-né dans le traitement des infections congénitales à CMVH. Elles permettent de réduire les atteintes neurologiques et d'éviter une détérioration auditive (67). Malgré leur efficacité, les effets indésirables qu'elles induisent ne sont pas négligeables. La principale toxicité est hématologique, avec notamment une neutropénie et/ou thrombocytopenie. Plus rarement, ces molécules peuvent présenter une toxicité neurologique (ataxie, coma, crises convulsives)



ou rénale (hématurie, hypercréatininémie). Elles sont de ce fait contre-indiquées chez la femme enceinte. Des résistances peuvent émerger par apparition de mutation(s) sur les gènes codant la kinase pUL97 ou la polymérase pUL54, et conduire parfois à une résistance croisée avec le foscarnet et/ou le cidofovir. En dépit de leur toxicité et de l'émergence de résistances, le GCV reste la molécule de choix dans le traitement de l'infection à CMVH.

VII.1.2. Cidofovir (CFV)

Le CDV ou (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylméthoxy)propyl] cytosine est un analogue de la désoxycytidine monophosphate. Ainsi, contrairement au GCV, le CDV doit subir seulement deux étapes de phosphorylations pour exercer son activité d'inhibition compétitive de l'ADN polymérase virale (Figure 15). Sa phosphorylation n'implique que des kinases cellulaires et ne nécessite pas l'intervention de la kinase pUL97. Il s'agit d'un puissant antiviral ; sa CI_{50} se situe entre 0,5 et 1 μ M sur les souches sensibles. Depuis 2014, le CDV a été retiré du marché en raison de difficultés de fabrication et devant l'existence d'alternatives thérapeutiques. Il était principalement indiqué dans le traitement des rétinites à CMVH chez le patient au stade SIDA. Actuellement, il fait l'objet d'une autorisation temporaire d'utilisation nominative (ATUn). Il est exclusivement administré par voie intraveineuse et possède une longue demi-vie. Son principal effet indésirable est une néphrotoxicité tubulaire proximale (protéinurie, glycosurie, insuffisance rénale). La survenue de mutations dans le gène codant la polymérase pUL54 peut induire une résistance au CDV.

VII.1.3. Foscarnet (FOS)

Le FOS ou trisodium phosphonoformate, est un analogue de pyrophosphate inorganique. Il ne nécessite pas de phosphorylation pour exercer ses propriétés antivirales (Figure 15). Il s'agit d'un inhibiteur compétitif sélectif et réversible de l'ADN polymérase pUL54. Après sa fixation au niveau du site catalytique de pUL54, le FOS bloque le clivage des désoxyribonucléotides triphosphates en désoxyribonucléotides diphosphates et pyrophosphate inorganique (68). La CI_{50} du FOS sur les souches sensibles est très variable, de 50 à 400 μ M. Cette molécule est recommandée en deuxième intention en cas de résistance

au GCV ou lorsque son administration est impossible du fait notamment de son hématotoxicité. Son activité est synergique avec celle du GCV, ce qui permet de les utiliser en association. En raison de sa faible biodisponibilité, le FOS est exclusivement administré par voie intraveineuse. Les principaux effets indésirables touchent la fonction rénale (néphrotoxicité tubulaire, perturbations électrolytiques). Des mutations induisant une résistance au FOS peuvent apparaître sur le gène codant la polymérase virale pUL54.

VII.1.4. Aciclovir (ACV) et Valaciclovir (Val-ACV)

L'ACV ou 9-[(2-hydroxyéthoxy)méthyl]guanine est un analogue de la désoxyguanosine, Il a une structure très proche de celle du GCV. Comme lui, il est actif après sa métabolisation en dérivé triphosphate, la primo-phosphorylation étant assurée par pUL97, et la di- et tri-phosphorylation par des kinases cellulaires. L'ACV triphosphate est un inhibiteur compétitif sélectif et irréversible de pUL54. Il stoppe l'élongation de la chaîne d'ADN viral en bloquant définitivement le site catalytique de pUL54, auquel il se fixe. La biodisponibilité de l'ACV est limitée (15 à 30%). Sa prodrogue, le Val-ACV, est constituée d'une molécule d'ACV estérifiée par la L-valine et présente une biodisponibilité d'environ 50%. Le Val-ACV est indiqué dans la prophylaxie des infections et maladies à CMV chez les patients transplantés d'organes ainsi que dans la prévention de l'infection congénitale à CMV lors de primo-infection au cours du premier trimestre de grossesse. Il est généralement bien toléré. Les mutations de résistance sont principalement retrouvées dans le gène codant la kinase pUL97.

VII.2. Nouvelles molécules

VII.2.1. Letermovir (LTV)

Le LTV (AIC246) est le premier représentant de la classe des quinazolines. Il s'agit d'un puissant antiviral dont l'activité *in vitro* surpasse de 400 fois celle du GCV (69). Il cible une étape exclusivement virale, l'encapsidation du génome du CMV, en interagissant avec les protéines du complexe terminase (Figure 15). Ce complexe, hautement spécifique du CMV, n'a pas d'homologue dans les cellules de mammifères. Bien que le mécanisme d'action du LTV ne soit pas encore élucidé, l'émergence de mutations de résistance sous traitement suggère

une interaction étroite avec pUL56 et à moindre mesure avec pUL89 et pUL51 (68–70). Le LTV est pleinement actif sur les souches virales porteuses de substitutions qui confèrent une résistance au GCV, CDV et FOS (71). Lors des essais de phase II, le LTV a permis de prévenir efficacement l'infection par le CMVH chez les receveurs de greffes allogéniques de CSH, avec un très bon profil de tolérance. Les essais de phase III débutés en 2014 (par Merck Sharpe et Dohme Corps) se sont achevés fin 2016 et ont montré que la prophylaxie par le LTV entraînait un risque significativement plus faible d'infection à CMVH que le placebo (72). Depuis 2018, le LTV a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) pour une utilisation en prophylaxie de l'infection à CMVH chez les adultes séropositifs au CMVH receveurs d'une greffe allogénique de CSH (R+).

VII.2.2. Maribavir (MBV)

Le MBV est un dérivé benzimidazolé-L-ribonucléoside. Il s'agit d'un inhibiteur de la protéine kinase pUL97 du CMVH, impliquée notamment dans la réplication du génome viral et l'exportation extranucléaire des capsides (Figure 15). Cet inhibiteur compétitif de l'ATP abolit l'activité de pUL97 en se fixant sur le site de liaison de l'ATP. Il ne doit pas être associé au GCV étant donné que l'activité de ce dernier est dépendante d'une primo-phosphorylation réalisée par pUL97. Le MBV ne présente pas de résistance croisée avec le CDV et/ou le FOS (73). Il est administré par voie orale et sa biodisponibilité est de 30 à 40%. Sa CI_{50} est inférieure à celle du GCV. Le principal effet indésirable du MBV est une dysgueusie (74). En novembre 2021, le MBV a été approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour le traitement d'une infection ou d'une maladie à CMVH post-transplantation, chez les patients qui ne répondent pas aux thérapies antivirales conventionnelles (75). En France, cette molécule est uniquement disponible en ATUn chez les patients présentant une résistance aux antipolymérase (68,76).

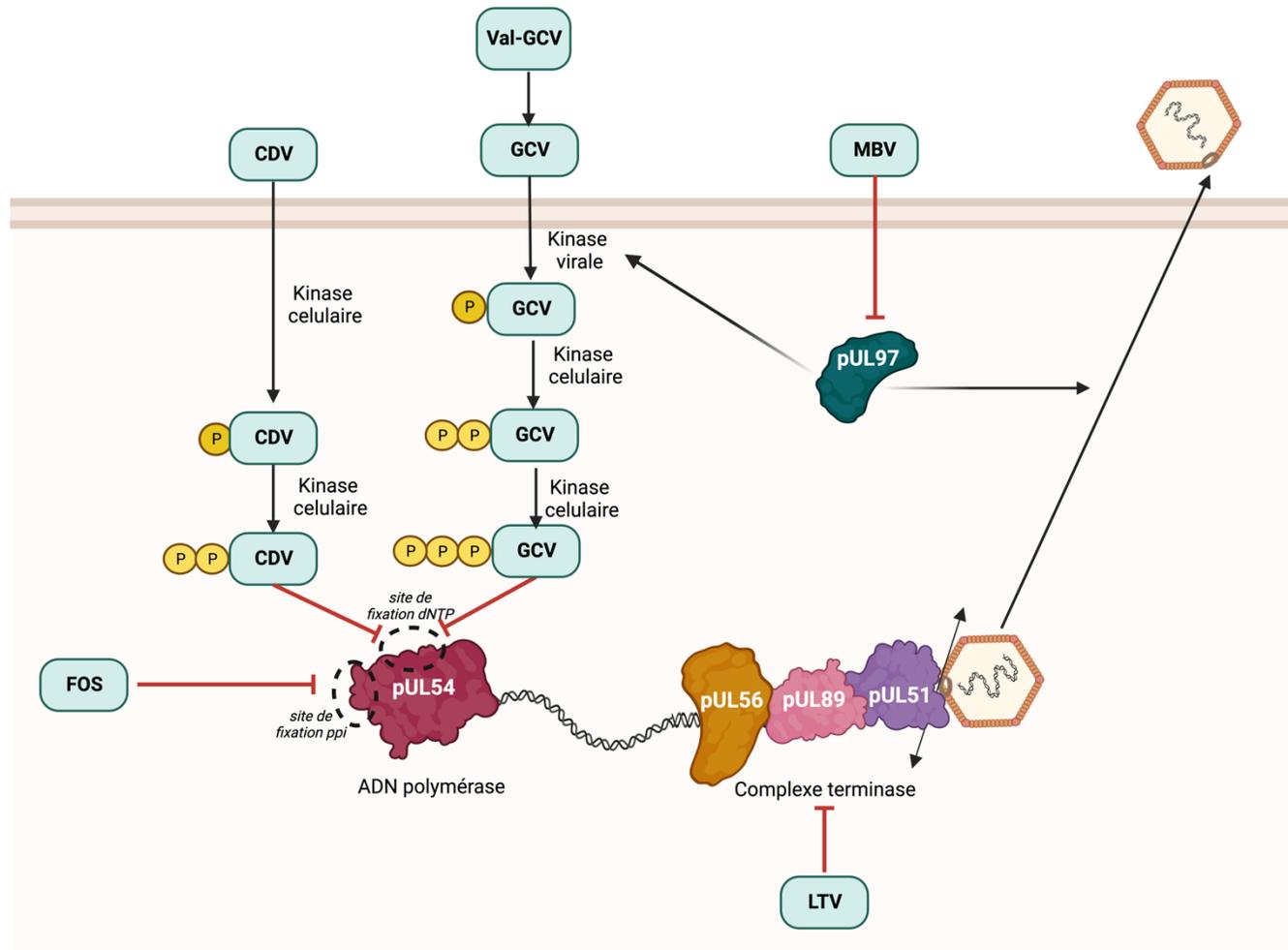


Figure 15 : Mécanisme d'action des antiviraux anti-CMVH.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

Le Val-GCV est une prodrogue du GCV. Le (Val)-GCV (analogue nucléosidique) subit une primo-phosphorylation par la kinase virale pUL97. Le GCV monophosphate (GCV-P) est ensuite di- puis triphosphorylé (GCV-PPP) par des kinases cellulaires. Le CDV (analogue nucléosidique) est directement di-phosphorylé (CDV-PP) par des kinases cellulaires. Le FOS est directement actif sur l'ADN polymérase pUL54. Le MBV est un inhibiteur direct de la kinase virale pUL97. Le LTV est un inhibiteur du complexe terminase du CMVH.



VIII. STRATEGIES THERAPEUTIQUES DE L'INFECTION A CMVH

L'infection à CMVH chez l'individu immunocompétent ne nécessite pas de traitement antiviral. En dehors du nouveau-né infecté par le CMVH, les traitements anti-CMVH concernent les sujets immunodéprimés. Plus récemment, le valaciclovir a montré son efficacité dans la prévention de l'infection congénitale à CMVH.

VIII.1. Traitement préventif

Chez le patient transplanté, deux stratégies font l'objet de recommandations internationales pour la prévention de l'infection ou de la maladie à CMVH : la prophylaxie et le traitement anticipé dit « préemptif » (Tableau 2). Le choix de la stratégie se fait en fonction des facteurs de risque du patient et des protocoles appliqués dans les centres de greffe.

VIII.1.1. Traitement prophylactique

La prophylaxie consiste en l'administration d'un traitement antiviral pour prévenir l'infection à CMVH chez les receveurs les plus à risque. Elle repose essentiellement sur l'utilisation du VGCV à une posologie de 900 mg/jour (à adapter à la fonction rénale), pendant 3 à 6 mois suivant la greffe (Tableau 2). La durée de la prophylaxie peut être étendue à 12 mois chez les receveurs d'organe solide à très haut risque d'infection à CMVH (greffe pulmonaire D+/R-, greffe multi-organes).

VIII.1.2. Traitement préemptif

La stratégie préemptive est basée sur une mesure régulière (hebdomadaire ou bimensuelle) de la charge virale au cours des premiers mois suivant la transplantation (classiquement 3 à 4 mois). Le traitement est initié uniquement dès qu'une infection active à CMVH est diagnostiquée, indiquant un risque élevé de survenue de manifestations cliniques. A l'heure actuelle, il n'y a pas de valeur consensuelle définie de charge virale sanguine CMVH pour l'instauration du traitement préemptif. Néanmoins le seuil de 3 log₁₀ copies/mL est généralement admis pour envisager le traitement. Ce dernier repose sur l'administration par



voie intraveineuse de GCV (5 mg/kg/12h, voie intraveineuse) ou de VGCV (900 mg/12h) jusqu'à négativation de la charge virale sur deux PCR consécutives réalisées à 1 semaine d'intervalle. La stratégie préemptive permet de restreindre le nombre de patients traités et par conséquent, de limiter la toxicité associée aux traitements anti-CMVH et l'émergence de mutations de résistance.

VIII.2. Traitement curatif

Le traitement curatif de première ligne chez le patient transplanté repose sur l'administration de Val-GCV (900 mg/12h, voie orale) ou de GCV (5 mg/kg/12 h, voie intraveineuse), associé si possible à une diminution de l'intensité de l'immunodépression. Chez les patients présentant une intolérance au (Val)-GCV, le FOS (90 mg/kg/12 h) est recommandé en deuxième ligne. Le traitement antiviral doit être poursuivi pendant au moins 2 semaines, jusqu'à amélioration clinique et négativation de la charge virale sur 2 PCR consécutives réalisées à 1 semaine d'intervalle. A l'issue de ce traitement, une prophylaxie secondaire d'une durée de 1 à 3 mois peut être envisagée selon le risque de récurrence.

VIII.3. Immunoglobulines intraveineuses

Les recommandations concernent le patient greffé de CSH et l'utilisation des immunoglobulines polyvalentes associées au traitement antiviral au cours d'une pneumopathie à CMVH (3). Chez les autres patients, les immunoglobulines polyvalentes ou hyperimmunes sont parfois proposées seules ou en association avec un traitement antiviral en cas d'infection réfractaire aux approches conventionnelles (3).

Tableau 2 : Recommandations pour la prévention de l'infection à CMVH chez les transplantés d'organe solide.

D'après Kotton *et al.* (39)

Organe	Statut sérologique	Risque	Recommandations	Alternative
Tous	D-/R-	Faible	Surveillance clinique	Traitement préemptif
Rein	D+/R-	Élevé	6 mois de GCV/Val-GCV ou traitement préemptif	
	R+	Intermédiaire	3 mois de Val-GCV ou traitement préemptif	
Foie	D+/R-	Élevé	3 à 6 mois de Val-GCV ou traitement préemptif	
	R+	Intermédiaire	3 mois de Val-GCV ou traitement préemptif	
Pancréas	D+/R-	Élevé	3 à 6 mois de Val-GCV	Traitement préemptif
	R+	Intermédiaire	3 mois de Val-GCV ou traitement préemptif	
Cœur	D+/R-	Élevé	3 à 6 mois de GCV/Val-GCV	Traitement préemptif
	R+	Intermédiaire	3 mois de GCV/Val-GCV ou traitement préemptif	
Poumon	D+/R-	Élevé	6 à 12 mois de GCV/Val-GCV ± Immunoglobulines anti-CMVH	Traitement préemptif
	R+	Intermédiaire	Minimum 6 mois de GCV/Val-GCV	
Intestin, tissu composite	D+/R-	Élevé	Minimum 6 de GCV/Val-GCV ± surveillance après prophylaxie	Traitement préemptif ± Immunoglobulines anti-CMVH
	R+	Élevé	3 à 6 mois de GCV/Val-GCV ± surveillance après prophylaxie	



IX. RESISTANCE DU CMVH AUX ANTIVIRAUX

IX.1. Généralités

Une absence de réponse au traitement anti-CMVH peut être la conséquence de l'émergence d'une ou plusieurs mutations sur le génome viral, d'une mauvaise observance du traitement, d'un échec pharmacologique ou immunologique (3). Une non-réponse au traitement est observée pour 5 à 15% des patients greffés de CSH ou d'organe solide. Pour presque la moitié d'entre eux (48,6%), une résistance virologique est en cause (77).

Les facteurs de risque d'émergence de souches résistantes aux antiviraux sont :

- Un traitement antiviral prolongé ou répété (durée cumulée)
- Une posologie/concentration insuffisante du traitement antiviral
- Une immunodépression profonde ou l'absence d'immunité initiale (D+/R-)
- Une réplication virale intense (primo-infection, immunodépression intense, virémie élevée)

Une résistance virologique au cours d'un traitement antiviral bien conduit doit être suspectée dans les cas suivants (3) :

- Une absence de réponse clinique
- Une persistance de la réplication virale pendant au moins 3 semaines
- Une augmentation de la charge virale ou une diminution de la charge virale inférieure à 0,5 log/semaine.

Avant de demander une recherche de résistance, il convient de s'assurer de la bonne observance du traitement. Le dosage plasmatique de l'antiviral sera ensuite effectué afin de vérifier que les concentrations résiduelles sont dans la cible thérapeutique. Les causes d'échecs d'origine immunologiques doivent également être écartées en évaluant le degré d'immunosuppression et la réponse immunitaire anti-CMVH.



IX.2. Mécanismes de résistance

En dehors de toute pression de sélection, le virus s'établit chez l'hôte sous forme d'une population hétérogène définie comme une « quasi-espèce » virale. Cet ensemble de variants est généré suite à des erreurs de la polymérase au cours de la réplication de l'ADN viral. Certains de ces variants sont porteurs de mutations sur les gènes codant les enzymes nécessaires aux mécanismes d'action des antiviraux. La pression de sélection exercée par l'administration d'un traitement antiviral favorise la multiplication de variants résistants, qui confèrent un avantage sélectif en termes d'échappement à l'action de l'antiviral (68).

IX.2.1. Mutations de résistance de la kinase virale pUL97

La résistance au GCV est induite par des mutations dans les gènes codant la kinase pUL97 et/ou l'ADN polymérase pUL54. Dans 90% des cas, les mutations du gène *UL97* sont les premières à apparaître chez les patients traités par GCV (39) et se manifestent par des mutations ponctuelles ou de courtes délétions (78). Ces mutations sont principalement regroupées dans les domaines impliqués dans la reconnaissance du substrat (résidus 460 à 520 et 590 à 607) (79) (Figure 16) et confèrent une augmentation de la CI_{50} du GCV de l'ordre de 5 à 15 fois (79). L'activité antivirale du FOS et du CDV est indépendante de la kinase pUL97 et est donc préservée (39).

Les mutations T409M, H411Y/N/L et V353A ont été sélectionnées dans des souches de laboratoires après plusieurs passages sous pression de sélection par le MBV ; elles confèrent une augmentation de la CI_{50} du MBV de 9 à 90 fois (79–81). Parmi elles, les mutations de résistance T409M et H411Y sont les plus fréquemment détectées chez les patients après un traitement au MBV (79,82–84). Ces mutations sont situées à proximité du site de liaison à l'ATP de la kinase pUL97, sur lequel le MBV se lie probablement de manière compétitive (80,81) et ne confèrent pas de résistance croisée au GCV (79). Seules quelques mutations de résistance croisée MBV-GCV ont été décrites dans des échantillons cliniques, telles que la F342Y (85), la V466G (86), la P521L (87) et la C480F (88).

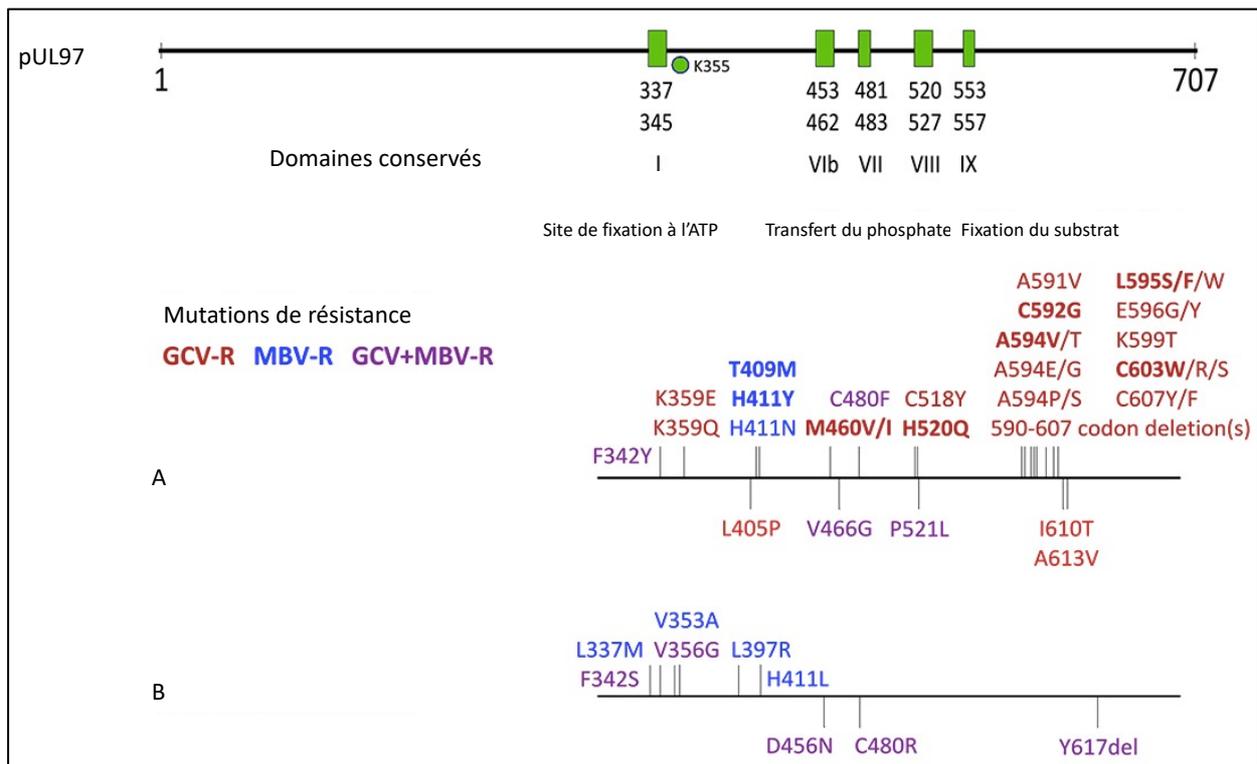


Figure 16 : Carte des mutations de résistance de la kinase virale pUL97.

Les domaines conservés sont indiqués. Les mutations de résistance sont codées par couleur en fonction de leur phénotype de résistance. Les mutations les plus courantes sont en gras. (A) Mutations détectées dans des échantillons cliniques. (B) Mutations détectées *in vitro*. Adapté de Chou, 2020 (79).

IX.2.2. Mutations de résistance de la polymérase virale pUL54

Lors des traitements prolongés par GCV, des mutations sur le gène *UL54* s'ajoutent aux mutations du gène *UL97* et confèrent un haut niveau de résistance au GCV. Les mutations de résistance au CDV et FOS sont localisées sur *UL54*. Les mutations de pUL54 sont principalement retrouvées au sein des domaines conservés (39). Elles induisent, selon leur localisation, une résistance à un, deux ou aux trois antiviraux (Figure 17). La résistance croisée la plus fréquente est celle entre le GCV et le CDV (GCV-CDV) (79) avec de nombreuses mutations retrouvées dans la région 3'-5' exonucléase. La mutation N408K en est un exemple représentatif. Celle-ci n'altère pas la capacité répliquative du virus en culture cellulaire et confère une augmentation de CI_{50} de 3 à 4 fois pour le GCV et d'environ 20 fois pour le CDV (79,89,90). Les mutations associées à une résistance au FOS sont présentes dans les différents domaines catalytiques (*palm*, *finger*, *thumb*, *amino-terminal*) de la polymérase. La plupart de ces mutations confèrent une augmentation de la CI_{50} de 3 à 5 fois (79,89,91). Contrairement

à de nombreuses mutations dans la région 3'-5' exonucléase, les mutations de résistance au FOS réduisent souvent la capacité répliquative du virus en culture cellulaire (79,89). Ces mutations peuvent conférer une résistance au FOS seul, ou une résistance croisée FOS-GCV ou FOS-GCV-CDV (79).

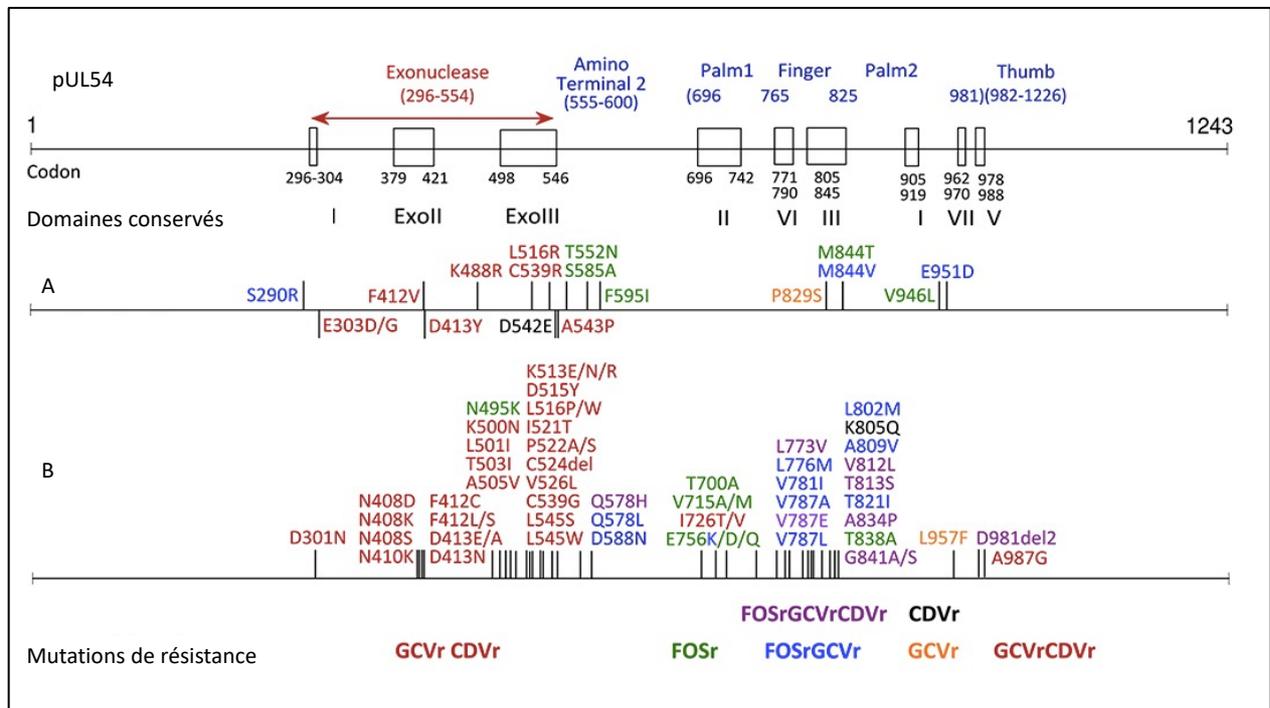


Figure 17 : Carte des mutations de résistance de la polymérase virale pUL54.

