



**HAL**  
open science

# Caractéristiques et analyse chronologique des infections à CMV conduisant à une résistance aux antiviraux, étude rétrospective mono-centrique du CHU de Bordeaux

Mathieu Acquier

► **To cite this version:**

Mathieu Acquier. Caractéristiques et analyse chronologique des infections à CMV conduisant à une résistance aux antiviraux, étude rétrospective mono-centrique du CHU de Bordeaux. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02985999

**HAL Id: dumas-02985999**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02985999>**

Submitted on 2 Nov 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux  
U.F.R DES SCIENCES MEDICALES

Année 2020

N°

Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par Mathieu ACQUIER  
Né le 07 Juin 1993, à Lyon

Le 24 Septembre 2020 à BORDEAUX

**Caractéristiques et analyse chronologique des infections à CMV  
conduisant à une résistance aux antiviraux, étude rétrospective  
mono-centrique du CHU de Bordeaux**

Co-Directeurs de thèse :

Madame le Docteur KAMINSKI Hannah

Monsieur le Professeur COUZI Lionel

- Jury -

Monsieur le Professeur MERVILLE Pierre, Président

Monsieur le Professeur CAZANAVE Charles, Rapporteur

Monsieur le Professeur COMBE Christian, Membre du Jury

Monsieur le Docteur GRUSON Didier, Membre de Jury

Madame le Docteur KAMINSKI Hannah, co-Directrice

Monsieur le Docteur COUZI Lionel, co-Directeur

## **Remerciements**

### **A Monsieur le Professeur Pierre Merville, Président du jury**

Pr Merville, vous me faites l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail venant clôturer 4 ans de formation d'internat. Merci pour vos enseignements, que ce soit au niveau théorique ou au lit du malade, riche en pédagogie. Je suis admiratif de l'implication que vous mettez dans la formation des internes et des externes en médecine. De plus, avoir un expert national du sujet en tant que président est une réelle chance pour moi. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

### **A Monsieur le Professeur Charles Cazanave, Rapporteur de thèse et Membre du jury**

Charles, tu me fais l'honneur de rapporter et de juger ce travail. Ton expertise en infectiologie est un atout considérable pour juger ce manuscrit. Tu dois probablement le savoir mais travailler à tes côtés est un véritable plaisir, toujours dans la joie, la bonne humeur et surtout l'humour. Je reconnais la chance que j'ai eue d'avoir été ton interne. Sois assuré de mon profond respect et de toute ma considération.

### **A Monsieur le Professeur Christian Combe, Membre du Jury**

Vous me faites l'honneur de juger aujourd'hui ce travail. J'espère avoir tiré le maximum de votre rigueur, de votre professionnalisme et surtout de votre vision toujours centrée sur le patient en priorité. Vous m'avez beaucoup appris durant ces années d'internat. J'ai apprécié travailler sur ce « cas mystère » avec vous, cela restera un moment fort de mon internat. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance et ma considération.

### **A Monsieur le Professeur Didier Gruson, Membre du jury**

Vous me faites l'honneur de juger mon travail et je vous en suis reconnaissant. Je vous remercie aussi pour la confiance que vous m'avez accordée en me permettant de rejoindre votre équipe en novembre, je ferai tout pour être à la hauteur. J'ai hâte d'apprendre de nos échanges durant ces deux prochaines années. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance et ma considération.

**A Madame le Docteur Hannah Kaminski, co-Directrice de thèse et membre du jury**

Merci pour tout. Hannah, du début de mon internat avec cette première présentation sur le *Clostridium Difficile* à maintenant, tu as toujours été là pour m'aider, m'encadrer, me corriger, m'apprendre, me soutenir. Tu es très probablement la personne la plus importante dans ma formation ces 4 dernières années et je t'en remercie. Tu as été plus que disponible pour m'aider dans ce projet, comme dans le reste. En dehors du professionnel, tu es une personne que j'estime beaucoup et je suis ravi que nous soyons devenus amis. Pour tout ceci, un grand merci.

**A Monsieur le Professeur Lionel Couzi, co-Directeur de thèse et membre du jury**

Je te remercie grandement d'avoir accepté de diriger mon travail de thèse sur un sujet qui te tient particulièrement à cœur. Je te remercie pour ta confiance, ta disponibilité et l'encadrement que j'ai reçu pour mener à bien ce travail. Les heures de discussion que nous avons passées sur ce projet ont été précieuses pour moi, tant pour la progression du travail que pour mon enseignement. Ce travail ne serait pas la moitié de ce qu'il est sans toi. L'étendue de tes connaissances, ton sens clinique, ton souci du détail, ton management des équipes, forcent mon admiration, ainsi que tes petits pas de claquettes légendaires. Sois assuré de mon profond respect et de toute ma considération.

**Merci au Docteur Garrigue**, qui a participé à la réalisation de ce travail, votre point de vue de virologue apporte une expertise précieuse à ce projet.

**A toutes les personnes qui m'ont aidé à apprendre, à progresser, à avancer tout au long de l'internat et aux côtés desquelles j'ai adoré travailler,**

*A l'équipe de Maladies infectieuses de Bayonne* : Tout d'abord au Docteur Marc-Olivier Vareil, qui a été le premier exemple professionnel que j'ai rencontré. Tes connaissances immenses, ta bienveillance envers moi, l'exemplarité de ton attitude auprès des patients m'ont marqué pour le reste de mon internat, et j'espère pour le reste de mon exercice professionnel. Au Docteur Heidi Wille, qui m'a beaucoup appris durant ce même stage, et qui j'espère m'a transmis un peu de sa rigueur et de son perfectionnisme. Heidi et Marco, vous m'avez fait confiance dès mon premier semestre et j'aimerais vraiment avoir la chance de travailler de nouveau avec vous. J'ai aussi durant ce premier semestre une pensée pour le Docteur Elisa Maury, avec qui j'ai eu la chance de travailler, même si ce fut bref, j'ai adoré ta bonne humeur en gardant ton professionnalisme. Merci à toute l'équipe paramédicale d'avoir été indulgents à mes débuts, quand je prescrivais du Previscan trois fois par jour... On a bien rigolé que ce soit dans le service, ou au Xurasko ! Et surtout merci à mes co-internes Nilo qui m'a fait découvrir son beau Pays Basque, Le grand Cerou, et Camille Kaze avec qui j'ai créé une belle amitié.

*A l'équipe de Transplantation Rénale du CHU* : au Docteur Karine Moreau qui m'a montré que quoi qu'il arrive on a toujours le temps de manger à l'internat, et à mes premiers CCA Benjamin, et Aless, un duo pas classique mais qui ont toujours montré une grande bienveillance ; vous m'avez accueilli dans ce petit monde de la Néphrologie Bordelaise, à bras ouvert. Merci à l'équipe infirmière et aide-soignante, représentée par Camille ou Marion dans mon esprit, mais toute l'équipe a été vraiment super avec moi, petit piou-piou débarquant dans ce grand Tripode. Merci à mes co-internes, Romane pour ses débats enflammés, Petitou qui restera mon compère de l'internat, et Emmanuel, discret et atypique mais qui est devenu un ami important que j'ai pu retrouver à la Réunion.

*A l'équipe de Dialyse du CHU* : Seb, un phénomène à part, par son humour et sa sympathie, mais aussi pour ses grandes qualités pédagogiques ; Renaud pour sa grande patience à essayer de nous transmettre sa passion pour les troubles ioniques ; Yahsou pour nous inculquer sa grande expertise néphrologique, mais aussi pour sa gentillesse et sa bonne humeur (et nos discussions surf) ; La Patronne Valérie, une patronne juste, bienveillante,

marrant, que tout le monde respecte, à juste titre, la dialyse ne sera plus du tout pareil après ton départ ; Simon alias Bernard Delmas, le plus gentil des CCA qu'on puisse avoir, qui à part sa lenteur légendaire a été un chef parfait pour moi. Que dire de l'équipe paramédicale de dialyse, qui nous en apprend autant que les chefs lors des débuts dans ce monde si spécial, et qui reste dans la bonne humeur malgré nos erreurs de novice.