Les domaines conservés sont indiqués. Les mutations de résistance sont codées par couleur en fonction de leur phénotype de résistance. (A) Mutations détectées in vitro. (B) Mutations détectées dans des échantillons cliniques. Adapté de Chou, 2020 (79).

IX.2.3. Mutations de résistance dans le complexe terminase

Le LTV semble avoir une barrière génétique faible. De nombreuses mutations ont été sélectionnées *in vitro* entre les codons 229 et 369 de pUL56 (Figure 18) et peuvent conférer différents niveaux de résistance, seules ou en association (79). Parmi elles, les substitutions de la cystéine 325 de pUL56 (C325F, C325Y, C325R, C325W) ont été décrites dans des échantillons cliniques et confèrent une résistance absolue au LTV (augmentation de la $CI_{50} > 3000$ fois) (79,92). Cette résistance n'entraîne qu'une perte légère de la capacité répliquative virale, ce qui suggère que le résidu C325 de pUL56 est essentiel pour la liaison au LTV mais sans importance majeure pour la fonction terminase biologique (79).

Les substitutions C25F de pUL56, N320H, D344E, T350M, M359I de pUL89 et P91S de pUL51 comptent parmi les mutations les moins fréquentes. Elles confèrent une résistance de faible niveau au LTV mais peuvent, en combinaison avec d'autres mutations, augmenter le niveau de résistance. (79,93–95).

Aucune résistance croisée n'est attendue entre le LTV et les autres traitements anti-CMVH dont les cibles sont différentes. Néanmoins, une légère augmentation de la CI_{50} du GCV (2,1 fois) a été rapportée avec le mutant *UL56* E237G (96).

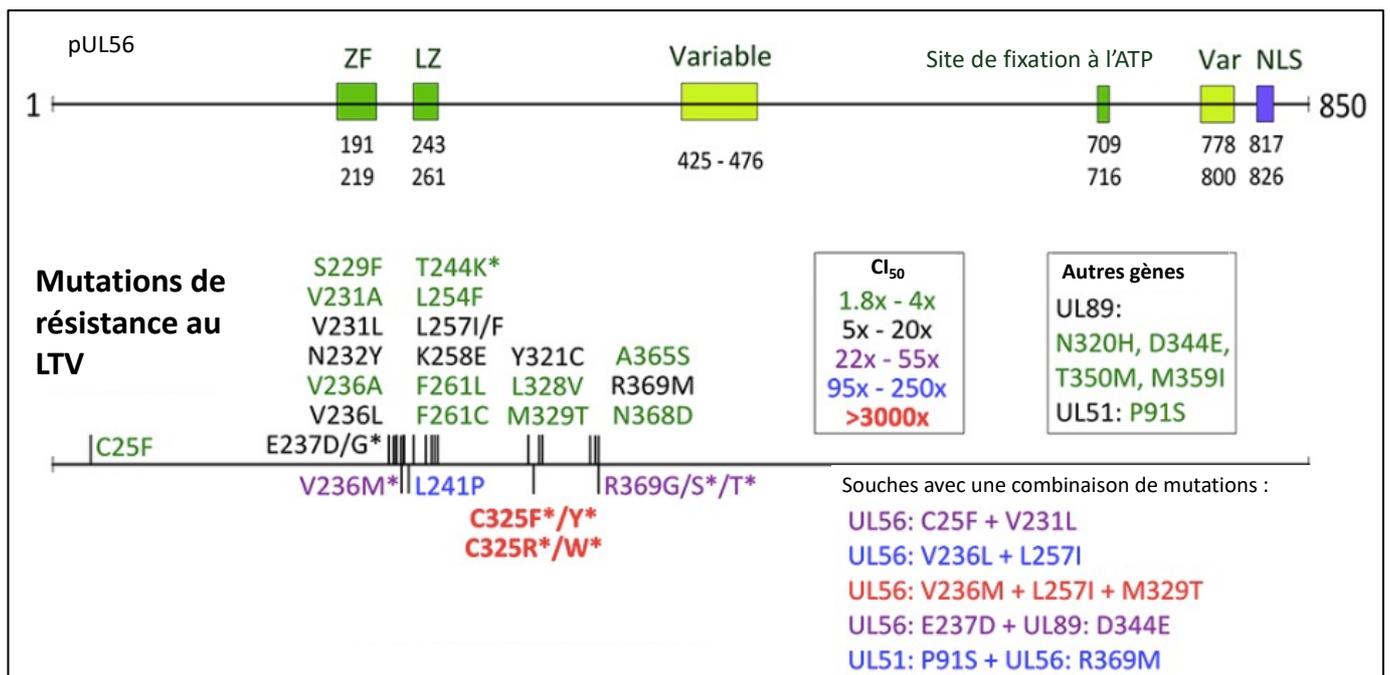


Figure 18 : Carte des mutations de résistance de pUL56.

Les mutations de résistance sont codées par couleur en fonction de leur degré de résistance (encadré « CI_{50} »). Les mutations détectées dans des échantillons cliniques sont indiquées par un astérisque. Des mutations moins fréquentes sont également retrouvées dans les gènes UL89 et UL51 (encadré « autres gènes »). Les combinaisons de mutations augmentent le niveau global de résistance, comme le montrent certaines mutations testées expérimentalement.

ZF : motif en doigt de zinc (*Zinc Finger*) ; LZ : *Leucine Zipper* ; NLS : signal de localisation nucléaire (*Nuclear localization signal*). Adapté de Chou, 2020 (79).

IX.3. Détection de la résistance

La résistance virologique peut être mise en évidence par des méthodes phénotypiques et génotypiques. Ces deux approches sont complémentaires.

IX.3.1. Approche phénotypique

Les méthodes phénotypiques consistent à déterminer la concentration d'un antiviral inhibant de 50% (CI₅₀) à 90% (CI₉₀) la réplication du virus en culture. Ces méthodes permettent également d'évaluer la capacité répliquative des souches étudiées. Cependant, elles nécessitent l'isolement du virus et la constitution d'un stock, obtenu dans un délai minimal de 3 à 4 semaines. En raison de la diversité des techniques utilisées et de la difficulté de leur standardisation, l'utilisation d'un index de sensibilité ou IS₅₀ est proposée (13). L'IS₅₀ correspond à la CI₅₀ de la souche étudiée rapportée à la CI₅₀ de la souche sensible de référence (généralement AD169), testée au cours du même essai. Une souche est considérée comme résistante lorsque son IS₅₀ est supérieur ou égal à 3. La comparaison des valeurs obtenues pour les souches isolées avant, pendant et après traitement est très utile à l'interprétation des résultats (6). Néanmoins, des difficultés d'interprétation subsistent. En effet, la présence de souches minoritaires résistantes au sein d'un mélange de souches peut être méconnue. De plus, une souche isolée des urines ou du sang périphérique peut différer de la souche responsable de l'atteinte clinique (97).

IX.3.2. Approche génotypique

Les méthodes d'étude du génotype reposent sur la recherche de mutations de résistance par séquençage de l'ADN des gènes viraux *UL54* et *UL97*. Les mutations peuvent être détectées à partir de l'ADN extrait soit des isolats, soit directement des prélèvements (13). Les techniques NGS de séquençage présentent des avantages par rapport au séquençage Sanger standard : elles permettent une analyse plus fine du profil de résistance, une détection plus rapide d'une mutation émergente et l'identification de variants minoritaires (3). Néanmoins, ces techniques ne sont pas ou peu utilisées en routine à l'heure actuelle (3).

Lorsqu'une nouvelle mutation est détectée par séquençage, il est nécessaire de compléter l'étude génotypique par une étude phénotypique, à partir de l'isolat clinique ou d'une souche recombinante. Cette étude permet d'évaluer l'impact de la mutation sur la capacité répliquative de la souche et de mesurer le niveau de résistance qu'elle engendre.

X. EVALUATION DE L'ETAT IMMUNITAIRE

L'immunité adaptative *via* le rôle des LT et LB est indispensable pour contrôler l'infection à CMVH (98). La réponse cellulaire T spécifique joue un rôle fondamental dans le contrôle de la réplication virale. La mesure de l'immunité à médiation cellulaire spécifique du CMVH (IMC-CMVH) semble pouvoir prédire les patients à risque augmenté d'infection à CMVH après une transplantation et pourrait permettre une individualisation des stratégies préemptives et prophylactiques. Une variété de méthodes évaluant l'IMC-CMVH existe ; elles explorent soit une seule population lymphocytaire CD4+ ou CD8+, soit les deux. La majorité de ces méthodes reposent sur la détection de la production d'IFN- γ après stimulation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) ou du sang total par des antigènes spécifiques du CMVH (peptide unique, pool de peptides ou lysats de cellules infectées). En dehors de l'IFN- γ , d'autres marqueurs ont été étudiés pour la surveillance de l'IMC-CMVH. Plus récemment, l'exploration du virome humain, et notamment des torque teno virus (TTV), a été proposée pour évaluer l'immunité cellulaire globale chez les patients à risque d'infection à CMVH.

X.1. Méthodes basées sur la détection de l'IFN- γ

X.1.1. QuantiFERON-CMV® (QF-CMV)

Le QuantiFERON-CMV® (QF-CMV, Cellestis, QIAGEN, Melbourne, Australie) est un test commercialisé marqué CE permettant l'évaluation en routine de la réponse cellulaire T CD8+. Il repose sur la détection de la quantité d'IFN- γ sécrétée dans le plasma, en réponse à des antigènes de CMVH. Ce test utilise un ensemble de 22 épitopes de protéines spécifiques du CMVH, incluant la pp65, la pp50, la gB et l'IE-1, qui sont spécifiques des molécules HLA de classe I (99). Ces peptides couvrent plus de 98% des haplotypes HLA de classe I retrouvés dans la population humaine.

Le QF-CMV emploie 3 tubes spécifiques de prélèvement sanguin contenant respectivement les antigènes spécifiques du CMVH (tube antigène), de la phytohémagglutinine (tube mitogène ou contrôle positif) et sans antigène (tube nul ou

contrôle négatif). Un taux élevé d'IFN- γ dans le tube antigène CMV indique que le patient présente une bonne immunité cellulaire dirigée contre le CMV. La réponse au mitogène, constitue, quant à elle, un indicateur du niveau global d'immunité cellulaire et sa positivité témoigne de la bonne réalisation du test.

Le principe du QF-CMV est présenté sur la figure 19. Le sang total est prélevé dans chacun des 3 tubes spécifiques. Les tubes sont incubés à 37°C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement. Après une période d'incubation de 16 à 24 heures, ils sont agités une dizaine de fois et centrifugés à 2000-3000 g pendant 15 min. La quantité d'IFN- γ présente dans le plasma est mesurée par technique ELISA dans chaque tube. Le plasma peut être congelé (2-8°C) jusqu'à 28 jours pour un dosage différé de l'IFN- γ . Initialement réalisé en technique ELISA microplaques (QIAGEN), le dosage est désormais possible sur l'analyseur LIAISON® XL (DiaSorin), en utilisant la trousse prévue pour le QuantiFERON®-TB.

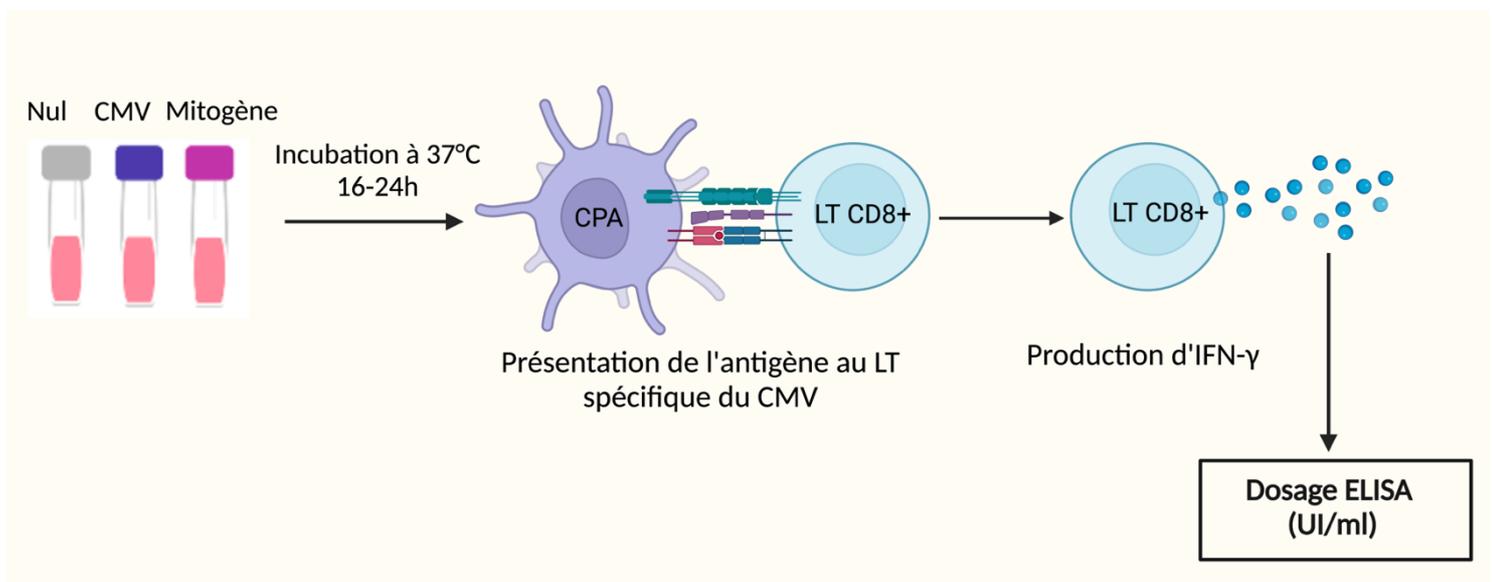


Figure 19 : Principe du test QF-CMV.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

Selon les recommandations du fournisseur, un test est considéré comme réactif si la quantité d'IFN- γ présente dans le tube antigène (après soustraction de la valeur du tube nul) est $\geq 0,2$ UI/ml (Tableau 3). Si cette valeur est $< 0,2$ UI/ml et que le contrôle mitogène (après soustraction de la valeur du tube nul) est $\geq 0,5$ UI/ml, le test est non réactif. Un résultat est considéré comme indéterminé si l'échantillon présente une réponse négative au mitogène ($<$

0,5 UI/ml) et aux antigènes CMV (< 0,2 UI/ml). Ces seuils ont été définis selon l'étude de Walker *et al.* (100).

Ce test, facile à mettre en œuvre, présente néanmoins quelques limites. La non-réponse au mitogène constitue une difficulté majeure à l'interprétation du test. Elle peut être liée au non-respect des procédures pré-analytiques (mauvaise manipulation de l'échantillon, remplissage/mélange incorrect du tube mitogène) mais peut également survenir en cas de lymphopénie, ou en raison d'une incapacité des lymphocytes du patient à générer de l'IFN- γ .

Tableau 3 : Interprétation des résultats du test QF-CMV.

Valeur antigène-nul (UI/ml d'IFN)	Valeur mitogène-nul (UI/ml d'IFN)	Résultat	Interprétation
$\geq 0,2$	Tous	Réactif	Réponse immunitaire aux antigènes de CMVH détectée.
$< 0,2$	$\geq 0,5$	Non réactif	Réponse immunitaire aux antigènes de CMVH non détectée.
$< 0,2$	$< 0,5$	Indéterminé	Impossibilité de détection de réponse immunitaire aux antigènes de CMVH et au mitogène.

Le QF-CMV a été évalué dans plusieurs contextes cliniques : en pré-transplantation (I) et en post-prophylaxie (II) pour prédire le risque d'infection/maladie à CMVH après la greffe, pour une adaptation individuelle de la durée de la prophylaxie (III) et en complément de la surveillance de la charge virale CMVH dans une stratégie préemptive (IV) (101).

(I) QF-CMV en pré-transplantation pour la stratification du risque d'infection/maladie à CMVH après la greffe. Une étude prospective portant sur 55 transplantés pulmonaires et rénaux a démontré l'utilité d'un QF-CMV pré-transplantation pour évaluer le risque de répllication à CMVH après la greffe. Tous les patients R- (11/11) présentaient un QF-CMV non réactif avant la transplantation, tandis que 30/44 (68,2%) des patients R+ avaient un test QF-CMV réactif. Parmi les patients R+, 7/14 (50%) patients avec un

QF-CMV non réactif ont développé une répllication à CMVH post-transplantation, alors que le virus ne s'est répliqué que chez 4/30 (13,3%) patients avec un QF-CMV réactif ($p = 0,021$) (102). De plus, les patients avec un QF-CMV non réactif qui recevaient un organe d'un donneur séropositif pour le CMV (D+) avaient un risque de répllication virale 10 fois plus élevé que les patients avec un QF-CMV réactif. Une autre étude réalisée chez 39 transplantés pulmonaires a montré que les patients avec un QF-CMV pré-transplantation non réactif présentaient un risque accru de réactivation à CMVH après la greffe (103).

(II) QF-CMV post-prophylaxie pour prédire le risque d'infection/maladie à CMVH après la greffe. Dans une étude portant sur 108 transplantés d'organe solide (D+/R+ $n = 39$; D-/R+ $n = 34$; D+/R- $n = 35$), l'incidence de la maladie à CMVH était significativement plus faible dans le groupe de patients avec un QF-CMV réactif à la fin de la prophylaxie (2/38 ; 5,3%) comparativement au groupe QF-CMV non réactif (16/70 ; 22,9%) ($p = 0,038$) (104). Ces résultats ont été confirmés dans une étude de cohorte portant sur 124 transplantés d'organe solide (D+/R-) : 31/124 (25%) patients avaient un QF-CMV réactif, 81/124 (65,3%) avaient un QF-CMV non réactif et 12/124 (9,7%) avaient un QF-CMV indéterminé (105). A 12 mois, l'incidence de la maladie à CMV était significativement plus faible dans le groupe de patients QF-CMV positif (6,4%) que dans le groupe QF-CMV non réactif (22,2%) ou indéterminé (58,3%), ($p < 0,001$) (105). Cette étude a par ailleurs mis en évidence que les transplantés avec un QF-CMV indéterminé semblaient avoir un risque plus élevé de maladie à CMVH que les transplantés avec un QF-CMV non réactif. Ces données suggèrent que les patients qui présentent une anergie globale des lymphocytes T sont à haut risque de maladie à CMVH (101). L'absence de réponse au mitogène a également été associée à une incidence plus élevée de maladie à CMVH dans une étude réalisée chez des transplantés cardiaques (106).

(III) QF-CMV pour une adaptation individuelle de la durée de la prophylaxie. Dans un essai clinique mené chez 150 transplantés rénaux R+ recevant un traitement d'induction par globulines anti-thymocytes (ATG), il n'a pas été observé d'augmentation significative de l'incidence de l'infection/maladie à CMVH chez les patients qui avaient interrompu précocement la prophylaxie sur la base d'un QF-CMV réactif, par rapport aux patients qui avaient reçu une prophylaxie de 3 mois (107). Une étude réalisée chez 154 patients transplantés cardiaques a également montré que la durée de la prophylaxie pouvait être guidée à l'aide du test QF-CMV (108). Dans une autre étude réalisée chez 118 patients

transplantés pulmonaires, une réduction significative de l'infection à CMVH a été observée chez les patients dont la durée de la prophylaxie était déterminée par le résultat du QF-CMV (30/82, 37%), par rapport aux patients qui avaient reçu une prophylaxie de 5 mois (21/36, 58%) ($p = 0,03$) (109). Le QF-CMV a également été utilisé pour évaluer la nécessité d'instaurer une prophylaxie antivirale secondaire chez 27 transplantés d'organe solide traités pour une virémie à CMVH (110). Après négativation de la charge virale, deux stratégies ont été adoptées selon le résultat du test. Le traitement antiviral a été interrompu chez les patients qui présentaient un QF-CMV réactif (14/27 ; 51,9%). Les patients avec un QF-CMV non réactif (13/27, 48,1%) ont reçu 2 mois de prophylaxie secondaire. Dans le groupe QF-CMV réactif, un seul patient a connu un nouvel épisode à CMVH asymptomatique. Malgré un traitement antiviral prolongé, une récurrence a été observée chez 9/13 (69,2%) des patients avec un QF-CMV non réactif ($p = 0,001$).

Cependant, toutes les études publiées ne démontrent pas une utilité clinique du QF-CMV (101). Dans une étude de cohorte observationnelle portant sur 120 transplantés rénaux R+ ayant reçu un traitement d'induction par ATG et une prophylaxie par VGCV, le QF-CMV à l'arrêt de la prophylaxie a montré des performances diagnostiques sous-optimales pour prédire la protection de la virémie à CMVH (sensibilité : 77,4%; spécificité : 34,3%; valeur prédictive positive (VPP) : 64,1%; valeur prédictive négative (VPN) : 50,0%), sans différence significative entre les patients avec un QF-CMV négatif (non réactif ou indéterminé) et positif (45,8% vs 36,1%, $p=0,24$) (111). La spécificité et la VPP se sont améliorées en élevant la valeur seuil de l'IFN- γ à 1,13 UI/ml (65,7 % et 71,4 %) et à 7,0 UI/ml (85,7 % et 76,2 %), au détriment de la VPN. Cette étude souligne également que la variabilité de la performance des tests évaluant l'immunité cellulaire peut être influencée par la population de patients étudiée (R+ vs R-), le type de traitement immunosuppresseur et le type d'évènement à CMVH (maladie cliniquement significative ou virémie de faible niveau) (101,111,112).

(IV) QF-CMV comme outil de surveillance en complément de mesures régulières de la charge virale dans le cadre d'une stratégie préemptive. Dans une étude portant sur 67 transplantés pulmonaires, des charges plasmatiques CMVH et des tests QF-CMV ont été réalisés au cours de la première année post-greffe (113). Dans le groupe de patients R+, une ADNémie CMVH élevée nécessitant la mise en place d'un traitement préemptif a été observée plus fréquemment lorsque les réponses cellulaires T CD8+ spécifiques étaient indétectables,

fluctuantes ou n'étaient révélées qu'après la détection de l'ADNémie CMVH. Une autre étude a évalué le QF-CMV chez 37 transplantés d'organe solide qui présentaient une virémie asymptomatique de faible intensité (114). Le test a été effectué peu après l'apparition de la virémie. Une clairance virale spontanée a été observée chez 24/26 (92,3%) patients avec un QF-CMV réactif contre 5/11 (45,5%) patients avec un QF-CMV non réactif ($p=0,004$).

X.1.2. ELISpot

Le test ELISpot (*Enzyme-Linked Immunosorbent Spot*) permet de quantifier avec une sensibilité élevée la production d'IFN- γ des LT CD4+ et CD8+, après stimulation avec des peptides spécifiques du CMVH ou des lysats d'antigènes entiers (Figure 20). Après une étape de purification, les LT sont déposés sur un support solide recouvert d'anticorps anti-IFN- γ en présence du stimuli. Après élimination des cellules, l'immunocomplexe est révélé par technique ELISA en utilisant un substrat chromogène insoluble dont la précipitation localisée génère des tâches colorées ou immunospots. Les réponses cellulaires CD4+ et CD8+ ne peuvent pas être distinguées par le test ELISpot. Comme pour le test QF-CMV, un contrôle mitogène est utilisé pour évaluer la réponse cellulaire T globale.

De nombreux tests ELISpot « maisons » ont fait l'objet d'évaluations et se sont avérés prédictifs de l'infection et de la maladie à CMVH (115–120). L'exploration de la cinétique des réponses T par cette technique pourrait également contribuer à une meilleure stratification du risque d'infection à CMVH (121). Deux tests ELISpot ont reçu le marquage CE : le T.Spot.CMV (Oxford Diagnostics, Royaume-Uni) et le T-Track CMV (Lophius Biosciences, Allemagne, maintenant acquis par Mikrogen GmbH) (39,122,123). A l'heure actuelle, il n'y a pas de seuil de positivité validé pour leur utilisation en clinique (101). Dans une étude multicentrique portant sur 583 transplantés rénaux (250 D+/R- et 277 R+), la valeur seuil optimale du test T.Spot[®].CMV à l'arrêt de la prophylaxie a été estimée à 40 *spot forming units* (sfu)/250 000) cellules pour les antigènes IE-1 ou pp-65, avec une VPN de l'infection/maladie à CMVH > 97% (124). D'autres études ont proposé un seuil de positivité inférieur (par exemple, 20 sfu/300 000 cellules) et ont également suggéré que seule la stimulation avec IE-1, et non avec pp65, serait prédictive d'une infection à CMVH (125).

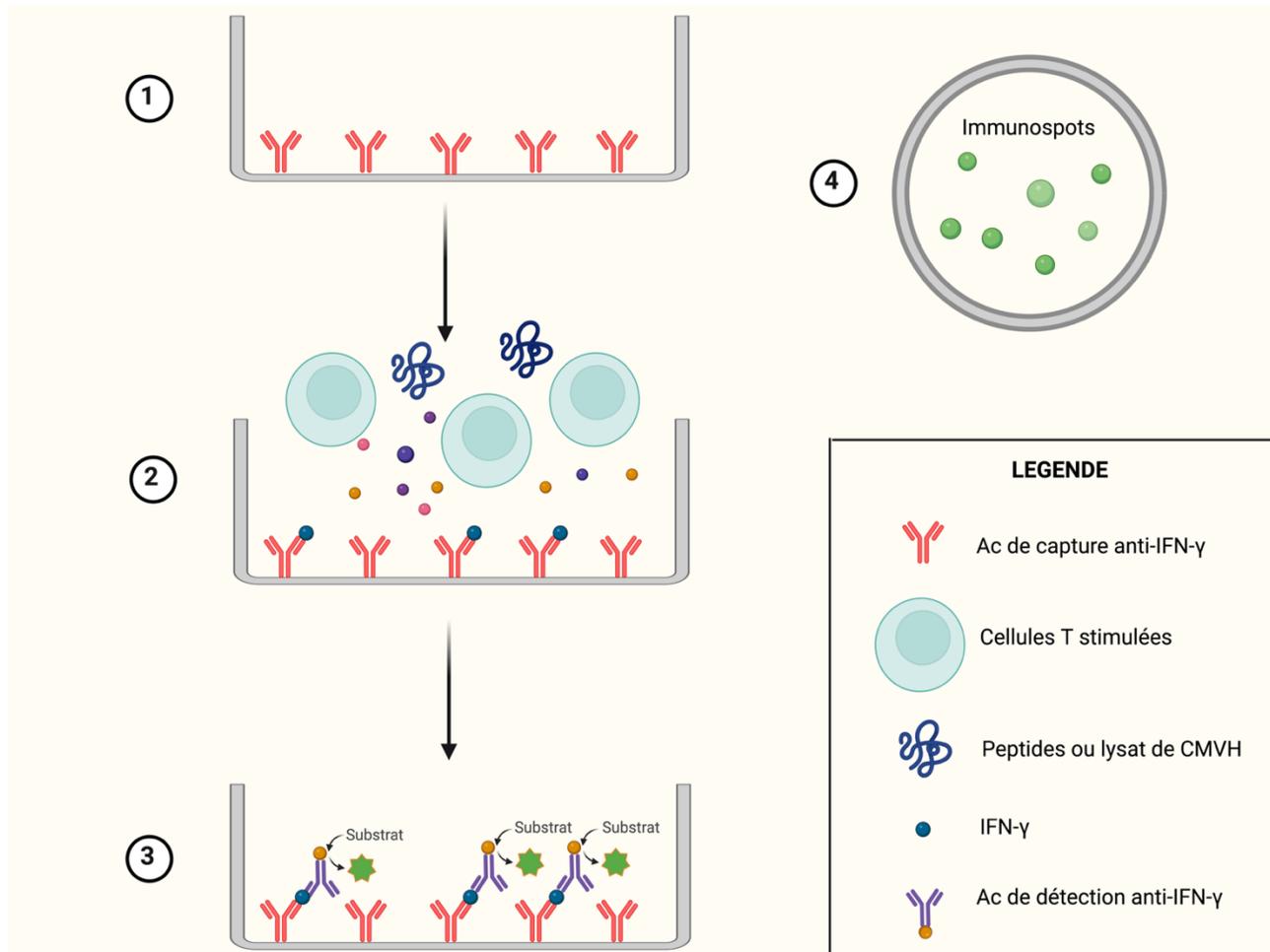


Figure 20 : Principe du test ELISpot.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

Les anticorps anti-IFN- γ sont fixés au fond d'un puits (1). Les cellules T, incubées en présence de peptides spécifiques du CMVH ou de lysats d'antigènes, sécrètent des cytokines. L'IFN- γ sécrété est capté par les anticorps fixés (2). Les cellules T sont éliminées et l'IFN- γ capté est révélé par un second anticorps spécifique, couplé à une enzyme (3), ce qui produit un précipité coloré formant des tâches colorées ou immunospots (4).



X.1.3. Marquage Intracellulaire des cytokines (ICS)

De nombreuses études ont évalué les réponses cellulaires T spécifiques du CMVH en mesurant la production d'IFN- γ grâce à des tests ICS (*Intracellular Cytokines Staining*) par cytométrie en flux (39).

Le principe de la technique est représenté sur la figure 21. Le sang total ou les PBMC isolées sont stimulés avec des peptides ou un lysat de CMVH. Lorsqu'un lysat d'antigènes entiers est utilisé, le test n'est pas restreint aux haplotypes HLA les plus fréquents. Ainsi, la connaissance du profil HLA du patient n'est pas requise. Les cellules stimulées sont ensuite marquées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre l'IFN- γ . Ce test peut être étendu à l'étude d'autres cytokines ou marqueurs de surface cellulaires. Il peut ainsi fournir une caractérisation quantitative et qualitative des cellules T spécifiques du CMVH et permettre la distinction des réponses CD4+ et CD8+ (39,101). Grâce aux progrès récents, il est possible de tester simultanément plusieurs marqueurs, pour obtenir une meilleure compréhension des réponses immunitaires cellulaires spécifiques à l'antigène (39,101). Un test commercial utilisant une technique de cytométrie en flux (CMV inSIGHT™ T Cell Immunity, Eurofins Viracor) est disponible pour une utilisation clinique aux Etats-Unis (101).

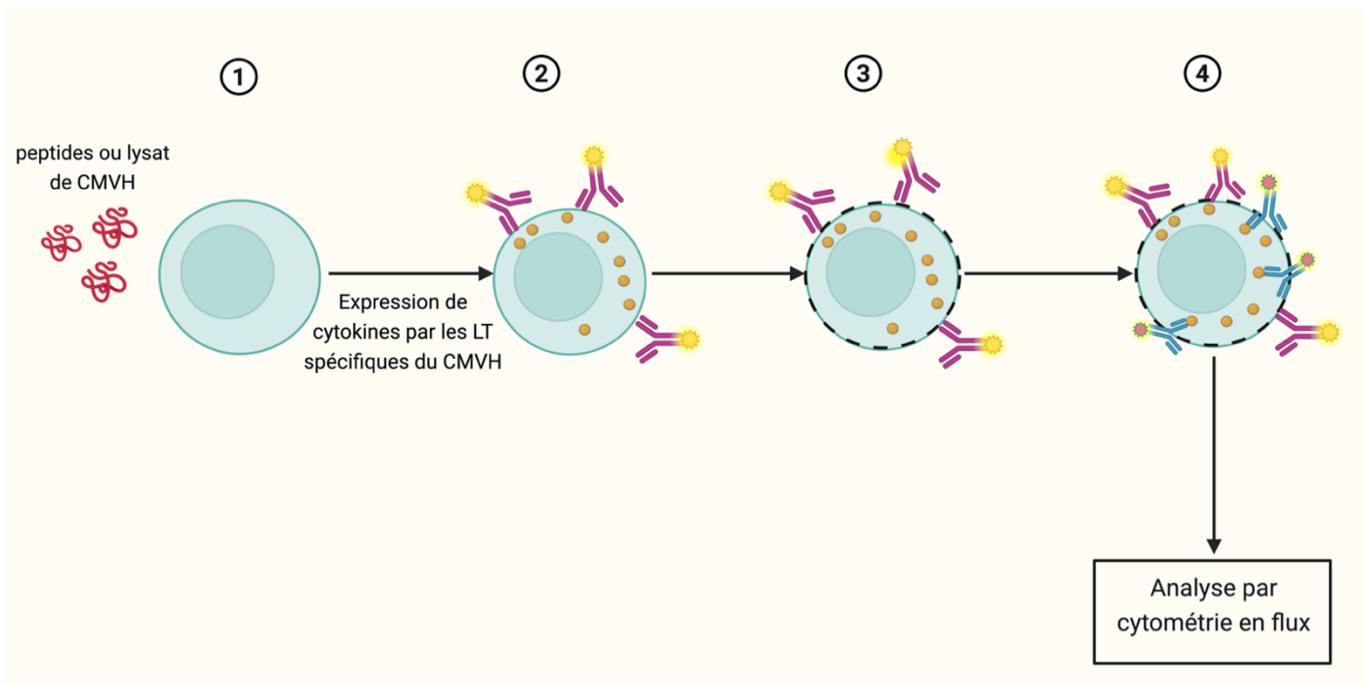


Figure 21 : Principe du test ICS.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).



Les cellules T sont stimulées avec des peptides ou un lysat de CMVH et traitées avec des poisons métaboliques qui bloquent l'exportation des protéines cellulaires (1). Les antigènes exprimés à la surface sont marqués avec des anticorps spécifiques couplés à un fluorochrome (2). Les cellules sont fixées et perméabilisées (3). Les cytokines intracellulaires sont marquées par des anticorps spécifiques conjugués à un fluorochrome (4). L'analyse est réalisée par cytométrie en flux.

Plusieurs études cliniques suggèrent que la technique ICS pourrait permettre de prédire l'infection et la maladie à CMVH (39). Des études réalisées chez des transplantés d'organe solide montrent notamment un risque accru de maladie à CMVH chez les patients présentant une faible immunité cellulaire T spécifique (25,126–129). Aussi, l'absence de réponse cellulaire T anti-CMVH semble corrélée à une absence de clairance virale (25,28,128). Des niveaux stables de cellules T CD4+ spécifiques du CMVH mesurés avec cette technique sont associés à un risque plus faible de réplication virale (25,128).

X.1.4. Test de marquage par des multimères du CMH (ou CMH-multimère)

Le CMH-multimère est réalisé sur des échantillons de sang total ou des PBMC et permet d'évaluer la réponse cellulaire T CD8+ anti-CMVH. Les LT sont directement marqués au moyen de tétramères ou pentamères du CMH de classe I conjugués à un peptide du CMVH (Figure 22).

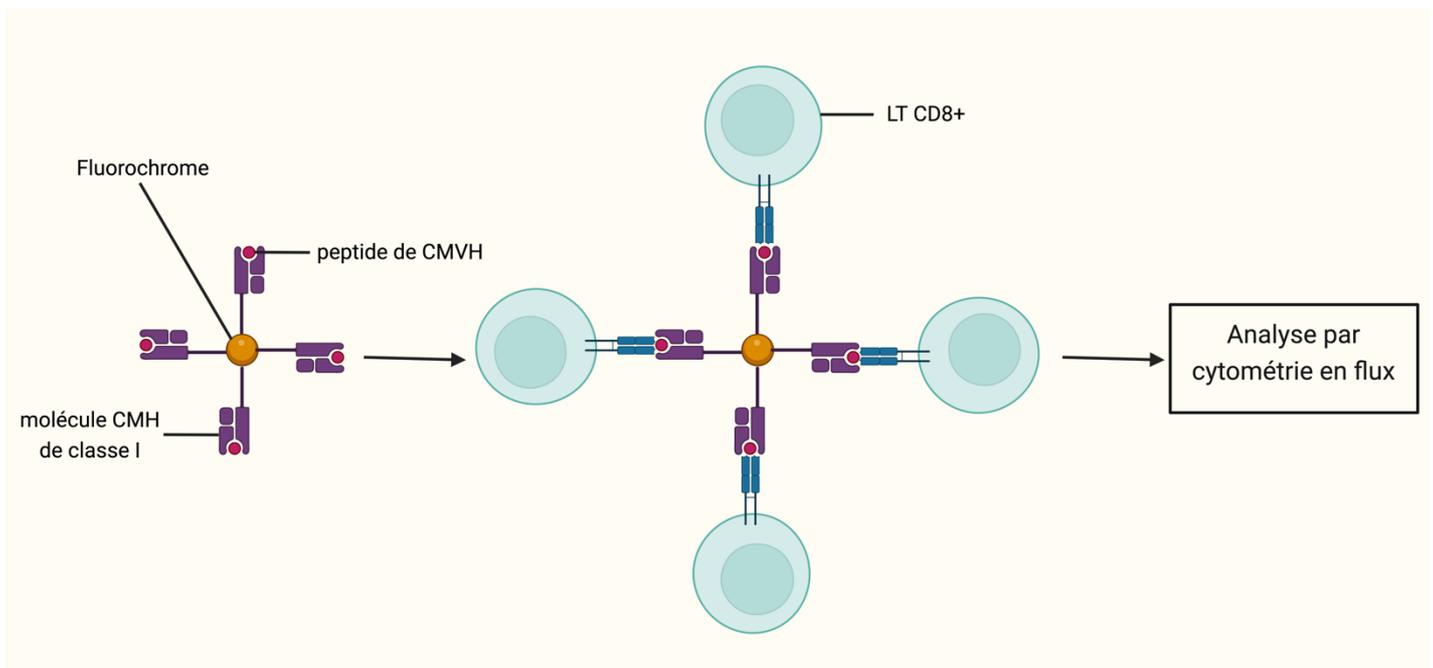


Figure 22 : Principe du test CMH-multimère.

(Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

Le CMH-multimère est spécifique d'épitope, ce qui contraint à connaître le profil HLA du patient. De plus, ce test ne donne pas d'information sur l'état fonctionnel des LT CD8+. Comme les tests ICS, il manque de standardisation et nécessite l'accès à une plateforme de cytométrie en flux, ce qui peut limiter son utilisation à grande échelle. Associés à l'analyse de marqueurs de surface, ce test s'est avéré prédictif de la virémie à CMVH (130,131).

X.2. Exploration d'autres marqueurs

Bien que la plupart des tests évaluant l'immunité cellulaire anti-CMVH soient basés sur la détection de l'IFN- γ , d'autres marqueurs pourraient permettre d'établir une corrélation entre les réponses cellulaires T spécifiques et le risque d'infection à CMVH (39,101). Ces marqueurs comprennent l'IL-2, le TNF- α , le CD107, la protéine de mort cellulaire programmée PD-1 et le CD154 (39). Chez les transplantés d'organe solide présentant une infection à CMVH, il a été démontré que l'expression des chimiokines CCL8 et CXCL10 était associée au contrôle de la réplication virale. Une étude monocentrique a également montré que l'expression de CCR6, un récepteur de chimiokines impliqué dans le recrutement des cellules T mémoires vers les sites d'inflammation des muqueuses, permettrait de prédire une réactivation tardive à CMVH à l'arrêt de la prophylaxie (132,133). A l'heure actuelle, ces marqueurs sont uniquement explorés dans le cadre de la recherche et ne font pas l'objet de tests commerciaux (101).

X.3. Torque teno virus (TTV)

Les torque teno virus humains sont de petits virus non enveloppés à ADN monocaténaire circulaire de polarité négative (Figure 23). Ils appartiennent à la famille des *Anelloviridae* et constituent une part importante du virome humain (134). Ces virus présentent une extrême diversité génétique (135) et sont fortement prévalents dans la population mondiale (> 90%) (136). Le premier représentant du genre, le torque teno virus (TTV) a été découvert en 1997 (137). Il s'agit d'un virus persistant qui se multiplie de façon chronique chez le sujet immunocompétent. Il est retrouvé dans de nombreux liquides biologiques et tissus et n'est pas considéré, jusqu'à preuve du contraire, comme pathogène

pour l'être humain (138). La réplication du TTV est étroitement liée au statut immunitaire de l'hôte. De très hauts titres de virus sont retrouvés chez les sujets immunodéprimés (SIDA (139), cancer (140), greffe (141–144)), les personnes âgées (145) et les enfants en bas âge dont le système immunitaire est moins performant (145). La PCR « maison » développée par Maggi *et al.* (146) et la trousse commerciale TTV R-GENE® (bioMérieux, France) sont les techniques les plus utilisées pour la détection de l'ADNémie du TTV (136,147). Elles ciblent une séquence conservée au niveau de la région 5' non traduite permettant la détection et la quantification de la majorité des espèces de TTV connues à ce jour (136,145).

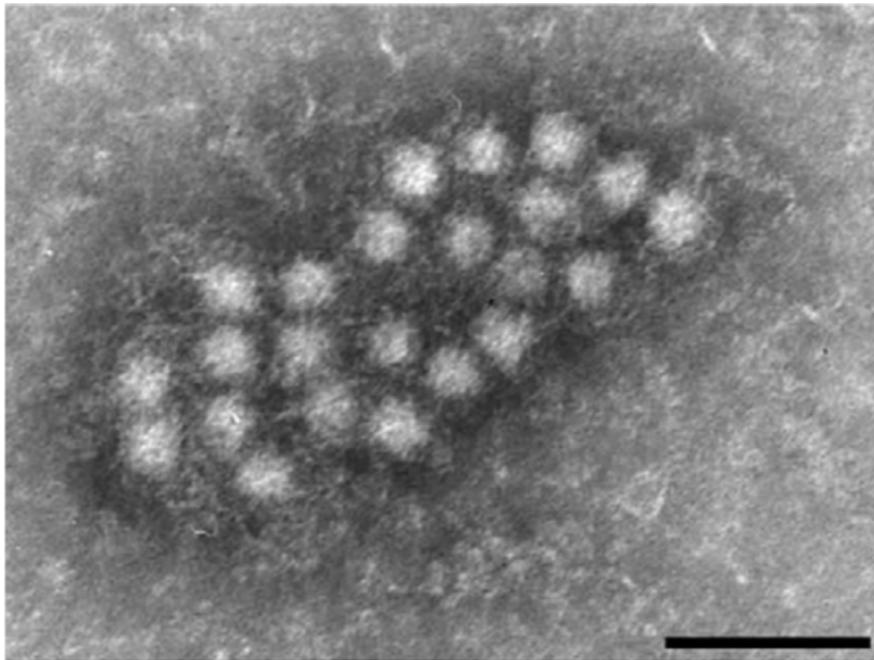


Figure 23 : Particules de TTV visualisées en microscopie électronique, après coloration négative à l'acétate d'uranyle.

La barre d'échelle correspond à 100 nm. D'après Itoh *et al.*, 2000 (148).

Le TTV représente un marqueur endogène de l'état global du système immunitaire. Des charges virales TTV élevées ont été détectées chez des transplantés d'organe solide traités avec des immunosuppresseurs inhibant la sécrétion d'IL-2. Ainsi, la réponse lymphocytaire T semble exercer un rôle majeur dans le contrôle de la multiplication du TTV (136,138). Les cellules NK et les CPA semblent également contribuer au contrôle de la réplication du TTV (136,149). Enfin, des charges virales TTV augmentées ont été détectées chez des patients

traités par des anti-CD20 pour une polyarthrite rhumatoïde, ce qui suggère l'implication des cellules B dans le contrôle de la multiplication virale (136,150).

De plus en plus de publications soulignent le potentiel de la charge virale TTV en tant que biomarqueur d'immunosuppression globale. La majorité des études évaluant l'intérêt de la charge virale TTV pour la surveillance immunologique des patients transplantés ont été réalisées dans le contexte d'une greffe rénale (136). Une corrélation inverse a été observée entre les charges virales TTV et les sous-populations lymphocytaires T CD3+, CD4+ et CD8+ à 1 mois (M1) et M3 post-greffe (151). Des seuils potentiellement prédictifs du risque d'infections opportunistes post-transplantation ont été proposés. En utilisant une PCR « maison », Doberer *et al.* ont suggéré qu'une charge TTV > 8 log₁₀ copies/ml (ou > 6,6 log₁₀ copies/ml avec la PCR commerciale (136)) entre M4 et M12 post-transplantation était associée à un risque accru d'infections dans la première année de la transplantation (152). Selon l'étude de Fernández-Ruiz *et al.*, des charges virales TTV > 3,2 log₁₀ copies/ml et > 4,6 log₁₀ copies/ml (PCR commerciale) à M1 post-transplantation seraient respectivement prédictives du risque d'infections et de complications liées à l'immunosuppression dans l'année post-greffe (151). D'après l'étude réalisée par Maggi *et al.*, une charge virale TTV > 3,5 log₁₀ copies/ml (PCR « maison ») entre J0 et J10 post-transplantation serait associée à un risque majoré d'infection à CMVH dans les 4 mois post-transplantation (153). Ce seuil correspond à 3,8 log copies/ml avec la PCR commerciale (136). De nouvelles études sont attendues pour confirmer la potentielle application de ces seuils pour le suivi immunologique du patient transplanté rénal.

PARTIE II

ETUDE EXPERIMENTALE

**Evaluation prospective du risque d'infection à CMVH du sujet
transplanté rénal R+ par le test QuantiFERON[®]-CMV et la PCR TTV**

(Article en cours de soumission)

Cette recherche a obtenu :

- le financement local de la DRCI du CHU de Limoges,
- le soutien de Cellestis (fourniture des tests QuantiFERON[®]-CMV),
- un soutien via les crédits régionaux attribués au Centre d'investigation clinique de Limoges.



L'infection à CMVH est observée chez plus de 30% des receveurs d'organes et constitue une cause majeure de morbidité et de mortalité. Les stratégies actuelles de prévention de l'infection à CMVH reposent sur le traitement prophylactique ou le traitement anticipé (pré-emptif). Toutefois, l'utilisation des molécules anti-CMVH est associée à des effets indésirables notables (neutropénie, néphrotoxicité) et conduisent à l'arrêt prématuré du traitement ou à l'utilisation de doses réduites, favorisant la non-réponse au traitement ou l'émergence de résistances.

Le QuantiFERON®-CMV (QF-CMV) est le test de choix pour l'évaluation de la réponse cellulaire T CD8+ en routine. Un taux élevé d'IFN- γ dans le tube antigène CMV (QF-Ag) indique une bonne immunité cellulaire T anti-CMVH. La réponse au mitogène (QF-Mg), constitue, quant à elle, un indicateur du niveau global d'immunité cellulaire et sa positivité témoigne de la bonne réalisation du test. Des études antérieures ont démontré l'utilité du QF-CMV pour la stratification du risque d'infection ou de maladie à CMVH post-greffe. Ce test simple pourrait également apporter des éléments cruciaux pour une adaptation individuelle de la prophylaxie ou de la thérapeutique, et être utilisé comme outil de surveillance dans le cadre d'une stratégie pré-emptive (101). Cependant, la plupart des études se sont concentrées sur les populations à haut risque de CMV (R-).

L'exploration du virome humain, et notamment des torque teno virus (TTV), a également été proposée en tant que biomarqueur d'immunosuppression globale chez les patients à risque d'infection à CMVH (136,154). Une corrélation inverse a été observée entre les charges virales TTV et les sous-populations lymphocytaires T CD3+, CD4+ et CD8+ à 1 mois (M1) et M3 post-greffe (151). Des charges virales TTV élevées sont associées à un risque accru d'infections opportunistes post-greffe (136,154).

L'objectif de notre travail est d'évaluer la capacité du QF-Ag ou du QF-Mg et de la charge virale TTV, seuls ou en combinaison, à prédire le risque de réactivation à CMVH ($\geq 3 \log_{10}$ UI/ml) dans la première année suivant la greffe chez le patient transplanté rénal R+. Cette étude (Quantic R+) observationnelle, multicentrique, nationale, prospective a été réalisée au sein du Centre National de Référence (CNR) des Herpèsvirus du CHU de Limoges, en collaboration avec les cliniciens et les virologues du groupe d'étude français sur le CMVH (centres participants : Limoges, Clermont-Ferrand, Grenoble, Reims, Rennes, Lille, Caen,

Nantes, Besançon). Les échantillons de 64 transplantés rénaux R+ ont été collectés entre 2013 et 2017. Un QF-CMV et une charge virale CMVH ont été effectués à chaque visite de suivi (J0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M8, M10, M12). Une charge virale TTV a été réalisée de manière rétrospective sur les échantillons. Les caractéristiques de performance du QF-Ag ou du QF-Mg ainsi que de la charge virale TTV (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative) ont été analysées. Afin d'optimiser la stratification du risque de réactivation à CMVH chez le patient transplanté rénal R+, des nouveaux seuils de positivité sont proposés pour ces marqueurs.

QuantiFERON®-CMV assay and Torque teno virus viremia in prediction of cytomegalovirus reactivation in R+ kidney transplant recipients.

I. INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) is the most common opportunistic viral infection and has a major impact on morbidity and mortality in solid organ transplant (SOT) recipients (39,155,156). Primary viral infection or reactivation of a latent CMV infection usually occurs in the first six months post-transplantation (155). CMV infection can result in both direct (CMV syndrome and tissue-invasive disease) and indirect effects (acute graft rejection, chronic graft failure, and opportunistic infections) (157). The incidence of CMV infection and CMV disease in SOT recipients depends on several factors, such as the CMV serological status of the donor (D) and the recipient (R), the type of organ transplant and the degree of immunosuppression (158). Current strategies for the prevention of CMV infection include prophylaxis (i.e., the use of antiviral drugs such as ganciclovir or valganciclovir during the 3–6 months post-transplantation) and pre-emptive therapy (i.e., the monitoring of CMV replication and administration of antiviral therapy solely in patients with CMV replication) (39). Preventive therapies have proven to be effective in reducing the risk of CMV infection and disease. Nevertheless, their widespread use is associated with significant side effects, especially neutropenia and nephrotoxicity. In addition, drug toxicity can lead to premature discontinuation of treatment or reduced doses, resulting in non-response to treatment or emergence of resistance.

Specific cell-mediated immunity (CMI) response represents an essential host factor in the control of CMV infection (1). In recent years, several reports have investigated the potential clinical application of monitoring CMV-specific cellular immunity to better stratify the risk of CMV infection among recipients (101,105,110,116,159,160). Various CMV-specific immune-based assays have been developed to assess CMV specific T-cell responses. Intracellular cytokine staining (ICS) by flow cytometry can measure both virus-specific CD4+ and CD8+ T-cells but lacks technical standardization and is labor- and resource-intensive (39). The development of standardized CMV immune assays such as CMV enzyme-linked immunospot (ELISpot) assays and QuantiFERON®-CMV (QF-CMV) test has facilitated the assessment of CMV cell-mediated immunity in routine diagnostic laboratories (160). Although

the ELISpot assay is highly sensitive, this assay cannot differentiate between CD4+ and CD8+ T-cell responses and requires PBMC isolation (39). The QF-CMV assay (Qiagen, Hilden, Germany) detects IFN- γ released in whole blood by CD8+ T-cells after *ex vivo* stimulation with a pool of 22 CMV short peptides presented by several human leukocyte antigen (HLA) class I haplotypes (99). This *in vitro* high-throughput diagnostic assay is simple to perform and has rapid turnaround times. Previous studies have demonstrated the potential utility of QF-CMV in assessing the risk of CMV infection or disease in SOT recipients (105,106,113,161–165). The QF-CMV assay appears to be a promising strategy to identify kidney transplant recipients (KTR) at highest risk of CMV infection or disease and, therefore, to tailor CMV prevention strategies to individual patients.

Torque teno viruses (TTV) viremia has also been proposed as a biomarker of functional immunity in the management of transplant patients (136,154). TTV, a member of the *Anelloviridae* family, is a small, single-stranded DNA virus and represents the most abundant virus of the human virome (138). Previous findings have shown that TTV viremia tends to be higher in patients with immunosuppression (134,142,166) and its predictive value for viral infections is under evaluation (151–153,167–170). It has also been identified as a potential rejection predictor (152,170–174) and a predictive marker of antibody response after COVID-19 vaccine in lung transplant recipients (175). Thus, monitoring TTV viremia could represent an additional diagnostic tool for predicting CMV reactivation.

We conducted this study to evaluate the ability of the QF-CMV and TTV load, alone or in combination, to predict CMV reactivation in CMV-seropositive (R+) KTR during the first post-transplant year. We analyzed separately the two markers of the QF-CMV assay to assess the impact of CMV-specific T-cell (QF-Ag) and overall T-cell (QF-Mg) responses. In addition, we determined QF-Ag, QF-Mg and TTV cut-off levels for risk stratification of CMV reactivation to guide optimal management of immunosuppressive drug doses in R+ KTR.