*A l'équipe de Maladies infectieuses du 4<sup>ème</sup> Aile 1* : Au Docteur Hervé Dutronc, pilier sans faille de l'infectiologie du CHU, d'une expertise professionnelle qui n'a d'égale que sa gentillesse ; au Professeur Neau, merci pour la confiance que vous m'avez accordé pour l'inscription au DESC ; A Mathilde, un médecin d'une qualité que j'ai rarement rencontrée, accompagnée d'une douceur et de grandes qualités pédagogiques, merci pour ce semestre en ta compagnie. Merci à l'équipe para médicale, probablement la meilleure ambiance dans laquelle j'ai eu l'occasion de travailler. Merci à mes co-internes Manon, Olivier, Claire et Maeva, pour ce semestre génial et cette ambiance de travail excellente.

*A l'équipe de Néphrologie du CHU* : Merci à Claire Rigothier, maman bienveillante dans le service, nouvellement professeur, et qui le mérite tant ; Aurore, amie et co-interne au début de mon internat, qui est devenue ma chef, toujours avec le sourire et dont l'efficacité et la justesse forcent l'admiration. Merci aux équipes paramédicales, d'une aide précieuse pour faire face à des situations compliquées, tout en gardant leur bonne humeur, représentée dans mon esprit par la déconne de Suarez. Merci à mes co-internes Marine et Manon pour la bonne ambiance, Hadrien atypique co-interne des îles, pour avoir été toujours de bonne humeur malgré la pile de courrier qui s'accumulait, mais surtout à Henry Dupuis, co-interne puis ami qui m'a le plus appris probablement, et notamment à toujours partir du village.

*A l'équipe de Réanimation Médicale du CHU* : Merci au Pr Hilbert et au Pr Vargas pour vos visites dans la bonne ambiance, au Pr Boyer pour ta grande expertise, et surtout à Charline qui m'a appris la rigueur de la réanimation avec gentillesse et bienveillance, Benjamin qui en plus d'être un vrai exemple professionnel tente (avec difficultés) de me faire devenir meilleur sur bien d'autres plan ; Merci à Nam Bui d'être Nam bui, tout simplement une légende. A Suzanne pour ta rigueur, j'ai peu travaillé avec toi mais ta réputation te suit, j'ai hâte. Merci à cette équipe extraordinaire de CCA, Charlotte en tête qui a été une grande sœur durant 6 mois et qui m'a donné envie de faire de la réanimation, au grand Max Poteau,

un ami, un exemple pour tout interne de réa, qui force l'admiration, LE réanimateur ; enfin à Alex Gros, CCA le plus drôle de mon internat, qui n'en reste pas moins pédagogue, efficace et pertinent dans sa pratique. J'espère que Pierrot et moi, on sera à la hauteur, mais la barre est vraiment très haute. Enfin merci à Odile, maman de la réanimation, qui marque tous les internes par son expérience, sa sympathie, son humour, et ses histoires au café ! A toute l'équipe para-médicale de réa, sur qui on peut compter quoi qu'il arrive, bienveillante envers les novices de ce monde, et toujours prête à déconner. Merci à mes co-internes pour ce semestre au top, Emilie la maman des internes, Durand et Bouët l'équipe des T-Rex, Clequin toujours le mot pour rire, Camille et Greg le couple caché, Juliette, Florent et son legg day, Claire passée d'externe à co-interne au top, et surtout mon Baudinet, binôme de l'aile 2 toujours surexcité et de bonne humeur. Merci à mes co-internes de l'aile 1 les Clément, le jeune loup Bailly, Hamza et Steph Roure pour cette ambiance tellement détente, parfait pour un dernier semestre.

*A l'équipe du Laboratoire de Microbiologie du CHU Saint Pierre à la Réunion : Merci à Julien et Nael pour la transmission de vos connaissances microbiologiques, et particulièrement Nael pour avoir été présent pour Vicky et moi tout le semestre (avec ce bon vieux Manu) ; Sandrine pour ta rigueur. A Vicky merci de ta bonne humeur durant ces longues longues longues après-midis. Merci aux techniciens, Bernard, Odile, Philippe (X2), Marie, Mag et toute l'équipe pour m'avoir fait découvrir ce côté si accueillant de la Réunion.*

### **A mes amis,**

Au carré d'As, Harry, Papet et Alart, mes meilleurs amis, vous êtes comme des frères pour moi. Merci pour toutes ces années, on a grandi ensemble, un lien incassable.

A Lou, merci. Merci pour tout ce qu'on a vécu ensemble, je ne serai pas le même sans toi.

A mes amis lyonnais,

Dudu, Vinso, Bazou, La tuff frère d'atelier, Mehdi B, Lechenet, Breacky, Mariller, Francisco, Dudu bis. Je n'aurais pas pu imaginer une meilleure équipe pour passer ces années de fac,

j'en garderai de tellement bons souvenirs. A Noémie ma binôme d'Hippocrate, ainsi qu'à mes camarades du Cambodge Marine Coline et Pauline, souvenirs inoubliables !

A mes amis Lambert et Rudy, qui prouvent que l'amitié peut ne pas être mise à mal par la distance.

A mes amis Bordelais,

Fefe, Alix, Mathilde, Allenet, Camille Kaze, Jean, Arnaud, Coupet, PL, Papax, DJ Madel, Mathilde, Clara, la triplète Hugo Arthur et Pfirmann, Juliette, Nico, Marina et Ben, Marie et Miro. Merci pour ces 4 années d'internat, pleines de rires, de fêtes, de bonnes bouffes entre amis.

Au Clos,

Popo, Marie, Jarry, Maelle, Doublet, Zozo, Alex, Charles, plus que des amis vous avez été une seconde famille pour moi, tellement important dans les moments difficiles du début et surtout dans les moments de joie au quotidien. Je ne pouvais pas rêver mieux, ces 2 ans de collocation resteront gravés.

**A ma famille,**

A mes grands-parents, Claude et Charly, merci pour tout, les semaines de révisions chez vous resteront comme d'excellents souvenirs dans mon parcours. A Jeanine et Paul, comment être des grands-parents plus aimant et d'un plus grand soutien que vous, c'est juste impossible, merci mille-fois.

A mes parents

J'ai tellement de chance de vous avoir, un père atypique mais des plus extraordinaires, une singularité qui me fascine ; une mère à qui je ne vois aucun défaut, un exemple de bienveillance et d'amour que j'admire tellement ; des parents à qui je dois tout et que je remercierai toute ma vie de l'éducation et de l'amour qu'ils m'ont donné.



A mon grand frère

On a partagé toute notre jeunesse, et particulièrement nos études de médecine. Mon binôme en tout, mon meilleur ami, c'est toi qui m'a conduit vers la médecine. Merci pour ta personnalité, elle a égaillé ma jeunesse, ne change pas. Merci à Justine, de rendre mon frère heureux.

A Sarra

Avec qui je veux passer ma vie, merci d'être là tous les jours dans ma vie, tu l'illuminés tout simplement. Je t'aime.

Ces remerciements sont longs, mais c'est pour moi, qui suis assez pudique sur mes sentiments, une des seules occasions de le faire. Merci à tous ceux que je n'ai pas cités ici et qui ont pu rendre mon quotidien meilleur, rien que par une discussion égaillée ou bienveillante.

## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>9</b>
<b>Index des tableaux</b> .....	<b>10</b>
<b>Index des figures</b> .....	<b>10</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>11</b>
<b>Résumé de l'article</b> .....	<b>12</b>
<b>Introduction : l'infection à CMV chez le transplanté d'organe solide</b> .....	<b>13</b>
<b>Revue de la littérature : Les infections à CMV « compliquées » chez le patient transplanté d'organe solide</b> .....	<b>24</b>
<b>Références</b> .....	<b>34</b>
<b>Article original en cours de soumission</b> .....	<b>38</b>
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	<b>69</b>
<b>Serment d'Hippocrate</b> .....	<b>71</b>

## **Index des tableaux**

Tableau 1 : Prévention d'infection à CMV chez le patient transplanté rénal.....	21
Tableau 2 : Facteurs associés à des difficultés d'éradication virale. ....	26
Tableau 3 : Facteurs associés à une infection à CMV récidivante.....	30
Tableau 4 : Facteurs associés à l'apparition de CMV résistants.....	33

## **Index des figures**

Figure 1 : Physiopathologie de l'infection à CMV .....	14
Figure 2 : Chronologie des infections chez le patient transplanté d'organe solide .....	16
Figure 3 : Atteinte des différents organes lors d'une maladie à CMV .....	18
Figure 4 : Mécanismes d'action des antiviraux et des résistances associées .....	22

## **Abréviations**

ATG : Anti-Thymocyte Globulins  
CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CMV : Cytomégalovirus  
CNI : Anti-calcineurine  
D : Donneur  
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire  
EOD : Early-Onset Infection/Disease  
GCV : Ganciclovir  
HLA : Human Leukocyte Antigen  
HR : Hazard ratio  
IC : Intervalle de confiance  
IL : Interleukine  
IV : Intraveineux  
LOD : Late-Onset Infection/Disease  
MPA : Acide mycophénolique  
mTORi : Inhibiteurs de mammalian target of rapamycine  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
QNAT : Quantitative acid nucleic testing  
R : Receveur  
RAN : Réseau Aquitaine Néphrologie  
TLR : Tool Like Receptor  
VGCV : Valganciclovir

## Résumé de l'article

**Introduction :** Les recommandations sur le CMV préconisent une recherche de résistance aux antiviraux chez les transplantés rénaux qui présentent les deux critères suivants : 1 / une exposition cumulative au (Val)ganciclovir ((V)GCV) > 6 semaines et 2 / un échec du traitement après >2 semaines de GCV à pleine dose. Les objectifs de cette étude étaient de décrire les caractéristiques, les facteurs de risque et l'évolution dans le temps des infections à CMV conduisant à une résistance aux antiviraux.

**Matériel et Méthodes :** Nous avons réalisé une étude de cohorte rétrospective de 313 patients transplantés rénaux qui ont présenté un premier épisode à CMV ayant nécessité un traitement antiviral d'octobre 2004 à décembre 2017. Des analyses de régression logistique et de Cox ont été effectuées pour identifier les facteurs de risque de persistance d'ADNémie CMV à 7 semaines de traitement, la récurrence à CMV et la mutation conférant une résistance aux médicaments antiviraux.

**Résultats :** Cinquante-huit (18 %) des 313 patients ont développé une ADNémie CMV persistante et 65 (21%) récurrence clinique. Les facteurs de risque d'ADNémie CMV persistante et de récurrence clinique étaient similaires : traitement par corticostéroïdes et globulines anti-lymphocytaires, statut sérologique D+ R-, lymphopénie, charge virale élevée et maladie à CMV. L'incidence d'une résistance aux antiviraux était de 6,3% (20/313). De plus, 30% des résistances aux antiviraux ont été détectées en dehors des critères de dépistage indiqués par les recommandations. Nous avons constaté que l'ADNémie persistante du CMV (HR = 6,25, IC95% 2,45-15,96, p <0,001) et la récurrence clinique (HR = 7,20, IC95% 2,57-18,09, p <0,001) étaient les seuls facteurs de risque associés au développement d'un mutant résistant aux antiviraux. L'ajout de la récurrence clinique aux deux critères actuels a amélioré de 10% la stratégie de dépistage de la résistance aux antiviraux.

**Conclusion :** Nous avons identifié un nouveau scénario menant à une résistance aux antiviraux associant une ADNémie persistante et récurrence clinique. Cette perspective impliquant une analyse chronologique de l'histoire de l'épisode à CMV pourrait permettre un diagnostic plus précoce de la résistance aux antiviraux.

**Mots clés :** cytomegalovirus ; transplantation rénale ; récurrence clinique ; mutation.

**Introduction:** CMV guidelines recommend testing for an antiviral drug resistance in kidney transplant recipients (KTR) who exhibit the two following criteria: 1/ a cumulative (Val)ganciclovir ((V)GCV) exposure >6 weeks and 2/ a treatment failure after >2 weeks of ongoing full dose (V)GCV. The objectives of this study were to describe the characteristics, the risk factors and the time course of CMV infections leading to antiviral drug resistance.

**Material and methods:** We performed a retrospective cohort study in 313 KTR treated for a first episode of CMV infection or disease from Oct 2004 to December 2017. Logistic and Cox regression analyses were performed for identifying risk factors of persistent CMV DNAemia, CMV recurrence, and antiviral drug resistance.

**Results:** Fifty-eight (18%) of the 313 KTR developed persistent CMV DNAemia and 65 (21%) clinical recurrence. The risk factors of persistent CMV DNAemia and clinical recurrence were similar: treatment with corticosteroid and anti-lymphocyte globulin, D+R- CMV serostatus, lymphopenia, high viral load and CMV disease. The incidence of an antiviral drug resistance was 6.3% (20/313). Importantly, 30% of antiviral drug resistances were detected outside the screening criteria indicated by the guidelines. We found that persistent CMV DNAemia (HR = 6.25, CI95% 2.45-15.96, p <0.001) and clinical recurrence (HR = 7.20, CI95% 2.57-18.09, p <0.001) were the only risk factors associated with the development of antiviral drug resistance. The addition of the clinical recurrence to the 2 current criteria improved the screening strategy of antiviral drug resistance by 10%.

**Conclusion:** We identified a new scenario leading to resistance to antivirals associating persistent CMV DNAemia and clinical recurrence. This perspective involving a chronological analysis of the history of the CMV episode could allow a better and earlier diagnosis of antiviral resistance.

**Keywords:** cytomegalovirus; kidney transplantation; clinical recurrence; antiviral drug resistance.

## Introduction : l'infection à CMV chez le transplanté d'organe solide

### *Le cytomégalovirus*

Le cytomégalovirus (CMV) humain est un virus membre de la sous-famille des *Beta-herpervirinae*, appartenant à la famille des *Herpesviridae*. C'est le plus grand des *herpes* virus, avec un ADN double-brin de 230 kilo bases et la possibilité de coder plus de 200 protéines virales, avec l'aide de la cellule hôte infectée. Les protéines de l'enveloppe sont impliquées dans les phénomènes d'attachement et de pénétration du virus ; elles sont aussi les cibles des anticorps neutralisants. Après pénétration du virus dans sa cellule cible, une infection comporte trois phases : la phase « très précoce » qui comporte la synthèse de facteurs de transcription ; la phase « précoce » dans les 24 premières heures suivant l'infection, conduisant à la synthèse d'une ADN polymérase virale fonctionnelle, permettant la synthèse de l'ADN viral, et de certaines protéines du tégment (pp65, pp52) ; puis vient la phase « tardive » et la synthèse des protéines structurales (gB, gH) (1).

Le principal mode de transmission du virus est par contact direct à travers les fluides corporels. Ceci explique la prévalence du CMV plus importante dans les pays à ressources limitées, en lien avec la promiscuité plus importante, qui permet une transmission aisée du virus (2).