II. MATERIALS AND METHODS

II.1 Patient cohort and study design

The present multicenter, national, prospective cohort study, QuanticR+, was conducted from 2013 to 2017, involving 9 centers in France (Limoges, Clermont-Ferrand, Grenoble, Reims, Rennes, Lille, Caen, Nantes, and Besançon). A total of 73 CMV-seropositive patients (aged 18 years or older) who underwent kidney transplant were enrolled in this study. The protocol consisted of an inclusion visit on the day of transplantation (D0), and 8 follow-up visits: monthly for the first 6 months (M1, M2, M3, M4, M5, M6) and then every two months in the following 6 months (M8, M10, M12) post-transplant (Figure 1). 64 patients (88%) completed a one-year post-transplantation follow-up. Reasons for exclusion from the study included death (n=1), graft rejection (n=1), graft loss (n=2), unwillingness of the patient to continue periodic monitoring visits (n=2), and missing data (n=3). At each visit, the QF-CMV assay was performed and CMV-DNA load in the blood was quantified by real-time PCR. Clinical data were collected by means of Electronic Case Report Forms (eCRFs). Peripheral blood samples were stored at -80°C in the biological collection of the CHU Limoges (CRBioLim, authorization AC-2021-4790) authorized by the French Ministry of Health. TTV-DNA load in peripheral blood was retrospectively quantified at the National Reference Center.

This study was approved by the local institutional review board (approval number: I10 002) and the Ethical Committee (16/04/2012, CPP SOOM IV), and registered at ClinicalTrials.gov registry (number: NCT02064699).

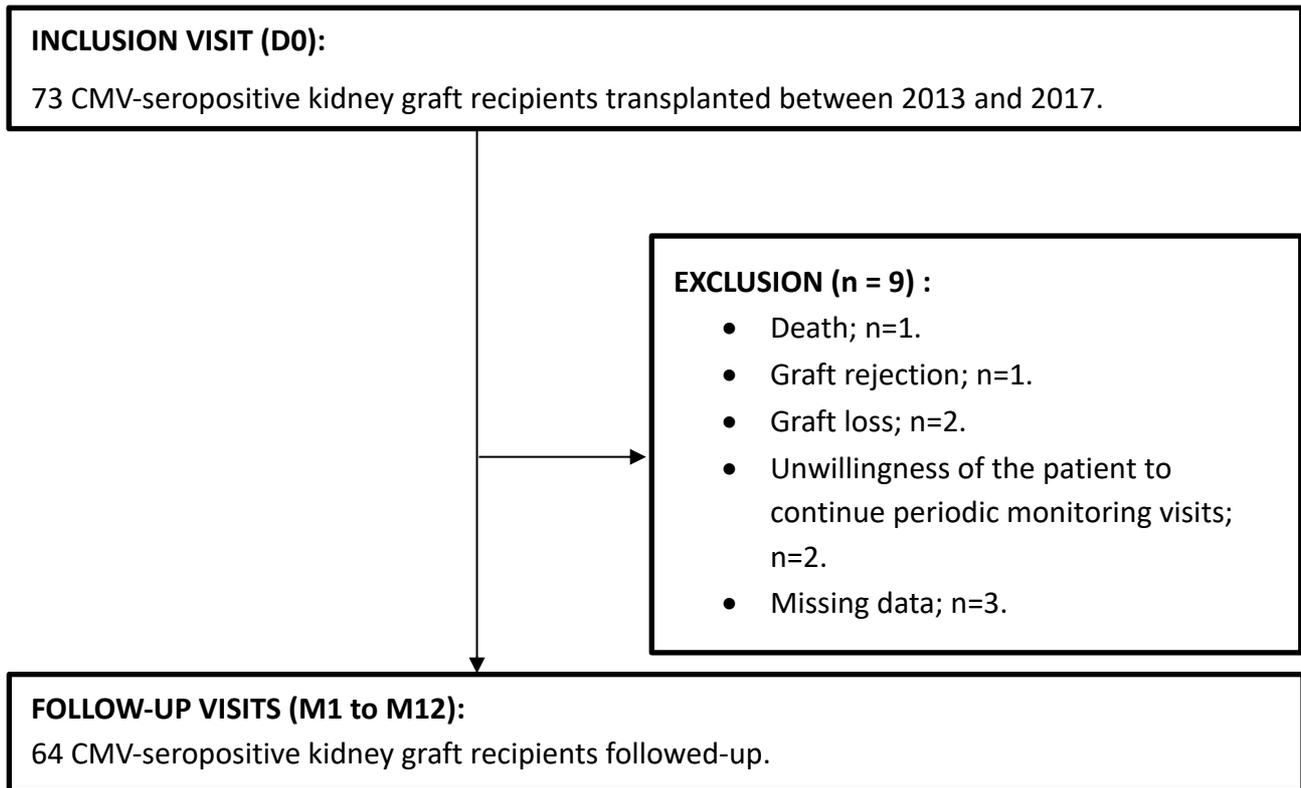


Fig 1. Flow chart of the QuanticR+ study participants.

II.2 CMV serostatus

Pre-transplant CMV serostatus was determined by the specific anti-CMV-IgG ELISA assay routinely used in each center's laboratory.

II.3 CMV viral load quantification

The CMV-DNA real time PCR assays were routinely performed in centers according to the corresponding laboratory procedures. All centers participated annually to the international Quality Control for Molecular Diagnosis (QCMD). Assays results were reported in International Units Per Milliliter (IU/ml) as per the international World Health Organization (WHO) standard. For the centers who did not use the IU, positive samples were controlled with the national reference center method (CMV R-GENE[®] kit, bioMérieux, France). CMV reactivation was defined as the presence of CMV-DNA level $\geq 3 \log_{10}$ IU/ml

II.4 QF-CMV assay

The QF-CMV assay (Qiagen, Hilden, Germany) was used in accordance with manufacturer's instructions. Briefly, 1 ml of whole blood was collected into each of the three QF-CMV collection tubes: a CMV-antigen tube (QF-Ag) containing a mix of 22 CMV CD8+ T-cell synthetic epitopes, a mitogen tube (QF-Mg) containing phytohemagglutinin and used as a positive control, and a nil control tube containing only heparin and used as a negative control. The tubes were incubated overnight at 37°C prior to centrifugation. Plasma levels of IFN- γ (IU/ml) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). As per manufacturer's interpretive criteria, an IFN- γ value of ≥ 0.2 IU/ml in the QF-Ag tube (after subtraction of the IFN- γ level of the nil tube) is considered as a reactive result. The result is non-reactive if the QF-Ag minus the nil response is < 0.2 IU/ml and the QF-Mg minus the nil response is > 0.5 IU/ml. The test is reported as indeterminate when the QF-Ag minus the nil response is < 0.2 IU/ml and the QF-Mg minus the nil response is < 0.5 IU/ml.

II.5 TTV load quantification

Quantification of TTV-DNA viral load from whole blood was performed using the TTV R-GENE[®] kit (bioMérieux, France), as specified by the manufacturer. Viral DNA was extracted from 200 μ L EDTA whole blood using an easyMAG extractor (bioMérieux, France) with 140 μ L of silica and a 50 μ L elution volume. 10 μ L of eluate was added to 15 μ L of ready-to-use amplification premix (TTV R-GENE[®] assay, bioMérieux, France). In each run, an internal control and four quantification standards were included. Amplification was performed according to manufacturer's instructions on CFX96[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-rad Hercules, CA, USA). The limit of detection was 2.4 log₁₀ copies/mL and the quantification range was between 2.4 to 9 log₁₀ copies/ml.

II.6 Statistical analyses

Statistical analyses were conducted by the CEBIMER of the CHU de Limoges using SAS Enterprise Guide software version 7.1, Cary NC, USA. The level of significant test was fixed with a p-value < 0.05 .

For descriptive analysis, continuous data were described as means \pm standard deviation (SD) or median with data range (minimum to maximum, interquartile range), depending on the data distribution. Categorical variables were reported as number of patients and its percentage. Differences between continuous variables were compared using the Mann-Whitney U test.

The performance of the QF-Ag or the QF-Mg and TTV viremia for detection of CMV reactivation was assessed by calculating sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV). Receiver operating characteristic (ROC) analyses were employed to determine optimal cut-off values of the QF-Ag, the QF-Mg and TTV viremia for predicting CMV reactivation.

Survival curves modeling freedom from CMV reactivation $\geq 3 \log_{10}$ IU/ml in the year post-transplant according to the result of the QF-Ag, the QF-Mg or TTV viremia were estimated using the Kaplan-Meier method. The log rank test was used to compare Kaplan-Meier survival curves.

The primary analysis was performed using manufacturer's QF-CMV cut-offs (QF-Ag < 0.2 IU/ml and QF-Mg < 0.5 IU/ml), and a TTV cut-off of 3.45 copies/ml that was previously identified by Maggi *et al.* at day 10 post-transplantation as a predictor of CMV viremia in the first 4 months post-transplantation (153). The secondary analysis was conducted with optimal cut-off levels determined by ROC curves. Since the QF-CMV assay cannot accurately measure IFN- γ values above 10 IU/ml, all values > 10 IU/ml were treated as 10 IU/ml for the analyses.

III. RESULTS

III.1. Demographic and clinical characteristics of patients

Baseline characteristics of the study patients are summarized in Table 1.

Table 1. Characteristics of CMV-seropositive kidney transplant recipients included in the study.

Characteristics	All (n=64)
Age (years; mean± SD [min; max])	54.4 ± 13.5 [25; 78]
Gender, n (%)	
Female	22 (34.4%)
Male	42 (65.6%)
1 st transplantation, n (%)	52 (81.3%)
CMV serology status, n (%)	
D ⁺ /R ⁺	28 (43.8%)
D ⁻ /R ⁺	36 (56.3%)
Antiviral prophylaxis treatment, n (%)	45 (70.3%)
Valganciclovir/Ganciclovir	43 (95.6%)
Valaciclovir	2 (4.4%)
Duration of antiviral prophylaxis (days; median [IQR])	103.5 [86; 147.5]

Abbreviations: SD, standard deviation; D, donor; R, recipient; IQR, interquartile range.

III.2. CMV reactivation

During the one-year follow-up, 19 out of 64 patients (29.7%) [95% CI: 18.9; 42.4] developed CMV viremia $\geq 3 \log_{10}$ IU/ml. Among the 45 patients who received prophylaxis, 13 developed CMV reactivation (28.9% [95% CI: 16.4; 44.3]). Median time to CMV reactivation in the cohort was 119 days [IQR: 63; 244] post-transplantation, consistent with discontinuation of antiviral prophylaxis.

III.3. The QF-CMV assay

III.3.1 Kinetics of the QF-CMV assay during the follow-up

The kinetics of CMV-specific CD8⁺ T-cell responses (QF-Ag) and global CD8⁺ T-cells responses (QF-Mg) in the overall population is shown in Figure 2.

At engraftment (J0), 85.7% of patients (54/63 patients) had a reactive QF-Ag. A strong decrease was observed in QF-Ag responses between D0 and M1 (D0: 5.4 IU/ml, M1: 3.9 IU/ml), followed by a plateau phase between M1 and M5, with mean values ranging from 3.9 IU/ml to 4.3 IU/ml and an increase after M5 (Figure 2.A).

Regarding the QF-Mg, 98.4% of patients (62/63) responded to mitogen at D0. After a substantial initial decline from baseline to M1 (D0: 8.4 IU/ml, M1: 4.4 IU/ml), the mean values increased until reaching 7.2 IU/ml at M4 and 6.8 IU/ml at M5 (Figure 2.C). Then, the QF-Mg values remained relatively stable between M6 and M12 (M6: 7.6 IU/ml, M8: 7.8 IU/ml, M10: 8.0 IU/ml, M12: 7.8 IU/ml).

Mean QF-Ag values were significantly lower from M1 to M6 in patients receiving prophylaxis compared to patients without prophylaxis (M1 $p=0.0112$, M2 $p=0.0459$, M3 $p=0.0057$, M4 $p=0.0053$, M5 $p=0.0377$, M6 $p=0.0404$; Mann-Whitney U test) (Figure 2.B). In addition, QF-Ag dynamics showed a first increase between M1 and M2 in patients without prophylaxis, while a first increase occurred only from M5 in the subgroup of patients with prophylaxis. Dynamic changes in QF-Mg values were broadly similar between subgroups of patients with and without prophylaxis (Figure 2.D). There was no statistically significant difference in QF-Mg values between patients with and without prophylaxis during the follow-up year ($p > 0.05$; Mann-Whitney U test).

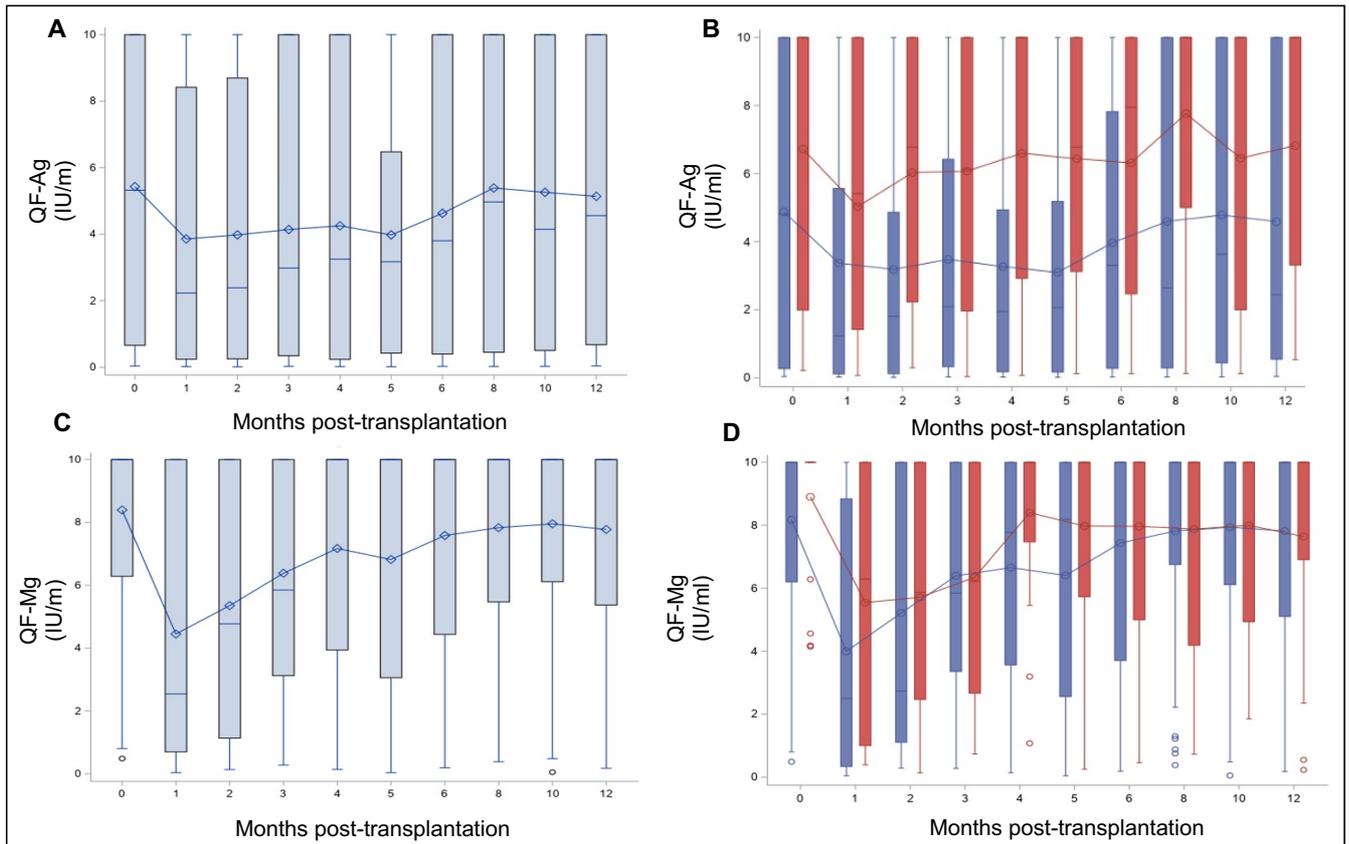


Figure 2. QF-CMV assay dynamics measured at transplantation (D0) and at month (M) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, and 12 after transplantation. The results are presented separately for the QF-Ag and the QF-Mg in the overall study population (A, C), and in the subgroups of patients with (blue curve) and without prophylaxis (red curve) at D0 (B, D). Mean values are displayed on the graph as points. Median values are represented by bars, and the interquartile range is represented by boxes.

III.3.2 QF-CMV assay and CMV reactivation

Figure 3 summarizes QF-Ag and QF-Mg kinetics in patients who experienced CMV reactivation during the one-year follow-up compared to those who had CMV viremia $< 3 \log_{10}$ IU/ml. Except at D0, mean QF-Ag values were lower in patients with CMV reactivation during the first 5 months after transplantation (Figure 3.A), although it failed to reach statistical significance ($p > 0.05$; Mann-Whitney U test). In patients with CMV reactivation, mean QF-Ag values gradually increased until reaching mean QF-Ag values of

patients without reactivation at M6. From M8 to M12, mean QF-Ag values tended to be higher in the subgroup of patients with CMV reactivation.

In the same way as for the QF-Ag, mean QF-Mg values at D0 were similar between patients with and without CMV reactivation. From M1 to M12, QF-Mg mean values were lower in patients with CMV reactivation, compared to patients without CMV reactivation (Figure 3.B). Of note, this trend approached the level of significance at M1, and achieved statistical significance between M2 and M5 (M1 $p=0.0501$, M2 $p=0.0009$, M3 $p=0.0496$, M4 $p=0.0019$, M5 $p=0.0312$; Mann-Whitney U test). In KTR without CMV reactivation, the QF-Mg kinetics revealed an increasing phase between M1 and M4, followed by a plateau phase until M12, while QF-Mg values increased progressively from M1 to M12 in patients with CMV reactivation.

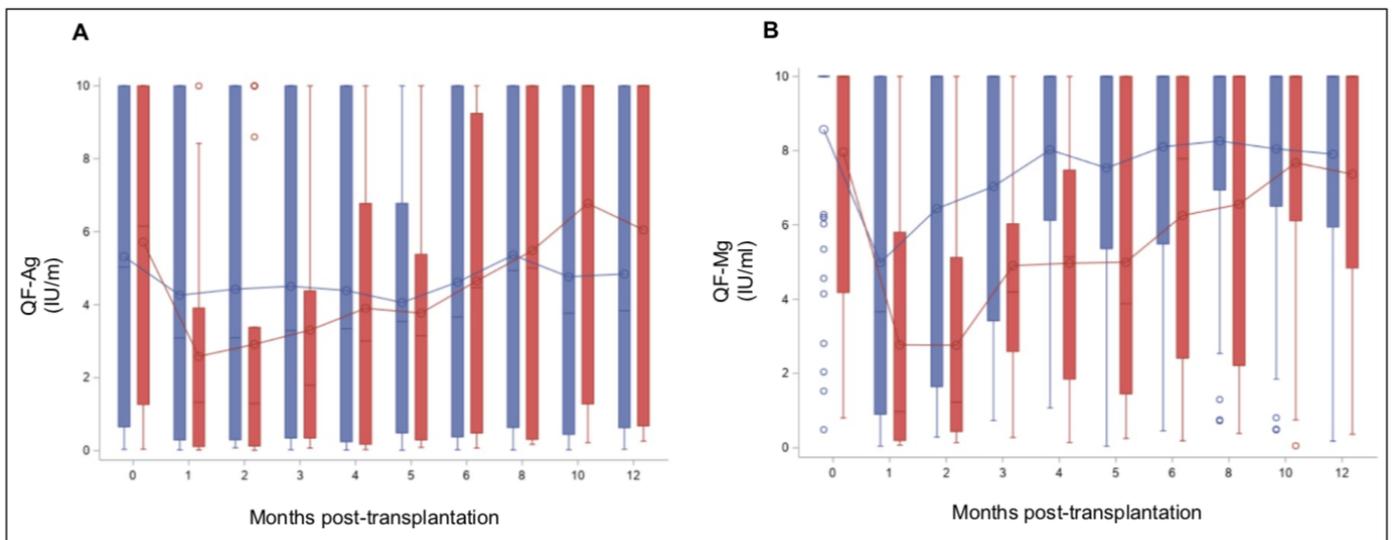


Figure 3. QF-CMV assay dynamics of all R+ KTR according to CMV reactivation.

QF-assay was measured at transplantation (D0) and at month (M) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, and 12 after transplantation. QF-Ag (A) and QF-Mg (B) kinetics are presented in the subgroups of patients with CMV reactivation $\geq 3 \log_{10}$ IU/ml (red curve) and without CMV reactivation (blue curve), as measured in the year post-transplant. Mean values are displayed on the graph as points. Median values are represented by bars, and the interquartile range is represented by boxes.

III.3.3 Diagnostic accuracy of the QF-Ag or the QF-Mg at M1 for predicting CMV reactivation

The performance of the QF-Ag < 0.2 IU/ml or the QF-Mg < 0.5 IU/ml (manufacturer's cut-offs) at M1 for predicting CMV reactivation within the following 3 months (M1-M4), 5 months (M1-M6), and 11 months (M1-M12) is shown in Table 2.

The sensitivity was no more than 30% for the QF-Ag (25% [95% CI: 3.2; 65.1] at M1-M4, 27.3% [95% CI: 6; 61] at M1-M6, and 28.6% [95% CI: 8.4; 58.1] at M1-M12) and less than 50% for the QF-Mg (37.5% [95% CI: 8.5; 75.5] at M1-M4, 45.5% [95% CI: 16.8; 76.6] at M1-M6, and 42.9% [95% CI: 17.7; 71.1] at M1-M12) (Table 2.A). In contrast, the two markers displayed better specificity with values of at least 78% for the QF-Ag (78% [95% CI: 64; 88.5] at M1-M4, 78.7% [95% CI: 64.3; 89.3] at M1-M6, and 79.5% [95% CI: 64.7; 90.2] at M1-M12) and ranging from 80% to 84.1% for the QF-Mg (80% [95% CI: 66.3; 90] at M1-M4, 83% [95% CI: 69.2; 92.4] at M1-M6, and 84.1% [95% CI: 69.9; 93.4] at M1-M12). The QF-Ag allowed the identification of at least 77% of patients without CMV reactivation during the one-year follow-up (NPV: 86.7% [95% CI: 73.2; 95] at M1-M4, 82.2% [95% CI: 68; 92] at M1-M6, and 77.8% [95% CI: 62.9; 88.8] at M1-M12). Likewise, the QF-Mg displayed excellent NPV (88.9% [95% CI: 76; 96.3] at M1-M4, 86.7% [95% CI: 73.2; 95] at M1-M6, and 82.2% [95% CI: 67.9; 92.0] at M1-M12). However, PPV of the QF-Ag were 15.4% [95% CI: 1.9; 45.4] at M1-M4, 23.1% [95% CI: 5; 53.8] at M1-M6, and 30.8% [95% CI: 9.1; 61.4] at M1-M12. Similarly, low PPV were obtained for the QF-Mg (23.1% [95% CI: 5; 53.8] at M1-M4, 38.5% [95% CI: 13.9; 68.4] at M1-M6 and 46.1% [95% CI: 19.2; 74.9] at M1-M12).

Receiving operator curve (ROC) analyses were used to define QF-Ag and QF-Mg cut-offs at M1 that would best discriminate patients with and without subsequent CMV reactivation (Supplementary Figure 1). For the QF-Ag at M1, the optimal cut-offs were determined to be 2.23 IU/ml (Area under the curve, AUC=0.53), 9.12 IU/ml (AUC=0.56) and 2.48 IU/ml (AUC=0.61) to predict CMV reactivation at M1-M4, M1-M6 and M1-M12, respectively. The optimal QF-Mg cut-offs at M1 were found to be 1.29 IU/ml (AUC=0.61), 1.29 IU/ml (AUC=0.69) and 1.27 IU/ml (AUC=0.69) for predicting CMV reactivation at M1-M4, M1-M6, and M1-M12, respectively.

By using these optimized cut-offs, higher sensitivities were obtained with values ranging from 62.5% to 90.9% for the QF-Ag (62.5% [95% CI: 24.5; 91.5] at M1-M4, 90.9% [95% CI: 58.7; 99.8] at M1-M6, and 71.4% [95% CI: 41.9; 91.6] at M1-M12), and ranging from 62.5% to 72.7% for the QF-Mg (62.5% [95% CI: 24.5; 91.5] at M1-M4, 72.7% [95% CI: 39; 94] at M1-M6, and 64.3% [95% CI: 35.1; 87.2] at M1-M12) (Table 2.B). For the QF-Ag, specificity values were 52% [95% CI: 37.4; 66.3] at M1-M4, 27.7% [95% CI: 15.6; 42.6] at M1-M6, and 54.5% [95% CI: 38.8; 69.6] at M1-M12). For the QF-Mg, we obtained specificity values of 68% [95% CI: 53.3; 80.5] at M1-M4, 72.3% [95% CI: 57.4; 84.4] at M1-M6, and 72.7% [95% CI: 57.2; 85.0] at M1-M12. A slighter increase of NPV was obtained when using optimized cut-offs. The QF-Ag exhibited NPV of 89.7% [95% CI: 72.7; 97.8] at M1-M4, 92.9% [95% CI: 66.1; 99.8] at M1-M6, and 85.7% [95% CI: 67.3; 95.6] at M1-M12). For the QF-Mg, NPV were at least of 86.5% (91.9% [95% CI: 78.1; 98.3] at M1-M4 or M1-M6, and 86.5% [95% CI: 71.2; 95.5] at M1-M12. Similarly, PPV were lower than NPV and not improved by cut-off changes. For the QF-Ag, PPV were 17.2% [95% CI: 5.8; 35.8] at M1-M4, 22.7% [95% CI: 11.5; 37.8] at M1-M6, and 33.3% [95% CI: 17.3; 52.8] at M1-M12. For the QF-Mg, PPV were 23.8% [95% CI: 8.2; 47.2] at M1-M4, 38.1% [95% CI: 18.1; 61.6] at M1-M6, and 42.9% [95% CI: 21.8; 66.0] at M1-M12.

Table 2. Diagnostic performance of the QF-Ag or the QF-Mg at M1 using manufacturer’s cut-offs (A) or optimal cut-offs determined by ROC curves (B) for predicting CMV reactivation in the R+ KTR cohort.

A.

Time point	CMV reactivation	Cut-off (IU/ml)	Sensitivity % [95% CI]	Specificity % [95% CI]	PPV % [95% CI]	NPV % [95% CI]
M1	M1-M4		25 [3.2; 65.1]	78 [64; 88.5]	15.4 [1.9; 45.4]	86.7 [73.2; 95]
M1	M1-M6	QF-Ag < 0.2	27.3 [6; 61]	78.7 [64.3; 89.3]	23.1 [5; 53.8]	82.2 [68; 92]
M1	M1-M12		28.6 [8.4; 58.1]	79.5 [64.7; 90.2]	30.8 [9.1; 61.4]	77.8 [62.9; 88.8]
M1	M1-M4		37.5 [8.5; 75.5]	80 [66.3; 90]	23.1 [5; 53.8]	88.9 [76; 96.3]
M1	M1-M6	QF-Mg < 0.5	45.5 [16.8; 76.6]	83 [69.2; 92.4]	38.5 [13.9; 68.4]	86.7 [73.2; 95]
M1	M1-M12		42.9 [17.7; 71.1]	84.1 [69.9; 93.4]	46.1 [19.2; 74.9]	82.2 [67.9; 92.0]

B.

Time point	CMV reactivation	Cut-off (IU/ml)	Sensitivity % [95% CI]	Specificity % [95% CI]	PPV % [95% CI]	NPV % [95% CI]
M1	M1-M4	QF-Ag < 2.23	62.5 [24.5; 91.5]	52 [37.4; 66.3]	17.2 [5.8; 35.8]	89.7 [72.7; 97.8]
M1	M1-M6	QF-Ag < 9.12	90.9 [58.7; 99.8]	27.7 [15.6; 42.6]	22.7 [11.5; 37.8]	92.9 [66.1; 99.8]
M1	M1-M12	QF-Ag ≤ 2.48	71.4 [41.9; 91.6]	54.5 [38.8; 69.6]	33.3 [17.3; 52.8]	85.7 [67.3; 95.6]
M1	M1-M4	QF-Mg < 1.29	62.5 [24.5; 91.5]	68 [53.3; 80.5]	23.8 [8.2; 47.2]	91.9 [78.1; 98.3]
M1	M1-M6	QF-Mg < 1.29	72.7 [39; 94]	72.3 [57.4; 84.4]	38.1 [18.1; 61.6]	91.9 [78.1; 98.3]
M1	M1-M12	QF-Mg ≤ 1.27	64.3 [35.1; 87.2]	72.7 [57.2; 85.0]	42.9 [21.8; 66.0]	86.5 [71.2; 95.5]

Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI, confidence interval.

III.3.4 Kaplan-Meier survival analyses

Subsequently, we investigated the cumulative incidence of CMV reactivation in the year post-transplant according to the result of the QF-CMV. The analysis was performed separately for the QF-Ag and the QF-Mg using manufacturer's cut-offs (0.2 IU/ml and 0.5 IU/ml, respectively) and optimal cut-off determined by ROC curves (2.48 IU/ml and 1.27 IU/ml, respectively).

Using the 0.2 IU/ml cut-off, no significant differences in CMV infection-free survival at M12 were observed between patients with a reactive and a non-reactive QF-Ag at M1 (76.7% [95% CI: 60.8; 86.8] versus 69.2% [95% CI: 37.3; 87.1], respectively) (Figure 4.A). Likewise, we did not observe a significant difference in CMV infection-free survival at M12 using the 2.48 IU/ml cut-off (85.6% [95% CI: 66.0; 94.3] versus 65.4% [95% CI: 45.0; 79.8], respectively) (Figure 4.B).

Conversely, Kaplan-Meier analysis revealed a significant difference in CMV infection-free survival at M12 between patients with a reactive and a non-reactive QF-Mg at M1 (80.9% [95% CI: 65.2; 90.0] versus 53.8% [95% CI: 24.8; 76.0], respectively) using the 0.5 IU/ml cut-off (Figure 4.C). Stronger differences between patients with a reactive and a non-reactive QF-Mg at M1 were observed using the 1.27 IU/ml cut-off (84.8% [95% CI: 67.0; 93.5] versus 57.1% [95% CI: 33.8; 74.9], respectively) (Figure 4.D).

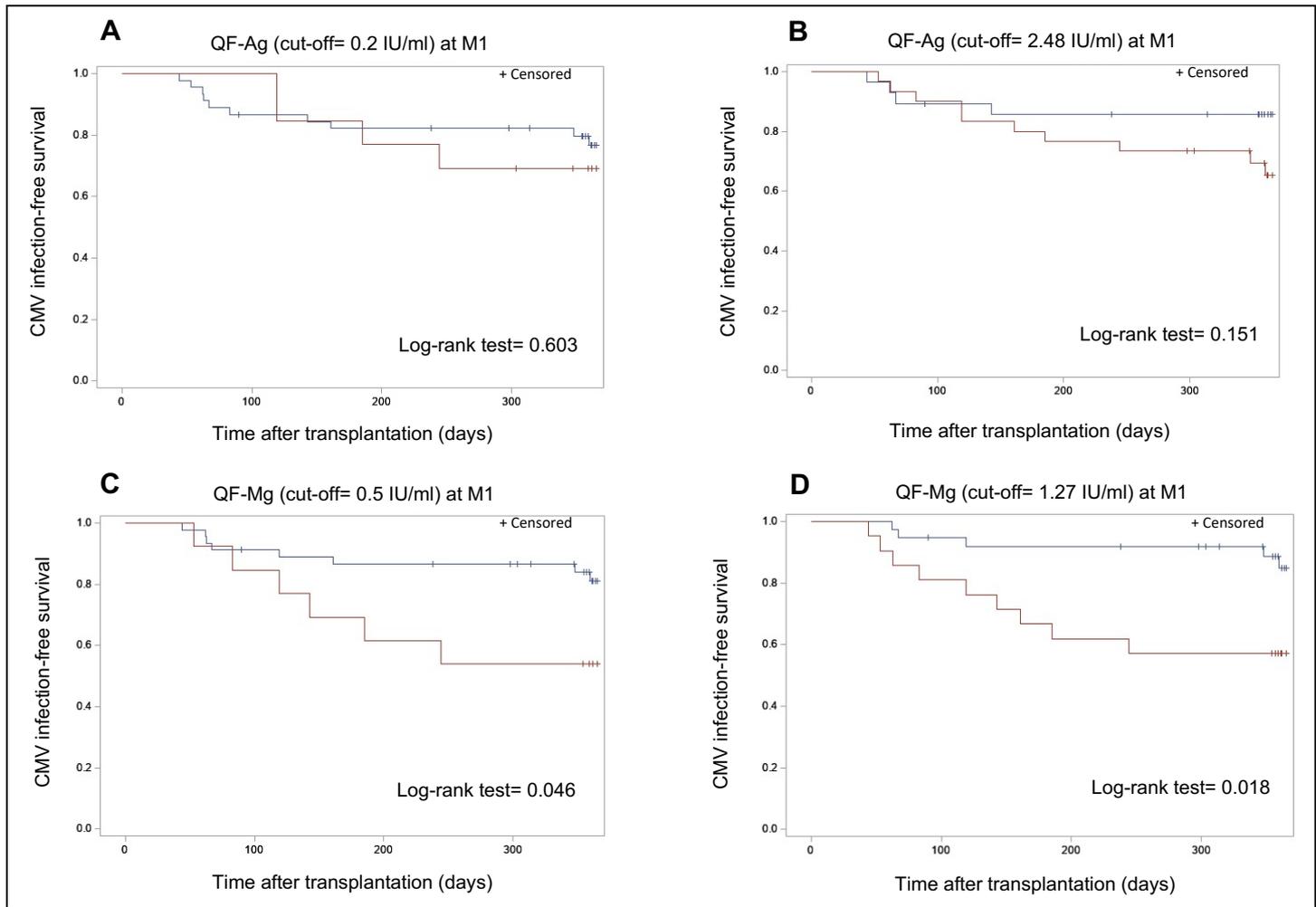


Figure 4. Kaplan-Meier survival curves modeling freedom from CMV reactivation from M1 to M12 for patients according to the result of the QF-CMV at M1. The results are presented for the manufacturer’s QF-Ag cut-off (A), the optimal QF-Ag cut-off determined by ROC curves (B), the manufacturer’s QF-Mg cut-off (C), and the optimal QF-Mg cut-off determined by ROC curves (D). Blue curves indicate QF-CMV results above the cut-off value while red curves indicate QF-CMV results below the cut-off value.

III.4 TTV-DNA viral load

III.4.1 TTV load prevalence and dynamics

TTV-DNA viremia $\geq 3.45 \log_{10}$ copies/ml was detected in 44.1% of KTR at D0. TTV load kinetics showed an increasing phase from D0 (D0 mean TTV load: $2.6 \log_{10}$ copies/ml) to M3 (M3 mean TTV load: $6.5 \log_{10}$ copies/ml) (Figure 5.A). After reaching a peak at M3, TTV load gradually decreased up to M12 (M12 mean TTV load: $4.5 \log_{10}$ copies/ml).

TTV load kinetics were similar between subgroups of patients with and without prophylaxis (Figure 5.B). No statistically significant differences in TTV load values at each time point were noted between these subgroups of patient ($p > 0.05$; Mann-Whitney U test), except at M2 ($p=0.0070$; Mann-Whitney U test).

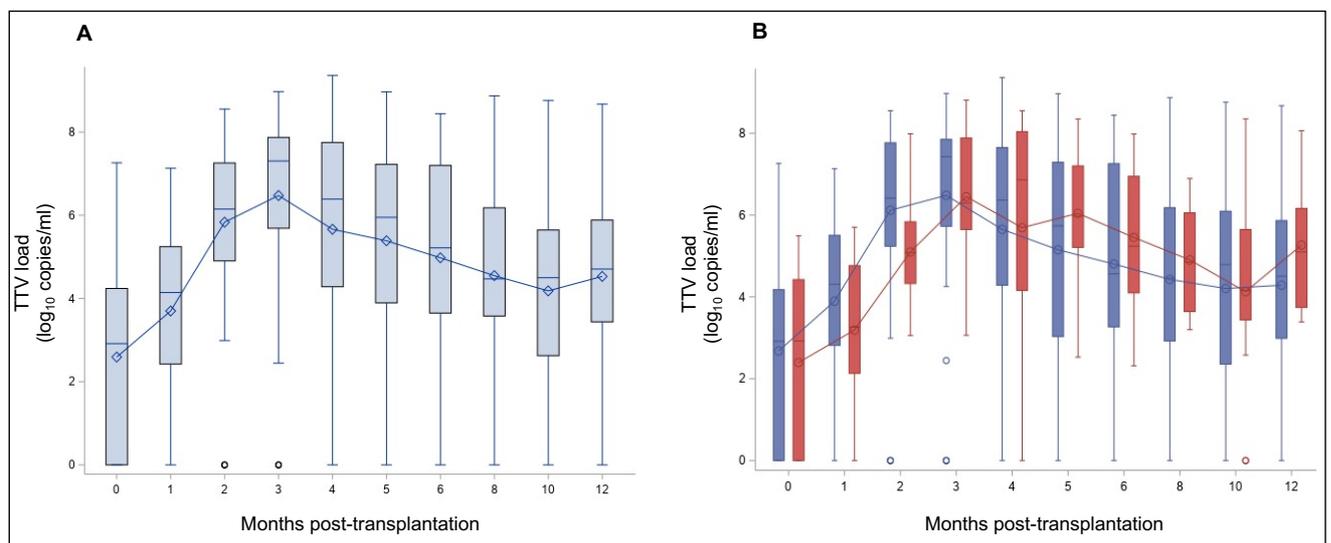


Figure 5. TTV load dynamics measured at transplantation (D0) and at month (M) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, and 12 after transplantation. The results are presented in the overall study population (A), and in the subgroups of patients with (blue curve) and without prophylaxis (red curve) at D0 (B). Mean values are displayed on the graph as points. Median values are represented by bars, and the interquartile range is represented by boxes.

III.4.2 TTV load and CMV reactivation

Dynamics of TTV DNAemia showed similar profiles in R+ KTR with and without CMV reactivation in the one-year follow-up (Figure 6). Patients with CMV reactivation had higher levels of TTV compared to patients without reactivation during the overall observation period. The observed difference between the subgroups of patients was statistically significant at M1 ($p=0.0297$), M6 ($p=0.0424$), M10 ($p=0.0207$) and M12 ($p=0.0488$) (Mann-Whitney U test).

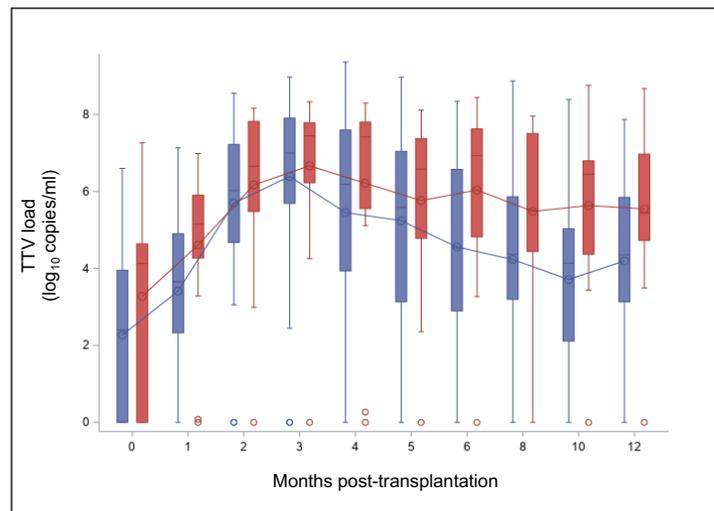


Figure 6. TTV load dynamics of all R+ KTR according to CMV reactivation.

TTV load was measured at transplantation (D0) and at month (M) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, and 12 after transplantation. TTV kinetics is presented in the subgroups of patients with CMV reactivation $\geq 3 \log_{10}$ IU/ml (red curve) and without CMV reactivation (blue curve) in the year post-transplant. Mean values are displayed on the graph as points. Median values are represented by bars, and the interquartile range is represented by boxes.

III.4.3 Diagnostic accuracy of TTV load at D0 and M1 for predicting CMV reactivation

The potential of peripheral TTV load at D0 and M1 was evaluated for risk stratification of CMV reactivation using the cut-off proposed by Maggi *et al.* ($3.45 \log_{10}$ copies/ml) (Table 3).

TTV load $\geq 3.45 \log_{10}$ copies/ml at D0 was predictive of CMV reactivation between D0 and M12 with a sensitivity of 63.2% [95% CI: 38.4; 83.7], a specificity of 65.0% [95% CI: 48.3; 79.4], a PPV of 46.2% [95% CI: 26.6; 66.6], and a NPV of

78.8% [95% CI: 61.1; 91.0] (Table 3.A). TTV load $\geq 3.45 \log_{10}$ copies/ml at M1 demonstrated a sensitivity of 78.6% [95% CI: 49.2; 95.3], a specificity of 50.0% [95% CI: 34.6; 65.4], a PPV of 33.3% [95% CI: 18.0; 51.8], and a NPV of 88.0% [95% CI: 68.8; 97.5] for the prediction of CMV reactivation between M1 and M12 (Table 3.A).

According to ROC curve analyses, we established at $3.78 \log_{10}$ copies/ml the optimal TTV cut-off at D0 to predict CMV reactivation between D0 and M12 (AUC=0.65) (Supplementary Figure 2), with a sensitivity of 63.2% [95% CI: 38.4; 83.7], a specificity of 72.5% [95% CI: 56.1; 85.4], a PPV of 52.2% [95% CI: 30.6; 73.2], and a NPV of 80.6% [95% CI: 64.0; 91.8] (Table 3.B). The optimal TTV cut-off at M1 for the prediction of CMV reactivation between M1 and M12 was defined at $> 4.26 \log_{10}$ copies/ml (AUC=0.70) (Supplementary Figure 2). It corresponded to a sensitivity of 78.6% [95% CI: 49.2; 95.3], a specificity of 61.4% [95% CI: 45.5; 75.6], a PPV of 39.2% [95% CI: 21.5; 59.4], and a NPV of 90.0% [95% CI: 73.5; 97.9] (Table 3.B).

Dynamic changes in TTV levels between D0 and M1 were also assessed as a predictor of CMV reactivation between M1 to M12 (Supplementary Figure 2). An increase of at least $0.75 \log_{10}$ copies/ml from D0 to M1 (AUC=0.60) was found to be predictive of CMV reactivation between M1 and M12 with a sensitivity of 78.6% [95% CI: 49.2; 95.3], a specificity of 48.7% [95% CI: 32.4; 65.2], a PPV of 35.5% [95% CI: 35.5; 19.2], and a NPV of 86.4% [95% CI: 65.1; 97.1] (Table 3.B).

Table 3. Diagnostic performance of TTV load using the previously determined cut-off ($\geq 3.45 \log_{10}$ copies/ml) (A) or optimal cut-off values determined by ROC curves (B) for the prediction of CMV reactivation in R+ KTR.

A.

Time point	CMV reactivation	Cut-off (\log_{10} copies/ml)	Sensitivity % [95% CI]	Specificity % [95% CI]	PPV % [95% CI]	NPV % [95% CI]
D0	D0-M12	≥ 3.45	63.2 [38.4; 83.7]	65.0 [48.3; 79.4]	46.2 [26.6; 66.6]	78.8 [61.1; 91.0]
M1	M1-M12		78.6 [49.2; 95.3]	50.0 [34.6; 65.4]	33.3 [18.0; 51.8]	88.0 [68.8; 97.5]

B.

Time point	CMV reactivation	Cut-off (log ₁₀ copies/ml)	Sensitivity % [95% CI]	Specificity % [95% CI]	PPV % [95% CI]	NPV % [95% CI]
D0	D0-M12	> 3.78	63.2 [38.4; 83.7]	72.5 [56.1; 85.4]	52.2 [30.6; 73.2]	80.6 [64.0; 91.8]
M1	M1-M12	> 4.26	78.6 [49.2; 95.3]	61.4 [45.5; 75.6]	39.2 [21.5; 59.4]	90.0 [73.5; 97.9]
D0 to M1	M1-M12	> 0.75	78.6 [49.2; 95.3]	48.7 [32.4; 65.2]	35.5 [35.5; 19.2]	86.4 [65.1; 97.1]

Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI, confidence interval.

III.4.5 Kaplan-Meier survival analyses

The cumulative incidence of CMV reactivation in the year post-transplant according to the result of TTV load is shown in Figure 7. The analysis was performed using the TTV cut-off proposed by Maggi *et al.* (3.45 log₁₀ copies/ml) at D0 and M1, the optimal TTV cut-offs determined by ROC curves (3.78 log₁₀ copies/ml at D0 and 4.26 log₁₀ copies/ml at M1), and the optimal increase in TTV levels between D0 and M1 (0.75 log₁₀ copies/ml).

By using the TTV cut-off of 3.45 log₁₀ copies/ml, no significant differences in CMV infection-free survival at M12 were observed between patients with a positive and a negative TTV load at D0 (53.7% [95% CI: 31.4; 71.6] versus 78.8% [95% CI: 38.4; 83.7], respectively) or at M1 (64.6% [95% CI: 44.9; 78.7] versus 88.0% [95% CI: 67.3; 96.0], respectively). (Figures 7.A and 7.B). Thus, a TTV load \geq 3.45 log₁₀ copies/ml at D0 or M1 does not predict a significantly higher risk of CMV reactivation than a TTV load < 3.45 log₁₀ copies/ml in our R+ KTR cohort.

By using the TTV cut-off of 3.78 log₁₀ copies/ml, Kaplan-Meier analysis revealed a significant difference in CMV infection-free survival at M12 between patients with a positive and a negative TTV load at D0 (47.2% [95% CI: 24.4; 67.0] versus 80.6% [95% CI: 63.5; 90.2], respectively) (Figure 7.C). With a TTV cut-off of 4.26 log₁₀ copies/ml, a significant difference in CMV infection-free survival at M12 between patients with a positive and a negative TTV load at M1 was also obtained (57.5% [95% CI: 35.9; 74.1] versus 90.0% [95% CI: 72.1; 96.7], respectively) (Figure 7.D). In our R+ KTR cohort, a TTV viremia > 3.78 log₁₀ copies/ml at D0 or

> 4.26 log₁₀ copies/ml at M1 therefore predicts a significantly higher risk of CMV reactivation than a TTV viremia below these respective cut-offs at D0 or M1.

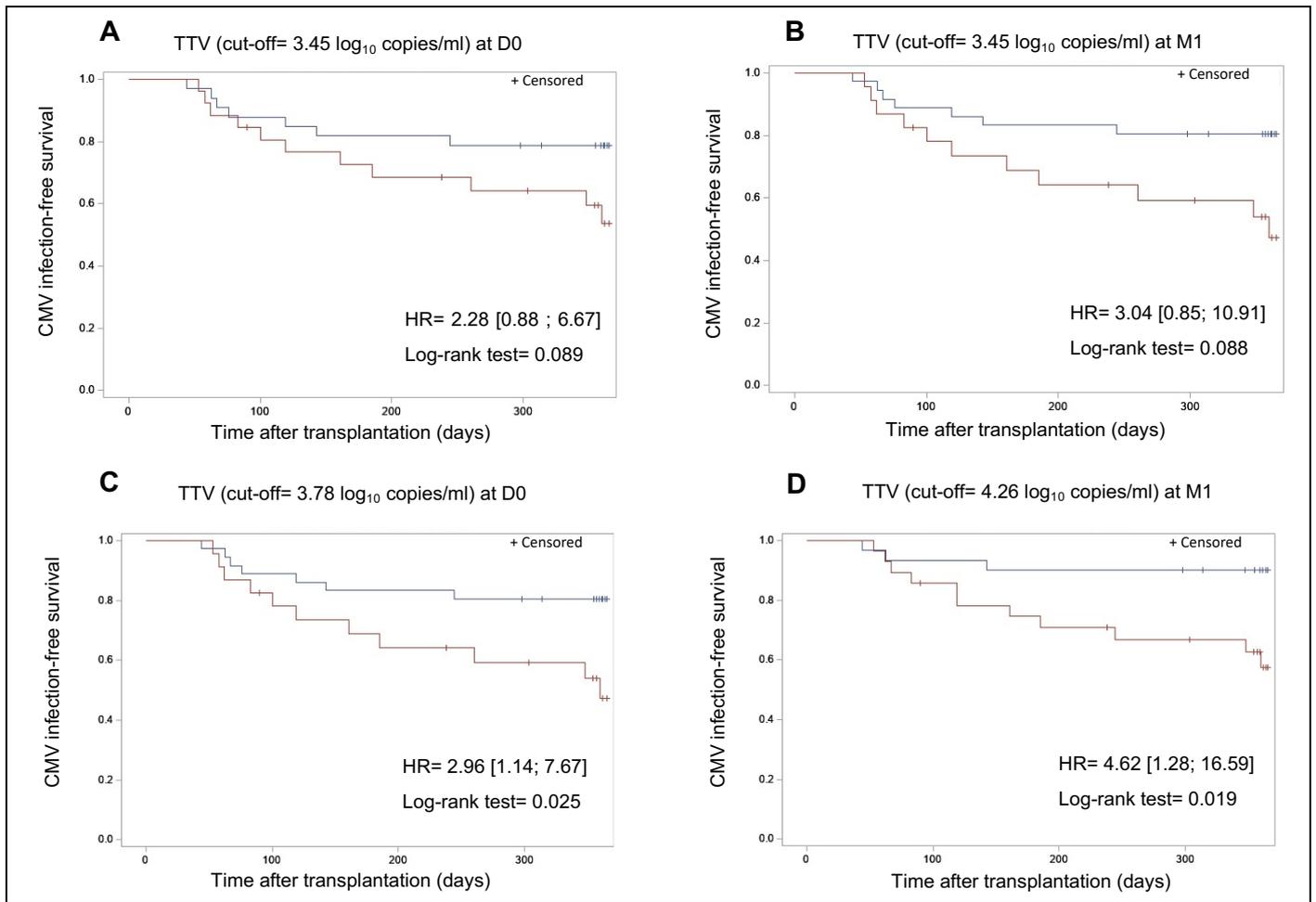


Figure 7. Kaplan-Meier survival curves modeling freedom from CMV reactivation through day +360 post-transplant. The results are presented according to the TTV cut-off of 3.45 log₁₀ copies/ml at D0 (A), the TTV cut-off of 3.45 log₁₀ copies/ml at M1 (B), the optimal TTV cut-off at D0 determined by ROC curves (3.78 log₁₀ copies/ml) (C) and the optimal TTV cut-off at M1 as defined by ROC curves (4.26 log₁₀ copies/ml) (D). Red curves indicate TTV load above the cut-off while blue curves indicate TTV load below the cut-off.

No significant differences in CMV infection-free survival at M12 were observed between patients with an increase in TTV levels of at least 0.75 log₁₀ copies/ml from D0 to M1 and the remaining group (53.7% [95% CI: 31.4; 71.6] versus 78.8% [95% CI: 60.6; 89.3], respectively) (Figure 8). Thus, an increase in TTV levels of at least 0.75 log₁₀ copies/ml from D0

to M1 does not predict a significantly higher risk of CMV reactivation than a TTV dynamic change below this cut-off in our R+ KTR cohort.

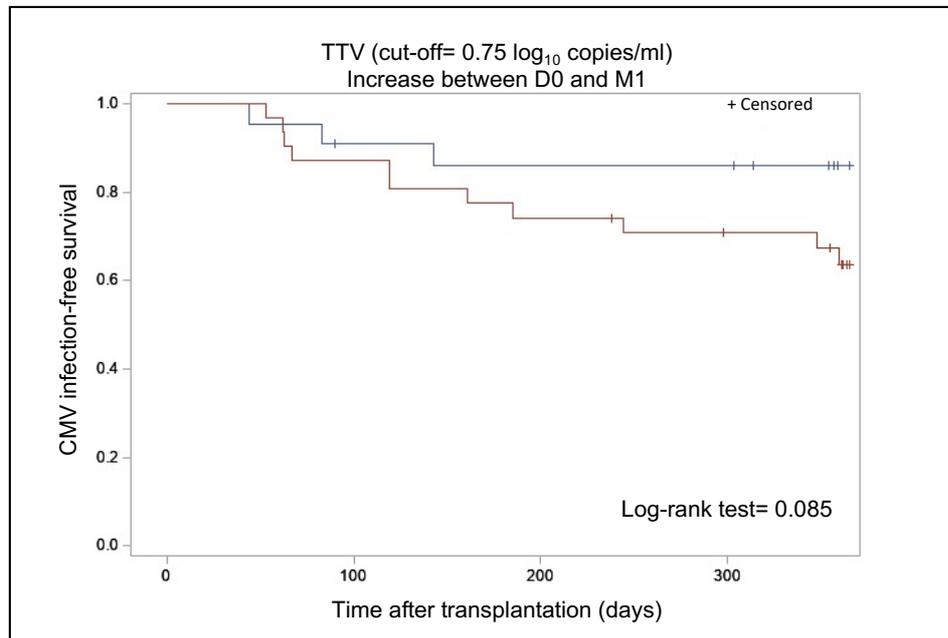


Figure 8. Kaplan-Meier survival curves modeling freedom from CMV reactivation through day +360 post-transplant. The results are presented according to the dynamic change in TTV levels between D0 and M1. The red curve indicates an increase in TTV levels $> 0.75 \log_{10}$ copies/ml while the blue curve indicates a TTV dynamic change below this value.