La physiopathologie de l'infection à CMV est marquée par son lien avec le système immunitaire et son histoire naturelle est émaillée de plusieurs phases. Vient tout d'abord une primo-infection. La virémie ou dissémination sanguine (aussi appelée ADNémie lorsque sa détection se fait par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) permettant d'identifier la présence d'ADN virale) permet au virus d'atteindre ses organes cibles. Le CMV a un tropisme cellulaire très large, expliquant que tout organe peut être infecté. Par la suite, il a la capacité d'entrer en phase de latence (présence d'ADN viral en l'absence d'expression protéique), entrecoupée de phases de réactivations (infection active productive). Les mécanismes de latence sont mal connus. Les réinfections par une nouvelle souche sont rares mais restent possibles. La réactivation survient probablement de façon périodique et asymptomatique chez le sujet immunocompétent, mais aussi classiquement à la faveur d'une immunosuppression, d'une infection, d'un stress, d'une inflammation. La réactivation est

donc fortement corrélée à l'état des capacités immunologiques de l'hôte, et leur défaillance conduira à une ADNémie puis une maladie (3).

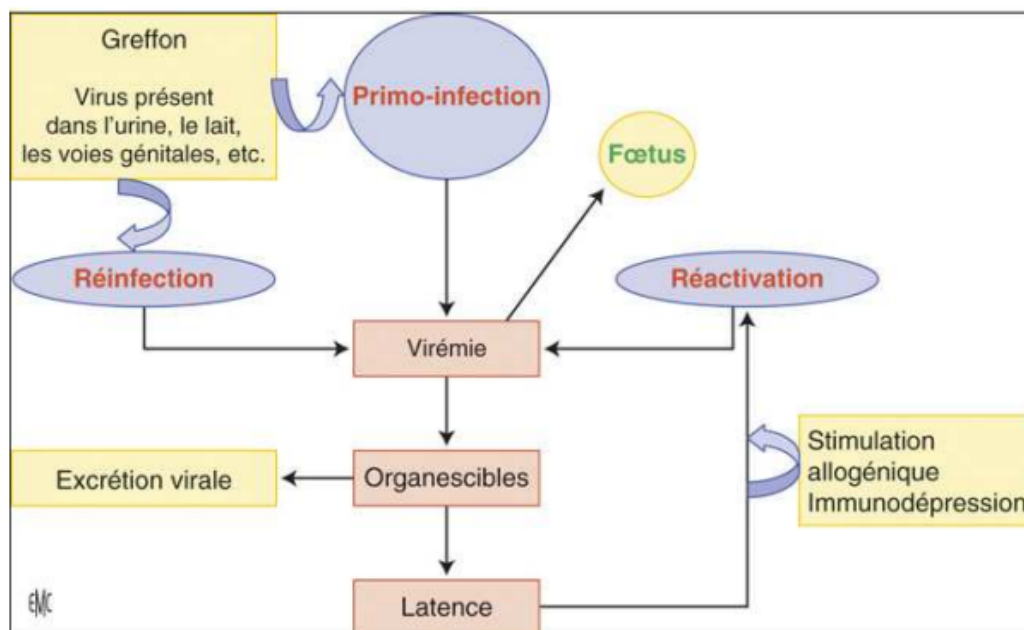


Figure 1 : Physiopathologie de l'infection à CMV. D'après Mazon (3)

### Mécanismes immunitaires de défense anti CMV et implications en transplantation rénale

La compréhension des mécanismes immunitaires impliqués est primordiale et les conséquences cliniques de cette physiopathologie sont importantes, avec la nécessité de prendre en compte plusieurs facteurs dans l'évaluation et la prise en charge des patients transplantés d'organe solide.

Concernant l'immunité innée, l'interaction du virus (gB et gH) avec certains *Toll Like Receptors* (TLR 2 notamment) entraîne une sécrétion cytokinique et chémokinique par les cellules dendritiques. Il a notamment été prouvé qu'une mutation du TLR 2 entraînait une majoration de la durée de répllication virale chez les patients transplantés hépatiques (4). Cette sécrétion cytokinique a pour conséquence une activation des cellules *Natural Killer* (NK), cellules dont le rôle anti CMV est aussi majeur. En effet, il a été montré que l'activité

de ces cellules est inversement corrélée au nombre d'épisode d'infection à CMV chez le patient transplanté rénal (5).

En ce qui concerne l'immunité acquise humorale, on observe la présence d'anticorps neutralisant qui ciblent les glycoprotéines d'enveloppe notamment gB et gH. Il est connu que chez les patients transplantés rénaux, la séropositivité diminue le risque d'infection à CMV (6). Il s'agit là d'une piste de recherche importante de la lutte anti-CMV chez les transplantés d'organe, notamment via le développement d'un vaccin.

Enfin, la réponse immunitaire acquise cellulaire T est l'élément le plus important impliqué anti-CMV. Tout d'abord, les médiateurs de cette réponse immune T jouent un rôle majeur. Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  incluant les lymphocytes T CD4 + et CD8 +, ciblent principalement la protéine virale pp65 et le facteur de transcription IE1. Une autre population lymphocytaire T, les Lymphocytes T  $\gamma\delta$  exercent une activité anti-CMV spécifique. Il s'agit d'une sous-population lymphocytaire peu présente dans le sang circulant, principalement présente dans les muqueuses, notamment digestives. Cela fait déjà plusieurs années que notre équipe travaille sur leur implication dans le contrôle de l'infection à CMV. Il est maintenant bien démontré qu'après une infection à CMV et non aux autres pathogènes viraux, on observe une expansion de clones spécifiques anti-CMV (7). Une sous-population de LT  $\gamma\delta$ , les V $\delta$ 2neg  $\gamma\delta$  T présentent une expansion massive dans le sang périphérique du patient infecté, notamment chez le receveur d'une transplantation d'organe solide. Notre équipe a démontré que cette expansion dans le sang est à la fois corrélée à une résolution d'ADNémie à CMV plus fréquente et à une baisse de l'apparition de résistance du CMV chez 272 patients transplantés rénaux à risque d'infection à CMV (8).

La transplantation rénale implique des traitements immunosuppresseurs dans la prévention du rejet de l'organe transplanté. Celle-ci est plus ou moins importante en fonction des situations et son évaluation va être importante vis-à-vis de la prise en charge anti-CMV.

Tout d'abord, le délai par rapport à la transplantation est important. En effet, l'immunosuppression est plus importante en général lors des 6 premiers mois au vu d'un risque de rejet plus élevé, ce qui entraîne un sur risque d'infection lors de cette période (9). Il a été prouvé que lorsque l'infection apparaissait à distance de la transplantation, l'infection à CMV était plus facilement contrôlée (10). L'hypothèse la plus probable serait



qu'il existe une immunité moins déprimée lorsque l'on se trouve à distance de la transplantation.