III.5 Combination of the QF-Ag or the QF-Mg and TTV-DNA load

The combination of the QF-Ag < 0.2 IU/ml and TTV load $\geq 3.45 \log_{10}$ copies/ml at M1 was assessed for the prediction of CMV reactivation within the following 3 months (M1-M4), 5 months (M1-M6), and 11 months (M1-M12) in R+ KTR (Table 4.A). Sensitivity was at least of 72.7% (75% [95% CI: 34.9; 96.8] at M1-M4, 72.7% [95% CI: 39.0; 94.0] at M1-M6, and 78.6% [95% CI: 49.2; 95.3] at M1-M12), while specificity was about 40% (38% [95% CI: 24.6; 52.8] at M1-M4, 38.3% [95% CI: 24.5; 53.6] at M1-M6, and 40.9% [95% CI: 26.3; 56.7] at M1-M12). NPV were 90.5% [95% CI: 69.6; 98.8] at M1-M4, and 85.7% [95% CI: 63.7; 97] at M1-M6 or at M1-M12. PPV were only 16.2% [95% CI: 6.2; 32.0], 21.6% [95% CI: 9.8; 38.2] and 29.7% [95% CI: 15.9; 47.0] at M1-M4, M1-M6, and M1-M12, respectively.

The combination of the QF-Mg < 0.5 IU/ml and TTV load $\geq 3.45 \log_{10}$ copies/ml at M1 for detection of CMV reactivation was also analyzed (Table 4.A). It demonstrated sensitivity of 75% [95% CI: 34.9; 96.8] at M1-M4, 81.8% [95% CI: 48.2; 97.7] at M1-M6, and 85.7% [95% CI: 57.2; 98.2] at M1-M12. Specificity was 36% [95% CI: 22.9; 50.8] at M1-M4, 38.3% [95% CI: 11.4; 40.2] at M1-M6, and 40.9% [95% CI: 26.3; 56.7] at M1-M12. The QF-Mg < 0.5 IU/ml in combination with TTV load $\geq 3.45 \log_{10}$ copies/ml at M1 exhibited excellent NPV with a value of 90% [95% CI: 68.3; 98.8] within the following 3 months, 5 months or 11 months. PPV were low (15.8% [95% CI: 6.0; 31.2] at M1-M4, 23.7% [95% CI: 24.5; 53.6] at M1-M6, and 31.6% [95% CI: 17.5; 48.6] at M1-M12).

The diagnostic accuracy of the QF-Ag or the QF-Mg and TTV load at M1 using optimized cut-off values showed same trends (Table 4.B). The QF-Ag analyzed in combination with TTV load demonstrated high sensitivity (87.5% [95% CI: 47.3; 99.7] at M1-M4, 90.9% [95% CI: 58.7; 99.8] at M1-M6, and 85.7% [95% CI: 57.2; 98.2] at M1-M12), and high NPV (92.9% [95% CI: 66.1; 99.8] at M1-M4, 85.7% [95% CI: 42.1; 99.6] at M1-M6, and 85.7% [95% CI: 57.2; 98.2] at M1-M12). However, the combination had poor specificity with values of 26.5% [95% CI: 14.9; 41.1] at M1-M4, 12.8% [95% CI: 4.8; 25.7] at M1-M6, and 27.9% [95% CI: 15.3; 43.7] at M1-M12. PPV remained below 30% (16.3% [95% CI: 6.8; 30.7] at M1-M4, 19.6% [95% CI: 9.8; 33.1] at M1-M6, and 27.9% [95% CI: 15.3; 43.7] at M1-M12). For the QF-Mg combined with TTV load, it showed a sensitivity of 100% at M1-M4, 72.7% [95% CI: 39.0; 94.0] at M1-M6, and 100% [95% CI: 78.2; 100] at M1-M12. Specificity of the combination was lower, (36% [95% CI: 22.9; 50.8] at M1-M4, 33.3% [95% CI: 20.4; 48.4] at M1-M6, and 40.9% [95% CI: 26.3; 56.8]). High NPV were obtained, with values reaching 100% (100% [95% CI: 81.5; 100] at M1-M4, 84.2% [95% CI: 60.4; 96.6] at M1-M6, and 100% [95% CI: 81.5; 100] at M1-M12). PPV were 20% [95% CI: 9.0; 35.6] at M1-M4 or M1-M6, and 35% [95% CI: 20.6; 51.7] at M1-M12.

Table 4. Diagnostic performance of the QF-Ag or QF-Mg and TTV load analyzed in combination at M1 for the prediction of CMV reactivation in R+ KTR. The diagnostic accuracy of the combination of markers was assessed using QF-CMV manufacturer’s cut-offs and the previously determined TTV cut-offs (A), or the optimal QF-CMV and TTV cut-offs determined by ROC curves (B).

A.

Time point	CMV reactivation	Cut-off (QF-CMV: IU/ml, TTV: log ₁₀ copies/ml)	Sensitivity % [95% CI]	Specificity % [95% CI]	PPV % [95% CI]	NPV % [95% CI]
M1	M1-M4		75 [34.9; 96.8]	38 [24.6; 52.8]	16.2 [6.2; 32.0]	90.5 [69.6; 98.8]
M1	M1-M6	QF-Ag < 0.2 and TTV ≥ 3.45	72.7 [39.0; 94.0]	38.3 [24.5; 53.6]	21.6 [9.8; 38.2]	85.7 [63.7; 96.9]
M1	M1-M12		78.6 [49.2; 95.3]	40.9 [26.3; 56.7]	29.7 [15.9; 47.0]	85.7 [63.7; 97]
M1	M1-M4		75 [34.9; 96.8]	36 [22.9; 50.8]	15.8 [6.0; 31.2]	90 [68.3; 98.8]
M1	M1-M6	QF-Mg < 0.5 and TTV ≥ 3.45	81.8 [48.2; 97.7]	38.3 [11.4; 40.2]	23.7 [24.5; 53.6]	90 [68.3; 98.8]
M1	M1-M12		85.7 [57.2; 98.2]	40.9 [26.3; 56.7]	31.6 [17.5; 48.6]	90 [68.3; 98.8]

B.

Time point	CMV reactivation	Cut-off (QF-CMV: IU/ml, TTV: log ₁₀ copies/ml)	Sensitivity % [95% CI]	Specificity % [95% CI]	PPV % [95% CI]	NPV % [95% CI]
M1	M1-M4	QF-Ag < 2.23 and TTV ≥ 4.26	87.5 [47.3; 99.7]	26.5 [14.9; 41.1]	16.3 [6.8; 30.7]	92.9 [66.1; 99.8]
M1	M1-M6	QF-Ag < 9.12 and TTV ≥ 4.26	90.9 [58.7; 99.8]	12.8 [4.8; 25.7]	19.6 [9.8; 33.1]	85.7 [42.1; 99.6]
M1	M1-M12	QF-Ag ≤ 2.48 and TTV ≥ 4.26	85.7 [57.2; 98.2]	27.9 [15.3; 43.7]	27.9 [15.3; 43.7]	85.7 [57.2; 98.2]
M1	M1-M4	QF-Mg < 1.29 and TTV ≥ 4.26	100 [63.1; 100]	36 [22.9; 50.8]	20 [9.0; 35.6]	100 [81.5; 100]
M1	M1-M6	QF-Mg < 1.29 and TTV ≥ 4.26	72.7 [39.0; 94.0]	33.3 [20.4; 48.4]	20 [9.0; 35.6]	84.2 [60.4; 96.6]
M1	M1-M12	QF-Mg ≤ 1.27 and TTV ≥ 4.26	100 [78.2; 100]	40.9 [26.3; 56.8]	35 [20.6; 51.7]	100 [81.5; 100]

Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI, confidence interval.

IV. DISCUSSION

In the present study, we evaluated the value of the QF-Ag or the QF-Mg and TTV-DNA load, alone and in combination, for the prediction of CMV reactivation ($\geq 3 \log_{10}$ IU/ml) in the first post-transplant year in a cohort of R+ KTR. Moreover, we determined new QF-Ag, QF-Mg and TTV cut-off values, that may improve risk stratification of CMV reactivation.

Reconstitution of CMV-specific T-cell (QF-Ag) and overall T-cell (QF-Mg) responses was analyzed according to antiviral prophylaxis administration in the 1-year study period (Figures 2.B and 2.D). Our data demonstrated that patients receiving prophylaxis had significantly lower mean QF-Ag values between M1 and M6 compared to patients without prophylaxis (Figure 2.B). In addition, QF-Ag kinetics exhibited a first increase in mean values from M1 in patients without prophylaxis, whereas values only increased from M5 in the prophylaxis

group. Conversely, anti-CMV prophylaxis did not show a significant effect on mean QF-Mg values between patients with and without prophylaxis (Figure 2.D). Valganciclovir and ganciclovir were the most frequently drugs used in prophylaxis regimens (43/64, 95.6%). Our results are in line with previous findings reporting a potential impact of ganciclovir prophylaxis and other nucleoside antiviral agents on delayed recovery of HLA-restricted CMV-specific T cell responses (29,176,177). Delayed recovery of virus-specific host response in ganciclovir recipients may be associated with suppression of *in vivo* priming and expansion of CMV-specific T cell precursors, caused by an efficient inhibition of CMV replication during the period of drug administration (29). Impaired immunoglobulin-G seroconversion and inhibition of CMV-specific IgG antibody maturation have been previously described in transplant recipients receiving ganciclovir prophylaxis (178,179). Interestingly, QF-Ag kinetics in patients with CMV reactivation showed a strongest recovery of CMV specific T-cell responses from M8 to M12 compared to patients without CMV reactivation (Figure 3.A), suggesting a stimulation of specific immune responses upon CMV antigen re-exposure in R+ KTR.

The QF-CMV kinetics in patients who experienced CMV reactivation showed that QF-Ag and QF-Mg values tended to be lower at M1 but not à D0 (Figures 3.A and 3.B). Based on these observations, we hypothesized that a pre-transplant QF-CMV was not predictive of CMV reactivation in CMV-seropositive KTR during the first post-transplant year. This is consistent with a previous study conducted by Lee and colleagues, who showed no association between a pre-transplant QF-CMV assay and CMV DNAemia in R+ KTR (120). These findings were confirmed by Pongsakornkullachart and colleagues, that could not demonstrate the value of a pretransplant QF-CMV as a predictor for post-transplant CMV viremia in R+ KTR (180). Thus, we focused on a QF-Ag or a QF-Mg at M1 as a relevant time-point for risk prediction of CMV reactivation within the following 3 months, 5 months, and 11 months (Table 2).

The primary analysis was performed using manufacturer's cut-offs (Table 2.A). Although the QF-Ag or the QF-Mg at M1 were poorly sensitive for the prediction of CMV reactivation (sensitivity $\leq 45.5\%$), they appear to be correlated with protection against CMV reactivation (specificity $\geq 78\%$). Predictive values indicated that a reactive QF-Ag or QF-Mg at M1 exhibited better performance to predict CMV viremia control (NPV $\geq 77.8\%$) than a non-reactive result to predict CMV reactivation (PPV between 15.4% and 46.1%) in R+ KTR,

whatever the follow-up period studied. However, no differences in 1-year CMV infection-free rates were found between patients with a reactive and a non-reactive QF-Ag at M1 (Figure 4.A). Thus, a QF-Ag < 0.2 IU/ml at M1 did not predict a significantly higher risk of CMV reactivation at M12 than a QF-Ag above this cut-off in our R+ KTR cohort. In contrast, patients with a QF-Mg < 0.5 IU/ml at M1 had a subsequent higher incidence of CMV reactivation at M12 than patients with a QF-Mg > 0.5 IU/ml (Figure 4.C). Taken together, these results support a better predictive value of a QF-Mg < 0.5 IU/ml than a QF-Ag < 0.2 IU/ml at M1 in R+ KTR. Non-response to mitogen has already been reported as a potential marker of global immunosuppression, suggesting that global T cell anergy is at high risk for CMV infection or disease (101,105,106). A study in 124 D+/R+ SOT recipients showed that patients with an indeterminate QF-CMV result (QF-Ag < 0.1 IU/ml and QF-Mg < 0.5 IU/ml) had a significantly higher risk of CMV disease than those with a non-reactive result (QF-Ag < 0.1 IU/ml and QF-Mg \geq 0.5 IU/ml) (105). In a study of CMV-seropositive heart transplant recipients, a higher proportion of patients with an indeterminate QF-CMV result (QF-Ag < 0.2 IU/ml and QF-Mg < 0.5 IU/ml) after the suspension of prophylaxis developed a post-transplant CMV infection than of patients who showed a global T-cell responsiveness (106). Another study performed on 25 KTR showed that patients with an indeterminate QF-CMV or a QF-Mg < 3.5 IU/ml (cut-off used in this study) had an increased incidence of CMV disease or serious infectious complications (162).

Based on ROC curve analyses, we were able to determine optimized QF-Ag and QF-Mg cut-offs at M1 for the prediction of CMV reactivation. QF-Ag cut-off values at M1 were defined as < 2.23 IU/ml, < 9.12 IU/ml and \leq 2.48 IU/ml for CMV reactivation at M1-M4, at M1-M6 and at M1-M12, respectively (Supplementary Figure 1). As suggested by Pongsakornkullachart *et al.* (180), the QF-Ag cut-off of 0.2 IU/ml (as per manufacturer's instructions) may be appropriate only for CMV-seronegative recipients and higher cut-offs might be required in KTR previously exposed against CMV. Other studies have already reported high QF-Ag cut-offs associated with the absence of CMV infection in SOT. Gliga *et al.* defined a QF-Ag cut-off of 85.1 IU/ml (AUC=0.477, sensitivity=16%, specificity=100%) for the prediction of protection from CMV viremia within 3 months following the QF-CMV assay (181). Another study assessing the risk of CMV reactivation in post-bone marrow transplant patients

suggested a cut-off of > 8.9 IU/ml (AUC=0.76, sensitivity=42%, specificity=100%) for protection from high-level CMV viremia and CMV disease (182). In a study conducted by Abate *et al.*, QF-Ag cut-offs of > 1 to 6 IU/ml were associated with protection from CMV infection in KTR (98).

Subsequently, we calculated the performance of the QF-Ag at M1 with our optimized cut-offs. Better sensitivity values were found ($\geq 62.5\%$) (Table 2.B). To be noted, the gain in sensitivity with these optimized cut-offs resulted in a loss of specificity, with values between 27.7% and 54.5%. PPV ranging from 17.2 to 33.3% and NPV ranging from 85.7% and 89.7% were similar with those obtained with manufacturer's cut-offs. Regarding the AUC, they yielded poor results to predict CMV infection at M1-M4 (AUC=0.53), at M1-M6 (AUC=0.56) or at M1-M12 (AUC=0.61) (Supplementary Figure 1). Moreover, the QF-Ag cut-off of 2.48 IU/ml did not allow to reach a statistically significant difference in CMV infection-free survival at M12 between patients with a reactive and a non-reactive QF-Ag at M1 (Figures 4.B). Similarly to a QF-Ag < 0.2, a QF-Ag < 2.48 IU/ml at M1 does not predict a significantly higher risk of CMV reactivation than a QF-Ag above this cut-off in our R+ cohort.

The diagnostic accuracy of the QF-Mg at M1 was also evaluated using cut-offs determined by ROC curves (1.29 IU/ml at M1-M4 or M1-M6, and 1.27 IU/ml at M1-M12) (Supplementary Figure 1). In a similar way as for the QF-Ag, it resulted in an increase in sensitivity ($\geq 62.5\%$), at the detriment of specificity, with values between 68% and 72.7%. PPV (from 23.8% to 42.9%) and NPV (86.5% to 91.9%), were similar with those obtained with manufacturer's cut-offs (Table 2.B). However, the QF-Mg at M1 showed also a poor discriminatory power to predict CMV infection at M1-M4 (AUC=0.61) (Supplementary Figure 1.D). Conversely, ROC curve analyses revealed 1.29 IU/ml and 1.27 IU/ml as accurate QF-Mg cut-offs allowing to discriminate patients with and without subsequent CMV reactivation at M1-M6 (AUC=0.69) and at M1-M12 (AUC=0.68), respectively. Moreover, Kaplan-Meier analyses demonstrated that the 1.27 IU/ml cut-off better stratify the risk of CMV reactivation at M12 than the manufacturer's QF-Mg cut-off in our R+ KTR cohort (Figure 4.D). Further studies are warranted to reevaluate the potential use of this QF-Mg cut-off for risk stratification of CMV reactivation during the first post-transplant year in R+ KTR.

We investigated TTV load dynamics in the first post-transplant year in our R+ KTR cohort. At D0, most patients had detectable TTV DNAemia (67.8%) and 44.1% had TTV load $\geq 3.45 \log_{10}$ copies/ml in whole blood. These results are in line with previous reports demonstrating a high TTV seroprevalence in KTR than in immunocompetent healthy individuals and TTV reactivation in almost all immunocompromised patients (183–185). TTV load dynamics increased from baseline and reached a peak at M3, which coincides with the period of maximum immunosuppression (Figure 5.A). Thereafter, TTV slowly declined from M3 to M12. Similar TTV kinetics were already described in various transplant settings (153,171,186). As previously reported in other studies, anti-CMV prophylaxis had no effect on TTV viremia (Figure 5.B) (187).

TTV load was higher in KTR with CMV reactivation compared to patients without reactivation throughout the follow-up period (Figure 6). Therefore, we focused on the earliest follow-up time points (D0 and M1) to evaluate the diagnostic performance of TTV load for risk prediction of CMV reactivation. Moreover, we assessed whether the increase in TTV levels between D0 and M1 was significantly associated with a higher incidence of CMV reactivation. According to our results, TTV load $\geq 3.45 \log_{10}$ copies/ml at D0 or M1 appears to be an interesting indicator of immunosuppression in patients experiencing CMV reactivation, with sensitivity values between 60% and 80% (Table 3.A). Although PPV were less than 50%, TTV load demonstrated high NPV ($> 75\%$). Therefore, TTV load at D0 or M1 seems better predict a CMV viremia control than a reactivation in R+ KTR during the first post-transplant year, such as the QF-Ag or the QF-Mg. However, we did not demonstrate any significant difference in 1-year CMV-free infection rates between patients with a positive and a negative TTV load at D0 or M1, using the $3.45 \log_{10}$ copies/ml cut-off (Figures 7.A and 7.B).

According to ROC analyses, the optimal TTV cut-off value for detection of CMV reactivation was defined as $3.78 \log_{10}$ copies/ml (AUC=0.65) at D0 and $4.26 \log_{10}$ copies/ml (AUC=0.70) at M1, respectively (Supplementary Figure 2). Using our optimized cut-offs, the TTV viremia at D0 and M1 does not appear to provide better predictive value than the threshold of $3.45 \log_{10}$ copies/ml (Table 3). Unlike the $3.45 \log_{10}$ copies/ml cut-off (Figures 7.A and 7.B), our optimized TTV cut-offs allowed to reach a statistically significant difference in CMV infection-free survival between patients with a positive and a negative TTV load at D0 or

M1 (Figures 7.C and 7.D). Thus, we suggest that R+ KTR with a TTV load $> 3.78 \log_{10}$ copies/ml at D0 or $> 4.26 \log_{10}$ copies/ml at M1 have a significantly increased risk to CMV reactivation during the first year after transplantation.

However, it is important to highlight, that the $3.45 \log_{10}$ copies/ml cut-off (AUC=0.72) proposed by Maggi *et al.* (153) was defined for plasma samples within the first 10 days post-transplant using an in-house PCR, whereas the quantification of TTV load in the current study was performed in peripheral blood with the TTV R-GENE® kit (bioMérieux, France). A recent review indicates that the $3.45 \log_{10}$ copies/ml cut-off changes to a value of $3.8 \log_{10}$ copies/ml if converted to values corresponding to the commercial PCR (136). Interestingly, we were able to find the same TTV cut-off value at D0 ($3.78 \log_{10}$ copies/ml). Some other studies have defined cut-off levels correlating with the development of infections. Using an in-house PCR, Doberer *et al.* suggested a TTV load in peripheral blood $> 8 \log_{10}$ copies/ml (AUC=0.62), quantified after stabilization in month 3 after a kidney transplant, as a risk factor of infection in the first post-transplant year (152). This cut-off corresponds to $6.6 \log_{10}$ copies/ml if converted to values corresponding to the commercial PCR (101). Fernández-Ruiz *et al.* further reported that a plasma TTV load $> 4.56 \log_{10}$ copies/ml at M1 (AUC=0.70) (commercial PCR) was associated with a higher risk of immunosuppression-related adverse events, encompassing the occurrence of opportunistic infection, in the first year after kidney transplantation (151). Of note, using the same TTV quantification kit, we determined a TTV cut-off at M1 similar to that reported by Fernández-Ruiz *et al.*

We also assessed dynamic changes in TTV levels between D0 and M1 as a predictor of CMV reactivation between M1 to M12. An increase of at least $0.75 \log_{10}$ copies/ml from D0 to M1 was identified as the optimal value (Supplementary Figure 2). However, the AUC (0.60) demonstrated a poor discriminatory power between patients with and without CMV reactivation. In addition, it provided comparable diagnostic performance of those estimated with a static measurement of TTV load at D0 and M1 (cut-off of $3.45 \log_{10}$ copies/ml) (Table 3), and consequently conferred no additional benefit.

The last part of our study aimed to analyze the value of the QF-Ag or the QF-Mg in combination with TTV load at M1 for risk prediction of CMV reactivation within the following

3 months, 5 months, and 11 months (Table 4). Using conventional cut-offs, the combination of the QF-Ag and TTV load resulted in an increase of about 50% in sensitivity with similar predictive values compared with the QF-Ag alone, whatever the follow-up period studied. (Tables 2.A and 4.A). This combination at M1 did not outperform the positive and negative predictive values as compared with TTV load analyzed independently (Tables 3.A and 4.A). By using cut-offs obtained from ROC curves, we further increased sensitivity values ranging from 85.7 to 90.9%, i.e, at least 85% of patients experiencing CMV reactivation between M1 and M12 had a non-reactive QF-Ag and a positive TTV load at M1 (Table 4.B). By using optimized cut-offs, the combination was overall more sensitive than the QF-Ag or TTV load alone (Tables 2.B, 3.B and 4.B). However, specificity values of the QF-Ag in combination with TTV load (38.3% to 40.9% with manufacturer's cut-offs and 12.8% to 27.9% with optimized cut-offs) were lower than those obtained with the QF-Ag or TTV load analyzed separately (Tables 2.B, 3.B and 4.B). NPV (85.7% to 92.9%) using manufacturer's cut-offs or optimized cut-offs were comparable with those of the assays performed independently at M1.

For the QF-Mg < 0.5 IU/ml combined with TTV load $\geq 3.45 \log_{10}$ copies/ml at M1, we also obtained better sensitivity values (75% to 85.7%) compared with the QF-Mg alone (Tables 2.A and 4.A). Nevertheless, the QF-Mg combined with TTV load did not increase notably sensitivity compared with TTV load analyzed alone (Tables 3.A and 4.A). Using our optimized cut-offs, this combination displayed a better sensitivity than the separate analysis of each of these two markers at M1-M4 and M1-M12, with values reaching 100% (Tables 2.B, 3.B and 4.B). Similarly to the combined analysis of the QF-Ag and TTV load, the QF-Mg in combination with TTV load resulted in a decrease in specificity compared with the separate analysis of each marker (36% to 40.9% with manufacturer's cut-offs or optimized cut-offs). Interestingly, the combination of QF-Mg and TTV load allowed to reach 100% NPV at M1-M4 or M1-M12 using our optimized cut-offs.

Our study has some limitations. Although anti-CMV prophylaxis has been shown to significantly decrease QF-Ag values in the first 6 months post-transplantation, we could not conduct the analysis separately in the subgroups of patients with and without prophylaxis. Indeed, the number of patients in each subgroup was too small to assess the risk of post-

transplant CMV reactivation. In addition, the number of episodes of CMV reactivation (19/63 patients, 29.7%) was low, limiting the statistical power of the analysis.

In conclusion, the QF-Ag or the QF-Mg or TTV load did not predict subsequent reactivation ($\geq 3 \log_{10}$ IU/ml) in our R+ KTR cohort but rather identified patients at low risk of CMV reactivation. We propose new QF-Mg cut-offs at M1 and TTV cut-offs at D0 and M1 that could be useful for optimal management of immunosuppressive strategy and for assigning R+ KTR to groups at lower risk of CMV reactivation during the first post-transplant year. Furthermore, our data suggest better performance of the combination of the QF-Mg and TTV load for risk stratification of CMV infection in R+ KTR compared with the QF-Mg or TTV load analyzed independently.

SUPPLEMENTARY DATA

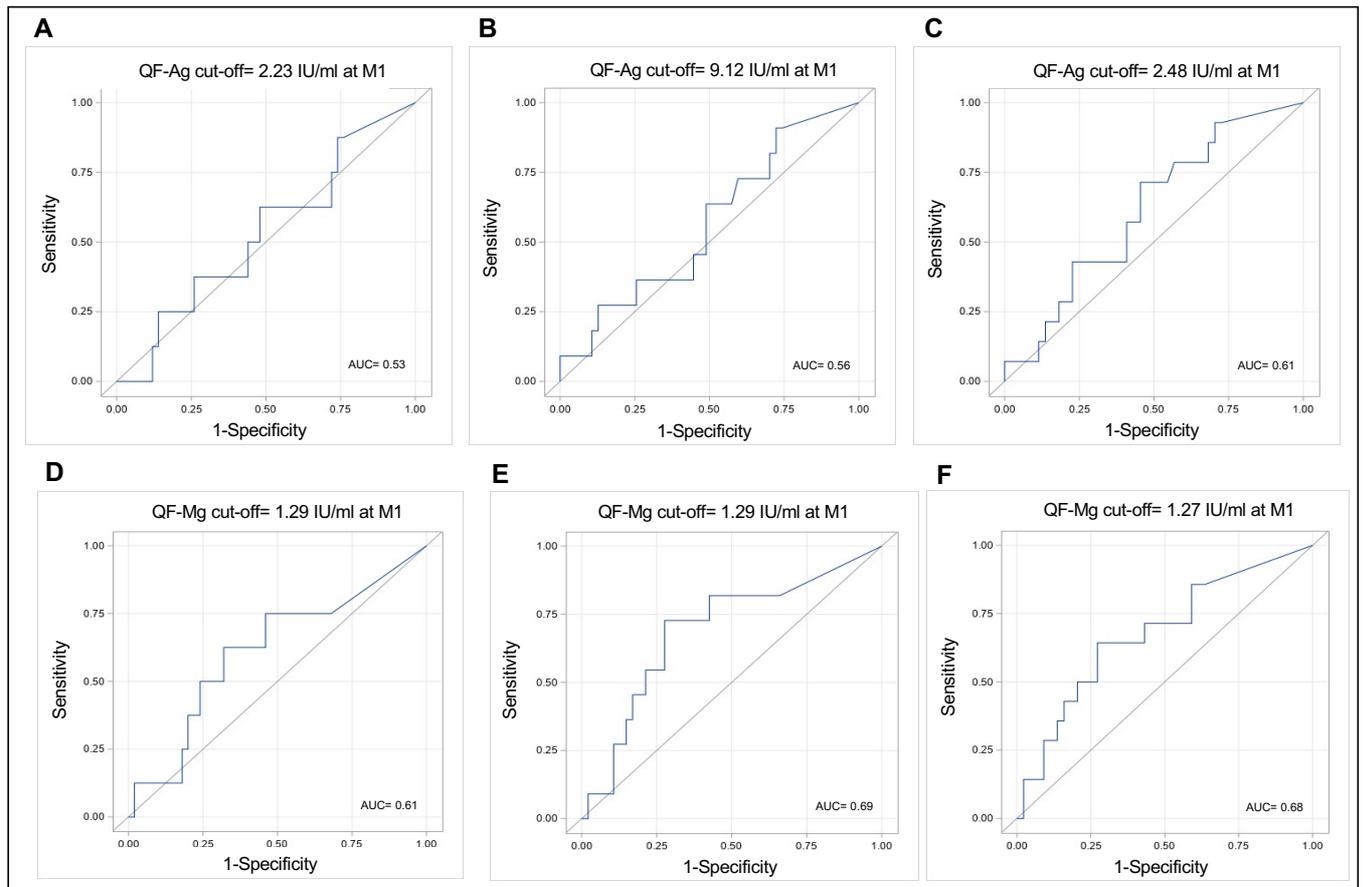


Figure S1. Receiver operating characteristic (ROC) curve and their relative AUC for distinguish optimal cut-off values of the QF-Ag (A, B, C) and the QF-Mg (D, E, F) at M1 for the prediction of CMV reactivation between M1 and M4 (A, D); M1 and M6 (B, E); M1 and M12 (C, F).