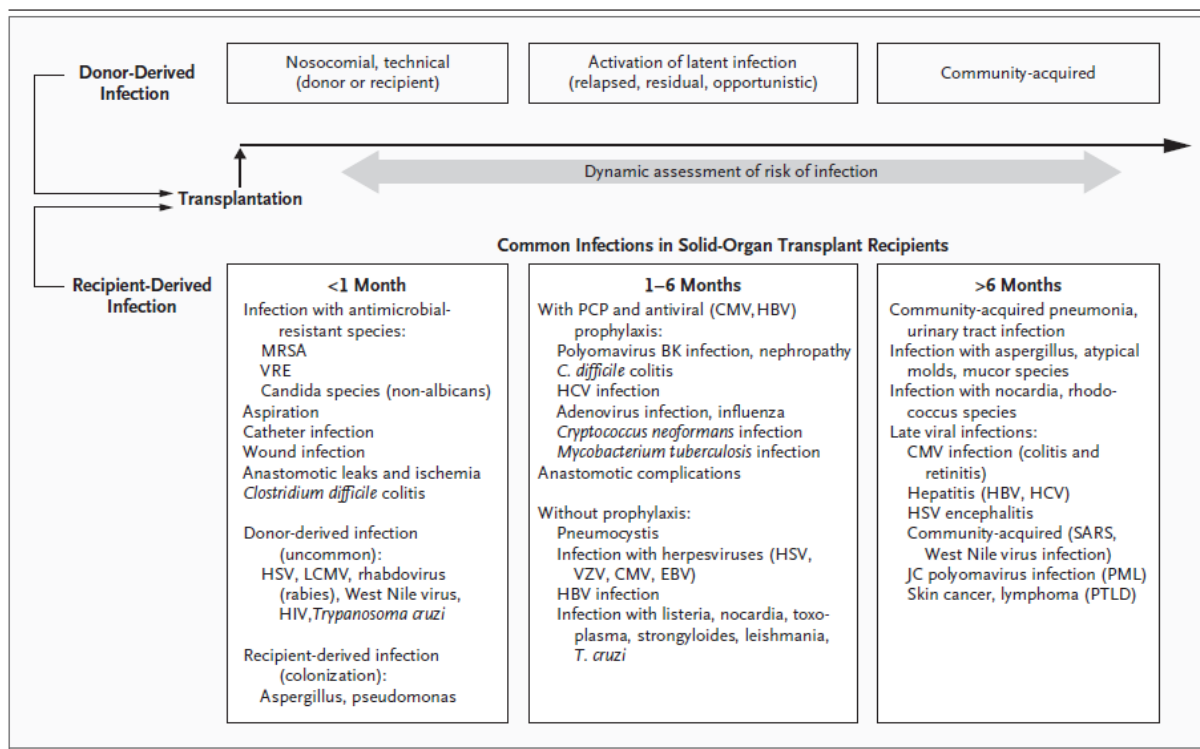


Figure 2 : Chronologie des infections chez le patient transplanté d'organe solide. D'après Fishman (9)

Cette chronologie est à confronter avec les épisodes de rejets qui surviennent au cours de l'histoire de greffe du patient, entraînant une majoration de l'immunosuppression et donc un risque infectieux plus grand. Une étude reprenant plus de 15 000 patients en cohorte rétrospective observait un risque majoré de survenue d'infection à CMV après un épisode de rejet (11). Toujours dans cette logique de balance immunosuppression et infection, le risque immunologique du patient transplanté entre en compte. Par exemple, il a été montré un sur-risque d'infection à CMV avec l'utilisation d'anti-thymocyte globulines (ATG) comparé à une immunosuppression plus faible comme les anti-IL2R (12). Enfin, le type d'organe solide transplanté rentre aussi en compte, avec notamment un sur risque d'infection à CMV, ou de récurrence chez les patients transplantés pulmonaires (13).

## *Généralités sur l'infection à CMV chez le patient transplanté d'organe solide*

L'infection par le CMV est actuellement l'infection virale la plus commune en transplantation d'organes solides, et notamment en transplantation rénale (14,15). Il a été décidé de manière consensuelle une distinction entre l'infection à CMV correspondant à une CMV ADNémie positive (détectée par PCR sur sang total, préférentiellement appelée QNAT pour « *quantitative acid nucleic testing* ») sans symptôme associé ; et la maladie à CMV correspondant à CMV ADNémie positive et présence de symptômes (16). La primo-infection est définie comme la première détection d'une infection à CMV chez un individu qui n'avait aucune preuve d'exposition au CMV avant la transplantation ; la récurrence à CMV est définie comme une nouvelle infection à CMV chez un patient présentant des preuves antérieures d'infection à CMV, qui n'a pas eu de virus détecté depuis au moins 4 semaines pendant la surveillance active (16).

En termes de pathogénicité, l'infection chez un patient immunocompétent est bénigne dans la grande majorité des cas, mais lorsqu'elle survient chez un patient immunodéprimé et notamment chez un patient transplanté d'organe solide, elle est un facteur important de morbi-mortalité. Le CMV exerce ses effets directs au moment de l'infection, pouvant aller d'un simple syndrome viral (classiquement fièvre, frissons, myalgies, leucopénie, thrombopénie et cytolysse hépatique) à une maladie invasive, avec atteinte d'organe. L'atteinte d'organe est très variable, avec le plus fréquemment la colite à CMV ou la pneumopathie à CMV, mais peut aussi plus rarement toucher d'autres organes comme le cœur, le cerveau, ou encore la vésicule biliaire (1).

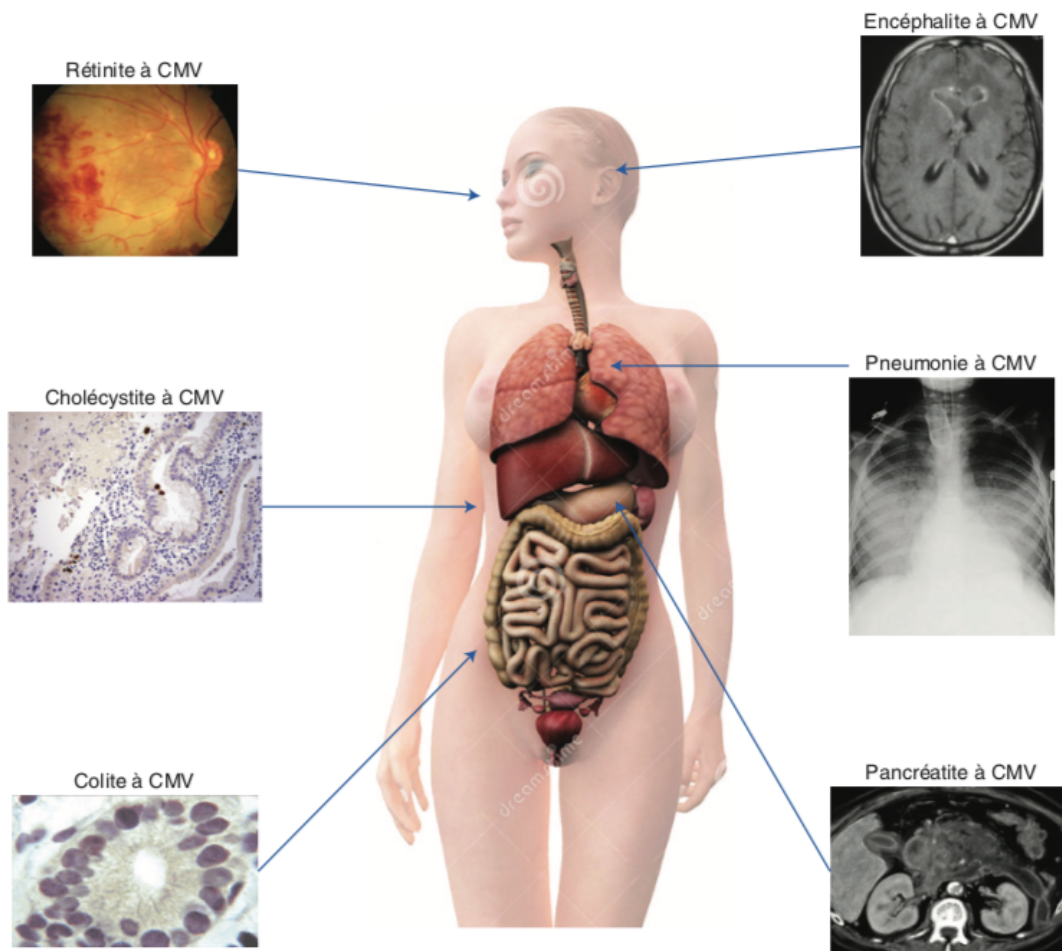


Figure 3 : Atteintes des différents organes lors d'une maladie à CMV.