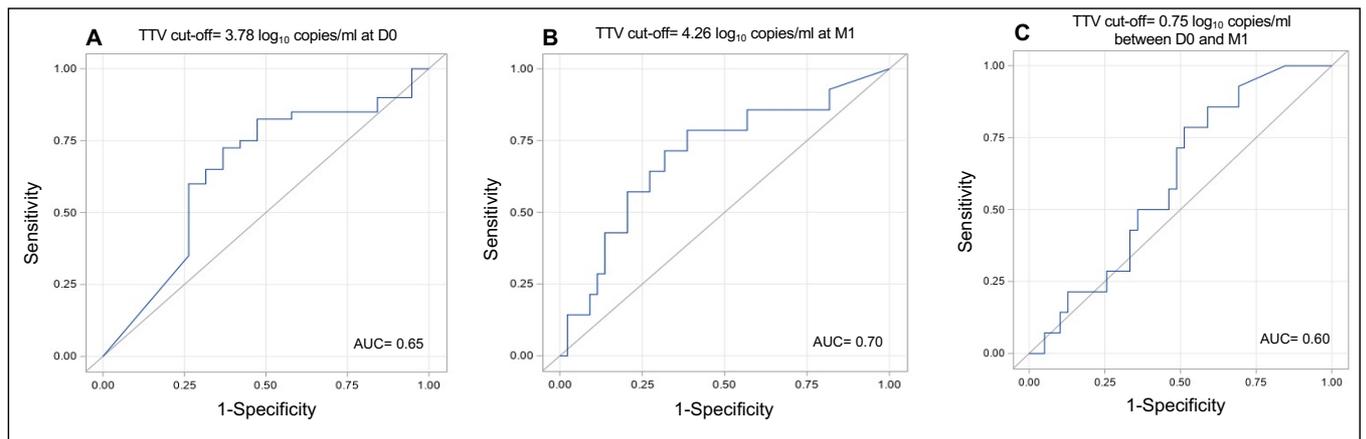


Figure S2. Receiver operating characteristic (ROC) curve and their relative AUC for distinguish the optimal TTV cut-off value at D0 for the prediction of CMV reactivation between D0 and M1 (A), the optimal TTV cut-off value at M1 for the prediction of CMV reactivation between M1 and M12 (B), and the optimal dynamic change in TTV levels between D0 and M1 for the prediction of CMV reactivation between M1 and M12 (C).

V. CONCLUSION DE L'ETUDE

Dans cette étude multicentrique prospective, nous avons analysé les performances du QF-CMV (QF-Ag ou QF-Mg) et de la charge virale TTV, seuls ou en combinaison, pour la prédiction du risque de réactivation à CMVH chez le patient transplanté rénal R+.

Dans un premier temps, nous avons analysé la cinétique du QF-Ag (réponses cellulaires T CD8+ spécifiques du CMVH) et du QF-Mg (réponses cellulaires T CD8+ globales) selon l'administration initiale d'une prophylaxie anti-CMVH. D'après nos résultats, l'utilisation d'une prophylaxie n'a pas d'impact significatif sur les réponses cellulaires T CD8+ globales. En revanche, des valeurs moyennes significativement plus faibles du QF-Ag ont été observées au cours des premiers mois de suivi chez les patients ayant reçu une prophylaxie, suggérant que cette dernière retarde la reconstitution immunitaire anti-CMVH. Par ailleurs, la cinétique du QF-Ag a montré une plus forte reconstitution des réponses cellulaires T anti-CMVH de M8 à M12 chez les patients ayant présenté une réactivation à CMVH dans l'année de suivi. Ces résultats sont en faveur d'une stimulation des réponses cellulaires T spécifiques anti-CMVH lors d'une réexposition au virus chez le transplanté rénal R+.

Analysés avec les seuils du fournisseur, le QF-Ag ou le QF-Mg à M1 présentent une faible sensibilité ($\leq 45,5\%$) mais semblent corrélés à une protection contre la réactivation à CMVH (spécificité $\geq 78\%$). Les valeurs prédictives du QF-Ag ou du QF-Mg à M1 indiquent que ces marqueurs sont plus performants pour prédire un contrôle de la virémie à CMVH (VPN $\geq 77,8\%$) qu'une réactivation à CMVH (VPP entre 15,4% et 46,1%) dans les 3 mois (M1-M4), 5 mois (M1-M6) ou 11 mois (M1-M12) après la réalisation du QF-CMV. Les analyses de survie de Kaplan-Meier suggèrent une meilleure performance du QF-Mg par rapport au QF-Ag pour stratifier le risque de réactivation à CMVH chez le transplanté rénal R+.

Afin d'optimiser la prédiction du risque d'infection à CMVH, de nouveaux seuils de positivité du QF-Ag à M1 ont été déterminés à l'aide de courbes ROC : 2,23 UI/ml (AUC=0,53) à M1-M4, 9,12 UI/ml (AUC=0,56) à M1-M6, et 2,48 UI/ml (AUC=0,61) à M1-M12. En ce qui concerne le QF-Mg à M1, les seuils optimisés ont été définis à 1,29 UI/ml (AUC=0,61) à M1-M4, 1,29 UI/ml (AUC=0,69) à M1-M6 et 1,27 UI/ml (AUC=0,69) à M1-M12. L'utilisation de ces seuils pour le QF-Ag ou le QF-Mg a résulté en une augmentation notable de la sensibilité ($\geq 62,5\%$), avec des performances prédictives similaires. Les analyses de Kaplan-Meier n'ont

pas montré de différence significative dans la survie sans infection à M12 entre les patients avec un QF-Ag < 2,48 UI/ml et les patients avec un QF-Ag > 2,48 UI/ml à M1. En revanche, les courbes de survie de Kaplan-Meier ont démontré que les patients avec un QF-Mg < 1,27 UI/ml à M1 présentaient un risque significativement plus élevé de réactivation à CMVH à M12 que les patients avec un QF-Mg > 1,27 UI/ml, et ce, avec une meilleure stratification du risque entre les deux groupes de patients par rapport au seuil du fournisseur fixé 0,5 UI/ml.

Dans notre cohorte de patients R+, nous nous sommes également intéressés à la charge virale TTV à J0 ou M1 en tant que biomarqueur prédictif de la réactivation à CMVH entre M1 et M12. D'après nos données, la prophylaxie antivirale n'a pas d'impact significatif sur la charge virale TTV. En revanche, des charges virales TTV plus élevées ont été observées chez les transplantés présentant une réactivation à CMVH. Les performances de la charge virale TTV réalisée à J0 ou M1 ont d'abord été évaluées avec le seuil de 3,45 log₁₀ copies/ml, précédemment identifié par Maggi *et al.* comme étant associé à un risque majoré d'infection à CMVH dans les 4 mois post-transplantation (153). La charge virale TTV s'est révélée être un marqueur intéressant d'immunodépression chez les patients avec une réactivation à CMVH (sensibilité de 63,2% à J0 et 78,6% à M1). De plus, une charge virale TTV < 3,45 log₁₀ copies/ml semble mieux prédire un contrôle de la virémie à CMVH (VPN à 78,8% à J0 et 88,0 à M1) qu'une charge virale TTV > 3,45 log₁₀ copies/ml (VPP à 46,2% à J0 et 33,3% à M1) pour la prédiction d'une réactivation à CMVH. Cependant, il n'a pas été observé de différence significative dans la survie sans infection à M12 entre les patients présentant une charge virale TTV au-dessus ou en-dessous de ces seuils à J0 ou à M1. Des seuils optimisés ont été calculés à l'aide de courbes ROC : 3,78 log₁₀ copies/ml à J0 (AUC=0,65) et 4,26 log₁₀ copies/ml à M1 (AUC=0,70). En appliquant ces seuils, nous n'avons pas noté d'amélioration notable des valeurs prédictives de la charge virale TTV. Néanmoins, les analyses de Kaplan-Meier ont montré que les patients avec une charge virale TTV > 3,78 log₁₀ copies/ml à J0 ou > 4,26 log₁₀ copies/ml à M1 présentaient un risque significativement plus élevé de réactivation à CMVH entre M1 et M12 par rapport aux patients avec des charges virales TTV en dessous de ces seuils respectifs.

Nous avons également étudié les variations dynamiques de la charge virale TTV entre J0 et M1 pour la prédiction du risque de réactivation à CMVH entre M1 et M12. Une augmentation de charge virale > 0,75 log₁₀ copies/ml (AUC=0.60) entre J0 et M1 a été définie

comme seuil optimal, mais ne semble pas fournir une meilleure performance que l'analyse statique de la charge virale TTV à J0 ou M1 avec un seuil de $3,45 \log_{10}$ copies/ml. De plus, nous n'avons pas observé une incidence significativement plus élevée de réactivation à CMVH chez les patients présentant une augmentation de la charge virale TTV $> 0,75 \log_{10}$ copies/ml entre J0 et M1.

Enfin, nous avons analysé la valeur du QF-Ag ou du QF-Mg en combinaison avec la charge virale TTV pour la prédiction du risque de réactivation à CMVH. En utilisant les seuils conventionnels, la combinaison du QF-Ag et de la charge virale TTV ou du QF-Mg et de la charge virale TTV ne semble pas apporter une meilleure prédiction de la protection contre la réactivation à CMVH que l'analyse séparée de chacun des marqueurs dans notre cohorte de transplantés rénaux R+. En revanche, l'utilisation de nos seuils optimisés dans la combinaison QF-Mg et de la charge virale TTV a permis d'atteindre des VPN de 100% à M1-M4 et M1-M6, avec une sensibilité de 100%. Autrement dit, un QF-Mg $\geq 1,29$ UI/ml associé à une charge virale TTV $< 4,26 \log_{10}$ copies/ml à M1 semble présenter une performance légèrement supérieure pour prédire un contrôle de la virémie à CMVH, comparativement à l'analyse individuelle de ces deux marqueurs dans notre cohorte de patients transplantés rénaux R+. Toutefois, le nombre faible d'évènements à CMVH au cours du suivi (19/63 patients, 29,7%) limite la puissance statistique de notre étude. La mise en place d'une étude prospective pourrait permettre de valider l'utilisation de ces nouveaux seuils pour ensuite définir la place de ces nouveaux tests dans le suivi des transplantés rénaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Crough T, Khanna R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev.* janv 2009;22(1):76-98.
2. Marshall GS, Rabalais GP, Stout GG, Waldeyer SL. Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *J Infect Dis.* févr 1992;165(2):381-4.
3. Sophie Alain, Isabelle Garrigue. Cytomégalovirus. In: *Traité de Virologie Médicale*, 2ème édition - Société Française de Microbiologie.
4. Tomtishen III JP. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Viol J.* 17 janv 2012;9:22.
5. Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* juin 2008;72(2):249-65, table of contents.
6. Marie-Christine Mazon. *Cytomégalovirus*, uides Medi/Bio. Elsevier Masson. Elsevier. 2002.
7. Ligat G, Cazal R, Hantz S, Alain S. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiol Rev.* 18 janv 2018;42(2):137-45.
8. Hantz S, Alain S. [Cytomegalovirus infections]. *Rev Prat.* mars 2019;69(3):301-6.
9. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol.* juill 2010;20(4):202-13.
10. Soper DE. Congenital Cytomegalovirus Infection: An Obstetrician's Point of View. *Clinical Infectious Diseases.* 15 déc 2013;57(suppl_4):S171-3.
11. Antona D, Lepoutre A, Fonteneau L, Baudon C, Halftermeyer-Zhou F, LE Strat Y, *et al.* Seroprevalence of cytomegalovirus infection in France in 2010. *Epidemiol Infect.* mai 2017;145(7):1471-8.
12. Adland E, Klenerman P, Goulder P, Matthews PC. Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era. *Front Microbiol.* 24 sept 2015;6:1016.
13. Mazon M.C., Alain S., Leruez-Ville M. Schnepf N. Infections à cytomégalovirus. *Encyclopédie médico-Chirurgicale (EMC) Maladies infectieuses*, vol 8-052-C-10. Elsevier Masson SAS, Paris. 2015.
14. Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol.* 15 nov 2006;177(10):7094-102.
15. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, *et al.* Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *J Virol.* avr 2003;77(8):4588-96.
16. Juckem LK, Boehme KW, Feire AL, Compton T. Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells. *J Immunol.* 1 avr 2008;180(7):4965-77.
17. Wu Z, Lau CM, Sottile R, Luduec JBL, Panjwani MK, Conaty PM, *et al.* Human Cytomegalovirus Infection Promotes Expansion of a Functionally Superior Cytoplasmic CD3+ NK Cell Subset with a Bcl11b-Regulated T Cell Signature. *The Journal of Immunology.* 15 nov 2021;207(10):2534-44.
18. Venema H, van den Berg AP, van Zanten C, van Son WJ, van der Giessen M, The TH.

Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol.* févr 1994;42(2):188-92.

19. Kaminski H, Couzi L, Déchanet-Merville J, Merville P. Intérêt de l'immuno-surveillance dans l'infection à cytomégalovirus en transplantation rénale : mise au point et perspectives. *Néphrologie & Thérapeutique.* nov 2015;11(6):465-73.
20. Halary F, Pitard V, Dlubek D, Krzysiek R, de la Salle H, Merville P, *et al.* Shared reactivity of V δ 2neg $\gamma\delta$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine.* 16 mai 2005;201(10):1567-78.
21. Déchanet J, Merville P, Bergé F, Bone-Mane G, Taupin JL, Michel P, *et al.* Major Expansion of $\gamma\delta$ T Lymphocytes following Cytomegalovirus Infection in Kidney Allograft Recipients. *The Journal of Infectious Diseases.* 1 janv 1999;179(1):1-8.
22. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Bergé F, Potaux L, Moreau JF, *et al.* Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis.* 1 sept 2001;184(5):533-41.
23. Khairallah C, Déchanet-Merville J, Capone M. $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection. *Front Immunol.* 9 févr 2017;8:105.
24. Gyulai Z, Endresz V, Burian K, Pincus S, Toldy J, Cox WI, *et al.* Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Responses to Human Cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in Healthy Individuals: Reevaluation of Prevalence of IE1-Specific CTLs. *The Journal of Infectious Diseases.* 1 mai 2000;181(5):1537-46.
25. Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, *et al.* Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation.* 15 mai 2001;71(9):1287-94.
26. Sester M, Sester U, Gärtner BC, Girndt M, Meyerhans A, Köhler H. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol.* oct 2002;13(10):2577-84.
27. Reusser P, Cathomas G, Attenhofer R, Tamm M, Thiel G. Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *J Infect Dis.* août 1999;180(2):247-53.
28. Radha R, Jordan S, Puliyaanda D, Bunnapradist S, Petrosyan A, Amet N, *et al.* Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* janv 2005;5(1):110-7.
29. Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood.* 1 avr 1994;83(7):1971-9.
30. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, *et al.* Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med.* 19 oct 1995;333(16):1038-44.
31. Elkington R, Walker S, Crough T, Menzies M, Tellam J, Bharadwaj M, *et al.* Ex Vivo Profiling of CD8+-T-Cell Responses to Human Cytomegalovirus Reveals Broad and Multispecific Reactivities in Healthy Virus Carriers. *J Virol.* mai 2003;77(9):5226-40.
32. 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. *J Exp Med.* 5 sept 2005;202(5):673-85.

33. Manley TJ, Luy L, Jones T, Boeckh M, Mutimer H, Riddell SR. Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8+ cytotoxic T-cell response in natural infection. *Blood*. 15 août 2004;104(4):1075-82.
34. Blanco-Lobo P, Bulnes-Ramos Á, McConnell MJ, Navarro D, Pérez-Romero P. Applying lessons learned from cytomegalovirus infection in transplant patients to vaccine design. *Drug Discov Today*. avr 2016;21(4):674-81.
35. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, Cobbold M, Khanna R, Nayak L, *et al.* Herpesvirus-Specific CD8 T Cell Immunity in Old Age: Cytomegalovirus Impairs the Response to a Coresident EBV Infection. *The Journal of Immunology*. 15 déc 2004;173(12):7481-9.
36. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, *et al.* Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol*. 15 août 2002;169(4):1984-92.
37. Ouyang Q, Wagner WM, Wikby A, Walter S, Aubert G, Dodi AI, *et al.* Large numbers of dysfunctional CD8+ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old. *J Clin Immunol*. juill 2003;23(4):247-57.
38. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev*. juin 2005;205:257-68.
39. 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*. juin 2018;102(6):900-31.
40. Lilleri D, Kabanova A, Lanzavecchia A, Gerna G. Antibodies Against Neutralization Epitopes of Human Cytomegalovirus gH/gL/pUL128-130-131 Complex and Virus Spreading May Correlate with Virus Control In Vivo. *J Clin Immunol*. 1 déc 2012;32(6):1324-31.
41. Fouts AE, Chan P, Stephan JP, Vandlen R, Feierbach B. Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 Complex Comprise the Majority of the Anti-Cytomegalovirus (Anti-CMV) Neutralizing Antibody Response in CMV Hyperimmune Globulin. *Journal of Virology*. juill 2012;86(13):7444-7.
42. Krmpotić A, Podlech J, Reddehase MJ, Britt WJ, Jonjić S. Role of antibodies in confining cytomegalovirus after reactivation from latency: three decades' résumé. *Med Microbiol Immunol*. août 2019;208(3-4):415-29.
43. Jones TR, Sun L. Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol*. avr 1997;71(4):2970-9.
44. Jones TR, Wiertz EJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 oct 1996;93(21):11327-33.
45. Ahn K, Gruhler A, Galocha B, Jones TR, Wiertz EJHJ, Ploegh HL, *et al.* The ER-Luminal Domain of the HCMV Glycoprotein US6 Inhibits Peptide Translocation by TAP. *Immunity*. 1 mai 1997;6(5):613-21.
46. Furman MH, Dey N, Tortorella D, Ploegh HL. The Human Cytomegalovirus US10 Gene Product Delays Trafficking of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *J Virol*. nov 2002;76(22):11753-6.
47. Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*. 8 mars 1996;84(5):769-79.
48. Kotenko SV, Saccani S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A*.

15 févr 2000;97(4):1695-700.

49. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, *et al.* Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*. 11 févr 2000;287(5455):1031.
50. Leruez-Ville M, Ville Y. Épidémiologie et diagnostic virologique de l'infection congénitale à cytomégalovirus (CMV). *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. 1 févr 2020;204(2):126-36.
51. Vauloup-Fellous C, Bouthry E, Grangeot-Keros L. Infections transmitted from the mother to the fetus: diagnostic issues and management of pregnancy. *Annales de biologie clinique*. nov 2013;71(S1):5-18.
52. Haute autorité de santé (HAS). Diagnostic par sérologie et/ou par recherche du génome viral de l'infection congénitale à cytomégalovirus (Argumentaire). 2016 nov.
53. Sébastien Hantz, David Boutolleau. Le cytomégalovirus humain (CMVH) - sfm-microbiologie.
54. Practice bulletin no. 151: Cytomegalovirus, parvovirus B19, varicella zoster, and toxoplasmosis in pregnancy. *Obstet Gynecol*. juin 2015;125(6):1510-25.
55. Kadambari S, Williams EJ, Luck S, Griffiths PD, Sharland M. Evidence based management guidelines for the detection and treatment of congenital CMV. *Early Hum Dev*. nov 2011;87(11):723-8.
56. Benoist G, Leruez-Ville M, Magny JF, Jacquemard F, Salomon LJ, Ville Y. Management of pregnancies with confirmed cytomegalovirus fetal infection. *Fetal Diagn Ther*. 2013;33(4):203-14.
57. Gandhi RS, Fernandez-Alvarez JR, Rabe H. Management of congenital cytomegalovirus infection: an evidence-based approach. *Acta Paediatr*. avr 2010;99(4):509-15.
58. Coll O, Benoist G, Ville Y, Weisman LE, Botet F, Anceschi MM, *et al.* Guidelines on CMV congenital infection. *J Perinat Med*. 2009;37(5):433-45.
59. Hantz S, Moret L, Alain S. Prise en charge de l'infection à cytomégalovirus en transplantation. *Revue Francophone des Laboratoires*. 1 sept 2019;2019(515):36-43.
60. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, *et al.* Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clin Infect Dis*. 1 janv 2017;64(1):87-91.
61. Haute autorité de santé (HAS) L. Evaluation de l'amplification génique pour le diagnostic des infections à Herpesviridae (cytomégalovirus, virus herpès simplex et varicelle-zona) chez les personnes vivant avec le VIH (Argumentaire). 2016 janv p. 57.
62. Yéni P. Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH: rapport 2010 [au Ministre de la santé et des sports] recommandations du groupe d'experts. Paris: la Documentation française; 2010.
63. N N. Kamar, L. Rostaing. Le cytomégalovirus en transplantation d'organes. *Le Courrier de la Transplantation - Volume VI - n o 161 3 - juillet-août-septembre 2006*. :6.
64. Kotton CN. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *American Journal of Transplantation*. 2013;13(s3):24-40.
65. Razonable RR. Epidemiology of cytomegalovirus disease in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 15 avr 2005;62(suppl_1):S7-13.
66. Herriot R, Gray ES. Images in clinical medicine. Owl's-eye cells. *N Engl J Med*. 8 sept 1994;331(10):649.

67. Pasternak Y, Ziv L, Attias J, Amir J, Bilavsky E. Valganciclovir Is Beneficial in Children with Congenital Cytomegalovirus and Isolated Hearing Loss. *J Pediatr.* août 2018;199:166-70.
68. SFORL. Les Virus en ORL: Rapport SFORL 2021. Elsevier Health Sciences; 2021. 313 p.
69. Lischka P, Hewlett G, Wunberg T, Baumeister J, Paulsen D, Goldner T, *et al.* In Vitro and In Vivo Activities of the Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2010;54(3):1290-7.
70. Goldner T, Hewlett G, Ettischer N, Ruebsamen-Schaeff H, Zimmermann H, Lischka P. The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (Letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *J Virol.* oct 2011;85(20):10884-93.
71. PREVYMIS (letermovir), antiviral [Internet]. Haute Autorité de Santé. Disponible sur: https://webzine.has-sante.fr/jcms/c_2869231/fr/prevymis-letermovir-antiviral
72. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, *et al.* Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 21 déc 2017;377(25):2433-44.
73. Drew WL, Miner RC, Marousek GI, Chou S. Maribavir sensitivity of cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir, cidofovir or foscarnet. *J Clin Virol.* oct 2006;37(2):124-7.
74. Maribavir : un nouveau traitement pour les infections à CMV résistant au traitement habituel : résultat de l'étude de phase III (NTC02931539) [Internet]. Disponible sur: <https://www.edimark.fr/esot/2021/ej/maribavir-nouveau-traitement-infections-a-cmv-resistant-traitement-habituel-resultat-etude-phase-iii-ntc02931539>
75. Commissioner O of the. FDA Approves First Treatment for Common Type of Post-Transplant Infection that is Resistant to Other Drugs [Internet]. FDA. FDA; 2021. Disponible sur: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-common-type-post-transplant-infection-resistant-other-drugs>
76. Alain S, Revest M, Veyer D, Essig M, Rerolles JP, Rawlinson W, *et al.* Maribavir Use in Practice for Cytomegalovirus Infection in French Transplantation Centers. *Transplantation Proceedings.* 1 mai 2013;45(4):1603-7.
77. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazeron MC, Garrigue I, Merville P, Mengelle C, *et al.* Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 déc 2010;65(12):2628-40.
78. Gilbert C, Boivin G. Human Cytomegalovirus Resistance to Antiviral Drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2005;49(3):873-83.
79. Chou S. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral Res.* avr 2020;176:104711.
80. Chou S, Marousek GI. Accelerated Evolution of Maribavir Resistance in a Cytomegalovirus Exonuclease Domain II Mutant. *J Virol.* janv 2008;82(1):246-53.
81. Chou S, Wechel LCV, Marousek GI. Cytomegalovirus UL97 kinase mutations that confer maribavir resistance. *J Infect Dis.* 1 juill 2007;196(1):91-4.
82. Papanicolaou GA, Silveira FP, Langston AA, Pereira MR, Avery RK, Uknis M, *et al.* Maribavir for Refractory or Resistant Cytomegalovirus Infections in Hematopoietic-cell or Solid-organ Transplant Recipients: A Randomized, Dose-ranging, Double-blind, Phase 2 Study. *Clin Infect Dis.* 8 avr 2019;68(8):1255-64.
83. Schubert A, Ehlert K, Schuler-Luettmann S, Gentner E, Mertens T, Michel D. Fast selection of maribavir resistant cytomegalovirus in a bone marrow transplant recipient. *BMC Infect Dis.* 19 juill 2013;13:330.