Lui sont également reconnus des effets indirects entraînant une majoration des rejets et des pertes de greffons, des infections bactériennes ou fongiques, des événements cardio-vasculaires et autres chez les patients en contact avec l'agent viral (17).

Lorsque les signes clinico-biologiques font suspecter une infection à CMV, le diagnostic est par la suite microbiologique et plus précisément virologique. Le diagnostic d'ADNémie à CMV est recommandé grâce à la technique de QNAT, préférentiellement sur sang total. Cette dernière est standardisée et calibrée avec le *World Health Organization (WHO) international standard*, exprimée en UI/mL. Le seuil de sensibilité pour la positivité varie selon les centres, ainsi que le seuil permettant une quantification précise de la charge virale. Une technique est dite hautement sensible si le seuil de quantification est  $< 200$  UI/mL (18). Les autres méthodes de diagnostic, principalement utilisées sur des prélèvements de tissu, sont l'anatomopathologie avec recherche de l'effet pathogène direct, mais aussi par identification antigénique via l'immunohistochimie (gold standard).

## *Les stratégies de prévention des infections à CMV chez le patient transplanté d'organe*

Un aspect de la prise en charge actuelle consiste à diminuer l'incidence de l'infection à CMV en instaurant une stratégie préventive après la transplantation. Les facteurs principaux pouvant influencer le choix de cette stratégie préventive sont le statut sérologique à la greffe, le type d'organe transplanté, et enfin l'intensité de l'immunosuppression. Il existe classiquement quatre types de stratégies préventives, qui peuvent potentiellement être combinées.

La première est la stratégie dite de « prophylaxie universelle ». Elle est basée sur l'utilisation de valganciclovir (VGCV) 900 mg/jour adaptée à la fonction rénale. Chez les patients receveurs séronégatifs avant transplantation rénale recevant un greffon d'un donneur séropositif (D+R-), qui sont les plus à risque d'infection, cette prophylaxie est désormais utilisée durant 6 mois (19). Chez les patients séropositifs avant la transplantation rénale (R+), l'utilisation n'est que de 3 mois (20). Enfin chez les patients séronégatifs recevant un transplant rénal d'un donneur séronégatif (D-/R-) aucune prophylaxie n'est donnée (18).

La seconde stratégie dite « préemptive » est fondée sur une surveillance rapprochée de la PCR CMV sanguine une fois par semaine jusqu'à 3 mois post transplantation, puis 1 fois par mois jusqu'à 12 mois. Un traitement antiviral n'est donné que si la PCR se positive au-dessus d'un certain seuil quantitatif (18).

Une troisième stratégie combine une surveillance préemptive des PCR après prophylaxie universelle, mais elle n'a pas été évaluée lors d'essai clinique randomisé et à ce jour elle n'est pas recommandée.

Une stratégie potentielle de prévention repose sur l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR en de novo dans le traitement antirejet d'entretien. L'étude TRANSFORM, publiée dans le *Journal of American Society of Nephrology (JASN)* en 2018 est un essai multicentrique, randomisé sur 2037 receveurs de transplantation rénale, qui compare l'association en traitement d'entretien, de l'everolimus avec une exposition réduite aux inhibiteurs de la calcineurine (CNI) ou de l'acide mycophénolique (MPA) avec une exposition standard aux CNI. Sur le plan virologique, qui n'était pas l'objectif principal de l'étude, il a été montré une diminution de l'incidence des infections à CMV chez les patients traités par everolimus,

comparés au MPA (3,6% contre 13,3%) (21). De plus, une méta-analyse de 2017 publiée dans le même journal par Mallat *et al*, concluait à une diminution du risque d'infection à CMV chez les patients traités par inhibiteurs de mTOR comparés aux CNI (22). Parmi les études ayant analysé les infections à CMV comme critère de jugement principal avec l'utilisation des inhibiteurs de mTOR en de novo, on peut citer celle de Basso *et al* parue en 2018 dans *Transplant Infectious Disease*, incluant 273 patients R+, ne recevant pas de prophylaxie pour le CMV. Les patients étaient traités par everolimus ou MPA, associés à du tacrolimus et des corticoïdes. L'incidence d'une première infection ou maladie à CMV était plus basse chez les patients traités par everolimus (respectivement 2,5 vs 7,2 vs 33,7%,  $p=0,001$ ) (23). Un autre exemple est une étude parue dans *Transplant International* en 2018, menée par l'équipe de De Sandes-Freitas *et al*. Chez 115 patients induits par globulines anti-lymphocytaires qui suivaient un traitement immunosuppresseur sans corticoïdes, l'association everolimus et tacrolimus présentaient moins d'évènements en lien avec le CMV que les patients traités par tacrolimus et MPA après 3 ans de suivi (24). A ce jour les données disponibles montrent que l'utilisation des inhibiteurs de mTOR en *de novo* réduisent l'incidence des infections à CMV chez les transplantés rénaux séropositifs, mais il n'est pas formellement démontré que l'Everolimus pouvait remplacer en prévention de la maladie à CMV le Valganciclovir ou la stratégie préemptive.

Les deux principales stratégies, la stratégie avec prophylaxie universelle et la stratégie préemptive ont été évaluées et comparées par de nombreuses études. La tendance est plutôt en faveur de la stratégie prophylactique, notamment sur les conclusions de deux essais cliniques, que ce soit chez les patients dits « à risque d'infection à CMV » ou chez les patients R+ (20,25). L'une des différences majeures entre ces deux stratégies est le timing d'apparition de l'infection à CMV. La prophylaxie a dans la majorité des cas pour conséquence de retarder l'apparition de l'infection (> 3 mois), qui est nommée « *Late Onset Infection/Disease (LOD)* », au contraire de la stratégie préemptive où l'infection survient généralement dans les 3 premiers mois, nommée « *Early-Onset Infection/Disease (EOD)* ». Notre équipe a publié en 2015 une étude dans *l'American Journal of Transplantation (AJT)* montrant une clairance virale retardée, un taux de récurrence plus important, et un taux de d'apparition de mutants résistants plus important lors des EOD (10).

En ce qui concerne la transplantation rénale, les recommandations datant de la conférence de consensus de 2018 indiquent la possibilité de réaliser l'une ou l'autre sans les départager (18). Dans le centre de transplantation rénale du CHU de Bordeaux, la stratégie préemptive a été utilisée jusqu'à 2011, puis devant une plus grande simplicité de réalisation, la prophylaxie universelle a été adoptée. Le tableau 1 résume les caractéristiques des deux stratégies (26).

Tableau 1 : Prévention d'infection à CMV chez le patient transplanté rénal. D'après Kaminski (26).

	Prophylaxie universelle	Traitement préemptif
ADNémie précoce	Rare	Fréquente
Prévention de la maladie à CMV	Bonne efficacité	Bonne efficacité (moins chez les R+ ?)
CMV tardif (infection/maladie)	Fréquent	Rare
Résistance associée à une mutation ( <i>UL97</i> ou <i>UL54</i> )	Rare	Rare
Facilité d'utilisation	Facile	Fastidieux
Infections aux autres herpes virus	Prévention	Ne prévient pas
Autres infections opportunistes	Pourrait prévenir	?
Coût	Coût élevé du valganciclovir	Coût de la PCR
Tolérance	Effets secondaires du valganciclovir	Peu de toxicité
Prévention du rejet	Pourrait prévenir	?
Survie de greffon	Pourrait améliorer	Pourrait améliorer

### *Le traitement anti viral lors d'une infection à CMV chez le patient transplanté d'organe solide*

Le traitement de l'infection à CMV est bien connu et les modalités ont été explicitées dans la dernière conférence de consensus (18). Il est basé principalement sur l'utilisation de deux molécules de la même famille.

Le ganciclovir (GCV) est un analogue synthétique de la 2' -désoxyguanosine, qui agit en inhibant in vitro et in vivo la réplication des virus de l'herpès. Le GCV doit être triphosphorylé pour être actif et la 1° phosphorylation est faite par la kinase virale. L'activité antivirale du GCV se produit par inhibition de la synthèse de l'ADN viral, puisque le triphosphate de GCV s'incorpore dans l'ADN viral en remplacement du triphosphate de désoxyguanosine et empêche l'élongation de l'ADN par la polymérase du virus. Le VGCV est la forme permettant une bonne biodisponibilité par voie orale (3).

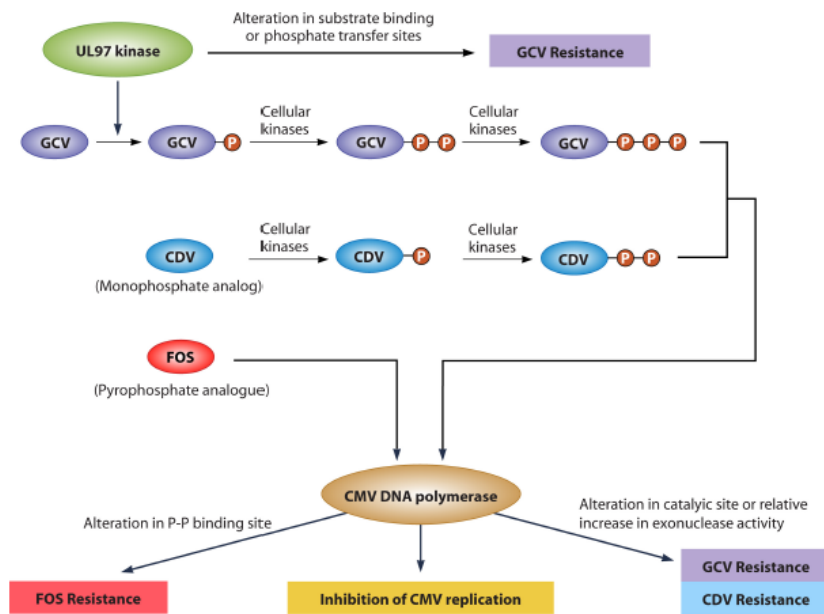


Figure 4 : Mécanismes d'action des antiviraux et des résistances associées. D'après Lurain (27).

Depuis l'essai randomisé VICTOR réalisé en 2007, l'utilisation de ganciclovir intraveineux (5 mg/kg/12h) ou de valganciclovir per os (900 mg/12h), adaptés à la fonction rénale en utilisant la formule de Cockcroft-Gault, est recommandée, avec néanmoins une préférence de la forme IV lorsque la présentation est sévère (28). Lors de l'essai où le schéma thérapeutique était de 21 jours de traitement à dose curative suivi de 28 jours de traitement à dose préventive (demi-doses), l'objectif principal qui était l'éradication de l'ADNémie à J21 était atteint de manière similaire dans le groupe GCV et dans le groupe VGCV, essai excluant les patients avec une infection sévère.

Le suivi du patient lors de l'infection se base d'une part sur la clinique et d'une autre sur la QNAT CMV qui est réalisée au moins une fois par semaine. Se pose la question de la durée de traitement, pour laquelle les recommandations proposent un traitement curatif de minimum de deux semaines et jusqu'à éradication de l'ADNémie. L'éradication est définie par l'obtention d'une ADNémie inférieure au seuil de quantification avec une technique de détection hautement sensible ou de deux négatives lors de l'utilisation de techniques moins sensibles. Le relais par un traitement antiviral prophylactique n'est plus recommandé (18).

Les autres options thérapeutiques non utilisées en première intention sont le foscavir IV, le cidofovir IV et ne seront pas détaillées ici. Elles sont principalement utilisées lors de situation faisant suspecter un virus résistant aux antiviraux de première ligne.

Les antiviraux ne sont pas sans effets secondaires (leucopénies, thrombopénies, diarrhées...), et il nous semble fondamental de souligner que le traitement antiviral ne reste qu'un traitement virostatique et n'est qu'un adjuvant de la réponse immune, qui est la véritable clef de la guérison de l'infection à CMV.



## Revue de la littérature : Les infections à CMV « compliquées » chez le patient transplanté d'organe solide

### *Problématique des infection/maladies à CMV à ADNémie persistantes*

Dans la majorité des épisodes à CMV traités, la clairance virale complète (indéteçtabilité de l'ADNémie) est atteinte dans les 49 jours de début du traitement. Dans l'essai VICTOR publié dans l'AJT en 2007 comprenant 321 patients dont 73% de transplantés rénaux, l'éradication virale à J21 du traitement était l'objectif principal. Il était atteint dans 45 à 48% des cas. A J49, l'éradication virale était atteinte chez 67 à 70% des patients. Le seuil pour définir l'éradication virale était 600 copies/mL. Si l'on définit un épisode avec ADNémie toujours déteçtable à J49 comme un épisode d' « ADNémie persistante », on l'observe donc chez environ 30% des patients de l'étude. Cependant, il s'agit d'une étude prenant en charge 97% de maladie à CMV et 3% d'infection à CMV, excluant les infections sévères, et enfin avec un schéma de traitement (3 semaines de traitement à dose curative puis 4 semaines à dose préventive) différent de la pratique recommandée qui est de poursuivre le traitement curatif jusqu'à la clairance virale complète. La population étudiée et les conclusions spécifiques sur cette problématique sont donc difficilement extrapolables à la pratique quotidienne. Lors de l'analyse, les auteurs ont tenté d'identifier des facteurs de risque d'échec d'éradication virale à J21 et à J49, seule une charge virale basale > 10000 copies/mL était statistiquement associée mais uniquement en analyse uni variée (28).

Par la suite, l'équipe dirigeant l'essai VICTOR a publié plusieurs articles avec des analyses complémentaires de cet essai clinique, après un suivi prolongé. Le premier publié dans l'AJT en 2009 s'intéresse particulièrement aux récides des infections à CMV, que nous décrivons plus en détail par la suite, mais dont le seul facteur de risque statistiquement significatif de récide est l'absence de clairance virale complète à J21 . Une ADNémie toujours déteçtable à J21 est donc associée à un taux de récide plus élevé (29). Ce lien entre les différentes infections à CMV « compliquées » est retrouvé dans une autre publication complémentaire à l'essai VICTOR publiée par Boivin *et al* retrouvant l'absence de clairance virale à J21 comme facteur de risque associé à l'apparition d'un CMV ganciclovir-résistant (30). Cette étude est décrite plus en détail par la suite.

Un autre article publié une nouvelle fois par la même équipe dans l'AJT en 2010, investigue l'effet du traitement immunosuppresseur sur l'éradication virale (31). Les auteurs

concluent que seules l'utilisation d'induction par Anticorps anti Lymphocyte T, l'utilisation de doses diminuées de CNI et enfin l'utilisation d'une double immunosuppression (vs une triple), étaient des facteurs associés à un taux plus élevé d'éradication virale à J21, mais pas à J49 (en analyse univariée). Un délai de survenu de l'infection supérieur à 60 jours par rapport à la date de transplantation était aussi un facteur impactant positivement sur l'éradication à J21 mais pas à J49. Les autres analyses concernant l'immunosuppression utilisée ne montraient pas d'effet significatif sur l'éradication virale à J21 ou J 49. Les auteurs concluent donc qu'un allègement de l'immunosuppression permettrait une éradication virale plus rapide, ce qui pourrait impacter sur l'évolution tardive de l'infection, mais sans preuve statistique concluante dans cette étude concernant l'éradication virale au terme des 49 jours de traitement. D'autres facteurs associés à l'éradication à J21 ont été soulignés par la même équipe analysant les données de l'essai VICTOR, notamment certains biomarqueurs inflammatoires ou des variants de la glycoprotéines gB du virus (32).