84. Strasfeld L, Lee I, Tatarowicz W, Villano S, Chou S. Virologic characterization of multidrug-resistant cytomegalovirus infection in 2 transplant recipients treated with maribavir. *J Infect Dis.* 1 juill 2010;202(1):104-8.
85. Chou S, Wu J, Song K, Bo T. Novel UL97 drug resistance mutations identified at baseline in a clinical trial of maribavir for resistant or refractory cytomegalovirus infection. *Antiviral Res.* déc 2019;172:104616.
86. Martin M, Goyette N, Boivin G. Contrasting effects on ganciclovir susceptibility and replicative capacity of two mutations at codon 466 of the human cytomegalovirus UL97 gene. *Journal of Clinical Virology.* 1 déc 2010;49(4):296-8.
87. Eckle T, Prix L, Jahn G, Klingebiel T, Handgretinger R, Selle B, *et al.* Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes. *Blood.* 1 nov 2000;96(9):3286-9.
88. Santos Bravo M, Plault N, Sánchez Palomino S, Mosquera Gutierrez MM, Fernández Avilés F, Suarez Lledo M, *et al.* Phenotype and Genotype Study of Novel C480F Maribavir-Ganciclovir Cross-Resistance Mutation Detected in Hematopoietic Stem Cell and Solid Organ Transplant Recipients. *J Infect Dis.* 17 sept 2021;224(6):1024-8.
89. Chou S. Phenotypic Diversity of Cytomegalovirus DNA Polymerase Gene Variants Observed after Antiviral Therapy. *J Clin Virol.* avr 2011;50(4):287-91.
90. Scott GM, Weinberg A, Rawlinson WD, Chou S. Multidrug Resistance Conferred by Novel DNA Polymerase Mutations in Human Cytomegalovirus Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2007;51(1):89-94.
91. Campos AB, Ribeiro J, Boutolleau D, Sousa H. Human cytomegalovirus antiviral drug resistance in hematopoietic stem cell transplantation: current state of the art. *Rev Med Virol.* mai 2016;26(3):161-82.
92. Chou S. Rapid In Vitro Evolution of Human Cytomegalovirus UL56 Mutations That Confer Letermovir Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2015;59(10):6588-93.
93. Chou S. Comparison of Cytomegalovirus Terminase Gene Mutations Selected after Exposure to Three Distinct Inhibitor Compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2017;61(11):e01325-17.
94. Chou S. A third component of the human cytomegalovirus terminase complex is involved in letermovir resistance. *Antiviral Res.* déc 2017;148:1-4.
95. Chou S, Satterwhite LE, Ercolani RJ. New Locus of Drug Resistance in the Human Cytomegalovirus UL56 Gene Revealed by In Vitro Exposure to Letermovir and Ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2018;62(9):e00922-18.
96. Douglas CM, Barnard R, Holder D, Leavitt R, Levitan D, Maguire M, *et al.* Letermovir Resistance Analysis in a Clinical Trial of Cytomegalovirus Prophylaxis for Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *J Infect Dis.* 1 mars 2020;221(7):1117-26.
97. Alain S, Mazon MC, Denis F. Résistance du cytomégalovirus au ganciclovir. *Antibiotiques.* 1 mai 2004;6(2):113-9.
98. Abate D, Saldan A, Mengoli C, Fiscon M, Silvestre C, Fallico L, *et al.* Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol.* août 2013;51(8):2501-7.
99. Giulieri S, Manuel O. QuantiFERON[®]-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Review of Molecular Diagnostics.* janv 2011;11(1):17-25.
100. Walker S, Fazou C, Crough T, Holdsworth R, Kiely P, Veale M, *et al.* Ex vivo monitoring

of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl Infect Dis.* juin 2007;9(2):165-70.

101. Hall VG, Humar A, Kumar D. Utility of Cytomegalovirus Cell-Mediated Immunity Assays in Solid Organ Transplantation. *J Clin Microbiol.* 17 août 2022;60(8):e0171621.

102. Cantisán S, Lara R, Montejo M, Redel J, Rodríguez-Benot A, Gutiérrez-Aroca J, *et al.* Pretransplant Interferon- γ Secretion by CMV-Specific CD8+ T Cells Informs the Risk of CMV Replication After Transplantation: Utility of Pretransplant QuantiFERON-CMV. *American Journal of Transplantation.* mars 2013;13(3):738-45.

103. Altaf M, Lineburg KE, Crooks P, Rehan S, Matthews KK, Neller MA, *et al.* Pretransplant Cytomegalovirus-Specific Cellular Immunity and Risk of Viral Reactivation Following Lung Transplantation: A Prospective Cohort Study. *The Journal of Infectious Diseases.* 15 juill 2021;224(2):312-7.

104. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, Cobos I, Manuel O, Preiksaitis J, *et al.* Cell-Mediated Immunity to Predict Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation.* 2009;9(5):1214-22.

105. Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, *et al.* Assessment of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity for the Prediction of Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid-Organ Transplant Recipients: A Multicenter Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases.* 15 mars 2013;56(6):817-24.

106. Chiereghin A, Potena L, Borgese L, Gibertoni D, Squarzone D, Turello G, *et al.* Monitoring of Cytomegalovirus (CMV)-Specific Cell-Mediated Immunity in Heart Transplant Recipients: Clinical Utility of the QuantiFERON-CMV Assay for Management of Posttransplant CMV Infection. *Journal of Clinical Microbiology.* 26 mars 2018;56(4):e01040-17.

107. Páez-Vega A, Gutiérrez-Gutiérrez B, Agüera ML, Facundo C, Redondo-Pachón D, Suñer M, *et al.* Immunoguided Discontinuation of Prophylaxis for Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients Treated With Antithymocyte Globulin: A Randomized Clinical Trial. *Clinical Infectious Diseases.* 1 mars 2022;74(5):757-65.

108. Poglajen G, Zemljič G, Frljak S, Cerar A, Andročec V, Božič T, *et al.* QuantiFERON-CMV guided virostatic prophylaxis after heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* mars 2020;39(3):278-81.

109. 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.* mai 2019;103(5):1005-13.

110. Kumar D, Mian M, Singer L, Humar A. An Interventional Study Using Cell-Mediated Immunity to Personalize Therapy for Cytomegalovirus Infection After Transplantation. *Am J Transplant.* sept 2017;17(9):2468-73.

111. Fernández-Ruiz M, Rodríguez-Goncer I, Parra P, Ruiz-Merlo T, Corbella L, López-Medrano F, *et al.* Monitoring of CMV-specific cell-mediated immunity with a commercial ELISA-based interferon- γ release assay in kidney transplant recipients treated with antithymocyte globulin. *American Journal of Transplantation.* 2020;20(8):2070-80.

112. Kumar D, Humar A. CMV immune monitoring—Where do we go from here? *American Journal of Transplantation.* 2020;20(8):1961-2.

113. Weseslindtner L, Kerschner H, Steinacher D, Nachbagauer R, Kundi M, Jaksch P, *et al.* Prospective Analysis of Human Cytomegalovirus DNAemia and Specific CD8+ T Cell Responses in Lung Transplant Recipients: HCMV DNAemia and CD8+ T Cell Responses in LuTRs. *American*

Journal of Transplantation. août 2012;12(8):2172-80.

114. Lisboa LF, Kumar D, Wilson LE, Humar A. Clinical Utility of Cytomegalovirus Cell-Mediated Immunity in Transplant Recipients With Cytomegalovirus Viremia. *Transplantation*. 27 janv 2012;93(2):195-200.

115. Bestard O, Lucia M, Crespo E, Van Liempt B, Palacio D, Melilli E, *et al.* Pretransplant Immediately Early-1-Specific T Cell Responses Provide Protection for CMV Infection After Kidney Transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2013;13(7):1793-805.

116. Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J, Hainsworth EG, Sweny P, Nebbia G, *et al.* Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant*. mai 2008;8(5):990-9.

117. Costa C, Astegiano S, Terlizzi ME, Sidoti F, Curtoni A, Solidoro P, *et al.* Evaluation and Significance of Cytomegalovirus-Specific Cellular Immune Response in Lung Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*. 1 mai 2011;43(4):1159-61.

118. Abate D, Saldan A, Fiscon M, Cofano S, Paciolla A, Furian L, *et al.* Evaluation of cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immune reconstitution revealed that baseline antiviral immunity, prophylaxis, or preemptive therapy but not antithymocyte globulin treatment contribute to CMV-specific T cell reconstitution in kidney transplant recipients. *J Infect Dis*. 15 août 2010;202(4):585-94.

119. Abate D, Fiscon M, Saldan A, Cofano S, Mengoli C, Sgarabotto D, *et al.* Human cytomegalovirus-specific T-cell immune reconstitution in preemptively treated heart transplant recipients identifies subjects at critical risk for infection. *J Clin Microbiol*. juin 2012;50(6):1974-80.

120. Lee H, Park KH, Ryu JH, Choi AR, Yu JH, Lim J, *et al.* Cytomegalovirus (CMV) immune monitoring with ELISPOT and QuantiFERON-CMV assay in seropositive kidney transplant recipients. *PLoS One*. 12 déc 2017;12(12):e0189488.

121. Schachtner T, Stein M, Reinke P. CMV-Specific T Cell Monitoring Offers Superior Risk Stratification of CMV-Seronegative Kidney Transplant Recipients of a CMV-Seropositive Donor. *Transplantation*. oct 2017;101(10):e315.

122. Barabas S, Spindler T, Kiener R, Tonar C, Lugner T, Batzilla J, *et al.* An optimized IFN- γ ELISpot assay for the sensitive and standardized monitoring of CMV protein-reactive effector cells of cell-mediated immunity. *BMC Immunology*. 7 mars 2017;18(1):14.

123. Banas B, Böger CA, Lückhoff G, Krüger B, Barabas S, Batzilla J, *et al.* Validation of T-Track[®] CMV to assess the functionality of cytomegalovirus-reactive cell-mediated immunity in hemodialysis patients. *BMC Immunology*. 7 mars 2017;18(1):15.

124. Kumar D, Chin-Hong P, Kayler L, Wojciechowski D, Limaye AP, Osama Gaber A, *et al.* A prospective multicenter observational study of cell-mediated immunity as a predictor for cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. sept 2019;19(9):2505-16.

125. Jarque M, Crespo E, Melilli E, Gutiérrez A, Moreso F, Guirado L, *et al.* Cellular Immunity to Predict the Risk of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplantation: A Prospective, Interventional, Multicenter Clinical Trial. *Clin Infect Dis*. 3 déc 2020;71(9):2375-85.

126. Gerna G, Lilleri D, Fornara C, Comolli G, Lozza L, Campana C, *et al.* Monitoring of Human Cytomegalovirus-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Immunity in Patients Receiving Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2006;6(10):2356-64.

127. Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, Zelini P, Furione M, Comolli G, *et al.* Virologic and Immunologic Monitoring of Cytomegalovirus to Guide Preemptive Therapy in Solid-Organ

- Transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2011;11(11):2463-71.
128. Sester U, Gärtner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wössner R, Kindermann I, *et al*. Differences in CMV-Specific T-Cell Levels and Long-Term Susceptibility to CMV Infection after Kidney, Heart and Lung Transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2005;5(6):1483-9.
129. López-Oliva MO, Martínez V, Buitrago A, Jiménez C, Rivas B, Escuin F, *et al*. Pretransplant CD8 T-cell response to IE-1 discriminates seropositive kidney recipients at risk of developing CMV infection posttransplant. *Transplantation*. 1 avr 2014;97(8):839-45.
130. Rosa CL, Krishnan A, Longmate J, Martínez J, Manchanda P, Lacey SF, *et al*. Programmed Death—1 Expression in Liver Transplant Recipients as a Prognostic Indicator of Cytomegalovirus Disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 janv 2008;197(1):25-33.
131. Sund F, Lidehäll AK, Claesson K, Foss A, Tötterman TH, Korsgren O, *et al*. CMV-specific T-cell immunity, viral load, and clinical outcome in seropositive renal transplant recipients: a pilot study. *Clinical Transplantation*. 2010;24(3):401-9.
132. Camargo JF, Resende MR, Zamel R, Klement W, Bhimji A, Huibner S, *et al*. Potential role of CC chemokine receptor 6 in prediction of late-onset cytomegalovirus infection following solid organ transplant. *Clinical Transplantation*. 2015;29(6):492-8.
133. Lisboa LF, Egli A, Fairbanks J, O’Shea D, Manuel O, Husain S, *et al*. CCL8 and the Immune Control of Cytomegalovirus in Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. 2015;15(7):1882-92.
134. De Vlaminck I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, *et al*. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 21 nov 2013;155(5):1178-87.
135. Hino S. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Reviews in Medical Virology*. 2002;12(3):151-8.
136. Jaksch P, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Bond G. Integrated Immunologic Monitoring in Solid Organ Transplantation: the Road Towards Torque Teno Virus-guided Immunosuppression. *Transplantation*. 5 mai 2022;
137. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 8 déc 1997;241(1):92-7.
138. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 juill 2016;22(7):589-93.
139. Thom K, Petrik J. Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J Med Virol*. janv 2007;79(1):1-7.
140. Zhong S, Yeo W, Tang MW, Lin XR, Mo F, Ho WM, *et al*. Gross elevation of TT virus genome load in the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Ann N Y Acad Sci*. sept 2001;945:84-92.
141. Görzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. mars 2014;33(3):320-3.
142. Focosi D, Macera L, Pistello M, Maggi F. Torque Teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. *J Infect Dis*. 15 août 2014;210(4):667-8.
143. Masouridi-Levrat S, Pradier A, Simonetta F, Kaiser L, Chalandon Y, Roosnek E. Torque

teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* mars 2016;51(3):440-2.

144. Maggi F, Fabrizio M, Ricci V, Valentina R, Bendinelli M, Mauro B, *et al.* Changes In CD8+57+ T lymphocyte expansions after autologous hematopoietic stem cell transplantation correlate with changes in torquetenovirus viremia. *Transplantation.* 27 juin 2008;85(12):1867-8.

145. Julie Brassard - Sébastien Hantz - Sophie Alain. Anelloviridae. In: *Traité de Virologie Médicale, 2ème édition - Société Française de Microbiologie.*

146. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, *et al.* TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol.* févr 2003;77(4):2418-25.

147. Macera L, Spezia PG, Medici C, Rofi E, Del Re M, Focosi D, *et al.* Comparative evaluation of molecular methods for the quantitative measure of torquetenovirus viremia, the new surrogate marker of immune competence. *Journal of Medical Virology.* 2022;94(2):491-8.

148. Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, Shibayama T, Ishikawa T, Tsuda F, *et al.* Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 20 déc 2000;279(2):718-24.

149. Giacconi R, Maggi F, Macera L, Pistello M, Provinciali M, Gianecchini S, *et al.* Torquetenovirus (TTV) load is associated with mortality in Italian elderly subjects. *Experimental Gerontology.* 2 oct 2018;112:103-11.

150. Studenic P, Bond G, Kerschbaumer A, Bécède M, Pavelka K, Karateev D, *et al.* Torque Teno Virus quantification for monitoring of immunomodulation with biologic compounds in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 1 juill 2022;61(7):2815-25.

151. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, Ruiz-Merlo T, Parra P, López-Medrano F, *et al.* Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2019;19(4):1139-49.

152. Doberer K, Schiemann M, Strassl R, Haupenthal F, Dermuth F, Görzer I, *et al.* Torque teno virus for risk stratification of graft rejection and infection in kidney transplant recipients—A prospective observational trial. *Am J Transplant.* août 2020;20(8):2081-90.

153. Maggi F, Focosi D, Stazu M, Bianco G, Costa C, Macera L, *et al.* Early Post-Transplant Torquetenovirus Viremia Predicts Cytomegalovirus Reactivations In Solid Organ Transplant Recipients. *Sci Rep.* déc 2018;8(1):15490.

154. van Rijn AL, Roos R, Dekker FW, Rotmans JI, Feltkamp M. Torque teno virus load as marker of rejection and infection in solid organ transplantation - A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 3 sept 2022;e2393.

155. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients-Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant.* sept 2019;33(9):e13512.

156. Humar A, Snyderman D, AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* déc 2009;9 Suppl 4:S78-86.

157. Razonable R. Direct and indirect effects of cytomegalovirus: can we prevent them? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* janv 2010;28(1):1-5.

158. Ramanan P, Razonable RR. Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation: A Review. *Infect Chemother.* sept 2013;45(3):260-71.

159. Egli A, Binet I, Binggeli S, Jäger C, Dumoulin A, Schaub S, *et al.* Cytomegalovirus-specific

T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *J Transl Med.* 9 juin 2008;6:29.

160. Yong MK, Lewin SR, Manuel O. Immune Monitoring for CMV in Transplantation. *Curr Infect Dis Rep.* avr 2018;20(4):4.

161. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, Cobos I, Manuel O, Preiksaitis J, *et al.* Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* mai 2009;9(5):1214-22.

162. Tarasewicz A, Dębska-Ślizień A, Rutkowski B. Clinical Utility of QuantiFERON-Cytomegalovirus Test in Management of Kidney Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings.* juin 2016;48(5):1650-3.

163. 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.* nov 2010;42(9):3574-7.

164. Andreani M, Albano L, Benzaken S, Cassuto E, Jeribi A, Caramella A, *et al.* Monitoring of CMV-Specific Cell-Mediated Immunity in Kidney Transplant Recipients With a High Risk of CMV Disease (D+/R-): A Case Series. *Transplantation Proceedings.* janv 2020;52(1):204-11.

165. Deborska-Materkowska D, Perkowska-Ptasinska A, Sadowska A, Gozdowska J, Cizek M, Serwanska-Swietek M, *et al.* Diagnostic utility of monitoring cytomegalovirus-specific immunity by QuantiFERON-cytomegalovirus assay in kidney transplant recipients. *BMC Infect Dis.* 16 avr 2018;18(1):179.

166. Touinssi M, Gallian P, Biagini P, Attoui H, Vialettes B, Berland Y, *et al.* TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. *J Clin Virol.* mai 2001;21(2):135-41.

167. Görzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* mars 2014;33(3):320-3.

168. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, Rodríguez-Goncer I, Andrés A, Navarro D, *et al.* Early kinetics of Torque Teno virus DNA load and BK polyomavirus viremia after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis.* avr 2020;22(2):e13240.

169. Strassl R, Schiemann M, Doberer K, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Eskandary F, *et al.* Quantification of Torque Teno Virus Viremia as a Prospective Biomarker for Infectious Disease in Kidney Allograft Recipients. *J Infect Dis.* 15 oct 2018;218(8):1191-9.

170. Ruiz P, Martínez-Picola M, Santana M, Muñoz J, Pérez-Del-Pulgar S, Koutsoudakis G, *et al.* Torque Teno Virus Is Associated With the State of Immune Suppression Early After Liver Transplantation. *Liver Transpl.* févr 2019;25(2):302-10.

171. Solis M, Velay A, Gantner P, Bausson J, Filippattu A, Freitag R, *et al.* Torquetenovirus viremia for early prediction of graft rejection after kidney transplantation. *Journal of Infection.* juill 2019;79(1):56-60.

172. Doberer K, Hauptenthal F, Nackenhorst M, Bauernfeind F, Dermuth F, Eigenschink M, *et al.* Torque Teno Virus Load Is Associated With Subclinical Alloreactivity in Kidney Transplant Recipients: A Prospective Observational Trial. *Transplantation.* 1 sept 2021;105(9):2112-8.

173. Simonetta F, Pradier A, Masouridi-Levrat S, van Delden C, Giostra E, Morard I, *et al.* Torque Teno Virus Load and Acute Rejection After Orthotopic Liver Transplantation. *Transplantation.* juill 2017;101(7):e219-21.

174. Frye BC, Bierbaum S, Falcone V, Köhler TC, Gasplmayr M, Hettich I, *et al.* Kinetics of Torque Teno Virus-DNA Plasma Load Predict Rejection in Lung Transplant Recipients.

Transplantation. avr 2019;103(4):815-22.

175. Gallais F, Renaud-Picard B, Solis M, Laugel E, Soulier E, Caillard S, *et al.* Torque teno virus DNA load as a predictive marker of antibody response to a three-dose regimen of COVID-19 mRNA-based vaccine in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* oct 2022;41(10):1429-39.

176. Singh N. Late-onset cytomegalovirus disease as a significant complication in solid organ transplant recipients receiving antiviral prophylaxis: a call to heed the mounting evidence. *Clin Infect Dis.* 1 mars 2005;40(5):704-8.

177. Lowance D, Neumayer HH, Legendre CM, Squifflet JP, Kovarik J, Brennan PJ, *et al.* Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N Engl J Med.* 13 mai 1999;340(19):1462-70.

178. Steininger C, Kundi M, Kletzmayr J, Aberle SW, Popow-Kraupp T. Antibody maturation and viremia after primary cytomegalovirus infection, in immunocompetent patients and kidney-transplant patients. *J Infect Dis.* 1 déc 2004;190(11):1908-12.

179. Steininger C. Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clinical Microbiology and Infection.* 1 oct 2007;13(10):953-63.

180. Pongsakornkullachart K, Chayakulkeeree M, Vongwiwatana A, Kantakamalakul W, Skulratanasak P, Phoompoung P. QuantiFERON-Cytomegalovirus Assay for Prediction of Cytomegalovirus Viremia in Kidney Transplant Recipients: Study From High Cytomegalovirus Seroprevalence Country. *Front Cell Infect Microbiol.* 12 mai 2022;12:893232.

181. Gliga S, Korth J, Krawczyk A, Wilde B, Horn PA, Witzke O, *et al.* T-Track-CMV and QuantiFERON-CMV assays for prediction of protection from CMV reactivation in kidney transplant recipients. *Journal of Clinical Virology.* août 2018;105:91-6.

182. Krawczyk A, Ackermann J, Goitowski B, Trenscher R, Ditschkowski M, Timm J, *et al.* Assessing the risk of CMV reactivation and reconstitution of antiviral immune response post bone marrow transplantation by the QuantiFERON-CMV-assay and real time PCR. *J Clin Virol.* mars 2018;99-100:61-6.

183. Kulifaj D, Durgueil-Lariviere B, Meynier F, Munteanu E, Pichon N, Dubé M, *et al.* Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *Journal of Clinical Virology.* 1 août 2018;105:118-27.

184. Usta M, Dilek K, Ersoy A, Ozdemir B, Mistik R, Vuruskan H, *et al.* Prevalence of transfusion transmitted virus infection and its effect on renal graft survival in renal transplant recipients. *Scand J Urol Nephrol.* 2002;36(6):473-7.

185. Abraham P, John GT, Raghuraman S, Radhakrishnan S, Thomas PP, Jacob CK, *et al.* GB virus C/hepatitis G virus and TT virus infections among high risk renal transplant recipients in India. *Journal of Clinical Virology.* 1 sept 2003;28(1):59-69.

186. Kulifaj D, Tilloy V, Scaon E, Guerin E, Essig M, Pichon N, *et al.* Viral metagenomics analysis of kidney donors and recipients: Torque teno virus genotyping and prevalence. *Journal of Medical Virology.* déc 2020;92(12):3301-11.

187. Grenda R. Torque teno (TTV) viral load as a biomarker of immunosuppressive strength after kidney transplantation in children. *Pediatr Nephrol.* 1 janv 2021;36(1):1-3.

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.

Evaluation du risque d'infection à cytomégalo virus du sujet transplanté rénal R+ par le test QuantiFERON®-CMV et la PCR Torque teno virus.

Le cytomégalo virus (CMV) est le virus le plus fréquemment rencontré en transplantation d'organes. Le QuantiFERON®-CMV (QF-CMV) est un test commercial permettant l'évaluation de la réponse cellulaire T CD8+ anti-CMV en routine. La charge virale Torque teno virus (TTV) a également été proposée en tant que biomarqueur d'immunodépression globale. Dans une cohorte multicentrique nationale prospective de 64 transplantés rénaux séropositifs pour le CMV (R+), nous avons analysé la valeur du QF-CMV (QF-Ag ou QF-Mg) et de la charge virale TTV, seuls ou en combinaison, à prédire le risque de réactivation à CMV ($\geq 3 \log_{10}$ UI/ml) dans la première année post-greffe. Les valeurs prédictives du QF-CMV (QF-Ag ou QF-Mg) à M1 et du TTV à J0 ou M1 indiquent que ces marqueurs présentent une meilleure performance pour prédire un contrôle de la virémie qu'une réactivation à CMV. Par ailleurs, les analyses de survie suggèrent que le QF-Mg serait plus performant que le QF-Ag pour stratifier le risque de réactivation à CMV. Avec les seuils conventionnels (QF-Ag=0,2 UI/ml, QF-Mg=0,5 UI/ml et TTV=3,45 \log_{10} copies/ml), la combinaison QF-Ag et TTV ou QF-Mg et TTV ne semble pas apporter une meilleure prédiction du contrôle de la virémie à CMV que l'analyse séparée de chaque marqueur. En utilisant des seuils optimisés définis à l'aide de courbes ROC, la combinaison QF-Mg et TTV permet d'atteindre une sensibilité et des valeurs prédictives négatives de 100% pour la réactivation à CMV entre M1 et M4 et M1 et M12. Ainsi, un QF-Mg $\geq 1,29$ UI/ml associé à une charge virale TTV $< 4,26 \log_{10}$ copies/ml à M1 semble présenter une performance légèrement supérieure que le QF-Mg seul ou la charge virale TTV seule pour la prédiction du contrôle de la virémie à CMV. La combinaison QF-Mg et TTV pourrait être utile dans le suivi du patient greffé rénal R+ pour identifier les patients à faible risque de réactivation à CMV dans la première année post-transplantation.

Mots-clés : CMV, QuantiFERON®-CMV, TTV, transplantation rénale

QuantiFERON®-CMV assay and Torque teno virus viremia in prediction of cytomegalovirus reactivation in R+ kidney transplant recipients.

Cytomegalovirus (CMV) is the most frequent infectious complication following solid organ transplantation. The QuantiFERON®-CMV (QF-CMV) is a commercially available assay that allows the assessment of CD8+ T-cell responses in routine diagnostic laboratories. Torque teno viruses (TTV) viremia has also been proposed as a biomarker of functional immunity in the management of kidney transplant recipients (KTR). In a prospective national multicenter cohort of 64 CMV-seropositive (R+) KTR, we analyzed the value of QF-CMV (QF-Ag or QF-Mg) and TTV load, alone or in combination, in predicting the risk of CMV reactivation ($\geq 3 \log_{10}$ IU/ml) in the first post-transplant year. The predictive values of QF-CMV (QF-Ag or QF-Mg) at M1 and TTV load at D0 or M1 indicate that these markers perform better in predicting CMV viremia control than CMV reactivation. Furthermore, survival analyses suggest that QF-Mg would perform better than QF-Ag in stratifying the risk of CMV reactivation. Using conventional cut-offs (QF-Ag=0.2 IU/ml, QF-Mg=0.5 IU/ml, and TTV=3.45 \log_{10} copies/ml), the combination of QF-Ag and TTV or QF-Mg and TTV does not appear to provide better prediction of CMV viremia control than separate analysis of each marker. Using optimized cut-offs defined with ROC curves, the combination of QF-Mg and TTV had 100% sensitivity and 100% negative predictive values for CMV reactivation between M1 and M4 or M1 and M12. Thus, a QF-Mg ≥ 1.29 IU/ml combined with TTV load $< 4.26 \log_{10}$ copies/ml at M1 appears to have slightly better performance in predicting CMV viremia control than QF-Mg alone or TTV load alone. The combination of QF-Mg and TTV load could be useful in identifying R+ KTR at low risk of CMV reactivation during the first post-transplant year.

Keywords: CMV, QuantiFERON®-CMV, TTV, kidney transplantation