Deux études rétrospectives menées par notre équipe publiées dans l'AJT ont aussi apporté des informations à ce sujet. La première en 2012 comparant les stratégies préemptives et prophylactiques chez 112 patients receveurs D+ R-. 3% des patients traités en prophylactiques étaient en « ADNémie persistante » à 8 semaines contre 31% lors de l'utilisation de la stratégie préemptive ( $p=0.001$ ) (33). En 2016, il était comparé, chez 168 patients D+/R-, les infections précoces (EOD, < à 3 mois) et les infections tardives (LOD, > 3 mois). L'analyse statistique retrouvait que les temps médians d'obtention d'une clairance virale complète étaient allongés dans le groupe EOD (60 jours) comparés au groupe LOD (40 jours), avec une différence statistiquement significative ( $p<0.0001$ ). Le groupe EOD dépasse donc de manière importante le délai de 49 jours utilisé dans les autres études et contient donc une quantité importante de patients à « ADNémie persistante » (10).

Peu d'étude se sont donc intéressées prioritairement à la clairance virale en tant que critère de jugement, alors qu'il s'agit du critère de jugement principal dans le seul essai clinique jusqu'alors réalisé sur l'infection à CMV chez les transplantés d'organe solide. Nous citerons deux autres études qui sont plus détaillées ci-après, l'une montrant que la clairance virale lors du premier épisode d'infection à CMV est atteinte plus rapidement que celle lors d'un épisode de récurrence (34), et l'autre ayant observé une clairance virale complète plus fréquente lors de l'instauration d'un traitement anti-CMV dit sauvage face à un CMV mutant (35).

Le succès concernant l'éradication virale est pour autant un élément clé de l'anamnèse de l'histoire du CMV d'un patient transplanté d'organe solide, car son échec est associé comme nous allons le voir aux paragraphes suivants à d'autres événements péjoratifs liés au CMV comme les récurrences ou l'apparition de mutations. Le tableau 2 résume les facteurs associés à des difficultés d'éradication virale retrouvés dans la littérature.

Tableau 2 : Facteurs associés à des difficultés d'éradication virale.

Facteurs associés à des difficultés d'éradication virale		
<b>Général</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Délai entre la transplantation et l'infection à CMV court</li> <li>- Utilisation d'une stratégie préemptive</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Asberg et al. 2010 ; Kaminski et al. 2015</i></li> <li>- <i>Couzi et al. 2012</i></li> </ul>
<b>Immunologique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation d'ATG en induction</li> <li>- Doses d'anti-calcineurine élevées</li> <li>- Triple immunosuppression (vs double)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Asberg et al. 2010</i></li> </ul>
<b>Virologique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Charge virale initiale élevée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Asberg 2007</i></li> </ul>

### *Problématique des infections/maladies à CMV récurrentes*

La récurrence est définie par les critères d'une infection à CMV survenant chez un patient ayant eu une première infection antérieurement, et qui a atteint l'objectif d'éradication virale (16). Jusqu'aux nouvelles recommandations de 2018, un traitement prophylactique secondaire à la suite du traitement curatif de l'épisode d'infection à CMV était préconisé. Cependant, les mises à jour de celles-ci n'indiquent plus d'intérêt à utiliser un antiviral à dose prophylactique en prévention secondaire.

Un nombre plus important d'études se sont intéressées à l'évènement récurrence comme critère de jugement, ce qui nous permet de les classer selon l'approche qu'ils ont voulu souligner.

#### a. D'ordre général tout d'abord :

Les données répertoriées de l'essai VICTOR ont permis aux auteurs d'analyser les complications des infections/maladies à CMV. Une récurrence clinique au-delà de j49 a été trouvée dans 15,1% des cas et une récurrence virologique dans 30,0%, sans différence entre les groupes VGCV et GCV (p= 0,77). Dans une analyse de régression logistique multivariée, le

seul facteur prédictif indépendant de récurrence était l'échec d'éradication de l'ADNémie au 21<sup>ème</sup> jour (29). L'autre publication, l'année suivante, évalue l'impact des thérapies immunosuppressives sur l'apparition de récurrence virologique. En effet, on observait une réduction significative de récurrence virologique avec l'utilisation de tacrolimus par rapport à la ciclosporine, et par l'utilisation du MPA. L'utilisation d'ATG, l'utilisation de deux vs trois immunosuppresseurs ou encore l'utilisation de CNI à des taux diminués n'étaient pas des facteurs associés à une baisse du taux de récurrence de manière significative (31).

En 2010, Eid *et al* ont publié dans l'AJT une étude sur 26 patients D+/R- transplantés d'organe solide atteints d'une maladie à CMV invasive prouvée sur biopsie colorectale. 7 patients (27%) ont présenté une récurrence virologique ou clinique, et le seul facteur de risque significatif en analyse univariée était la présence d'une maladie étendue visualisée lors de l'endoscopie initiale (36).

En 2011, Helantera *et al* ont présenté dans un article publié dans le *Transplantation International* une cohorte rétrospective de 67 infections à CMV. L'objectif principal était l'étude des facteurs de risques de récurrence d'infection à CMV, et dans leur analyse multivariée, seul le retard de reprise de fonction du greffon ainsi que la charge virale initiale élevée étaient associés à un risque plus important d'apparition de récurrence (37).

En 2012, dans l'étude comparant les stratégies préemptives et prophylactiques publiée par L. Couzi *et al*, on observait un taux de récurrence de 23% dans le groupe préemptif et de 9% dans le groupe prophylactique, mais sans être statistiquement significatif ( $p=0.1$ ) (33).

En 2015, l'étude publiée par notre équipe citée précédemment concernant la comparaison des infections précoces ou tardives à CMV, on observait un risque de récurrence d'ADNémie significativement réduit après LOD (36%) par rapport à EOD (80%). Le risque de récurrence de maladie à CMV a également été réduit après LOD (3%) par rapport à EOD (30%) (10).

b. Ensuite, certains auteurs se sont intéressés particulièrement à l'utilisation des antiviraux :

Par exemple, l'utilisation de prophylaxie secondaire après l'infection à CMV par du VGCV a été évaluée en termes d'impact sur la survenue de récurrence. Sur une étude rétrospective de 42 transplantés rénaux et hépatiques, l'utilisation d'antiviral en prophylaxie secondaire n'était pas associée de manière significative à une réduction du taux de récurrence (38). Par la suite, en 2017, Gardiner *et al* publient dans le CID une étude de cohorte rétrospective de 170 patients transplantés d'organe solide, dont 120 avaient reçu une prophylaxie secondaire. Dans l'année suivant l'évènement initial lié au CMV, 23% des patients ont présenté une récurrence virologique ou clinique. La prise d'une prophylaxie secondaire n'était pas associée à une diminution du risque de récurrence (39).

L'autre interrogation sur l'utilisation des antiviraux était retrouvée dans l'étude rétrospective mono centrique de 282 patients parue en 2017 dans *Transplantation*, par Natori *et al*. Leur objectif principal était l'étude des facteurs de risque de récurrences et surtout de l'impact d'un traitement antiviral prolongé sur la survenue de récurrences. 80% des patients étaient classés dans le groupe « traitement antiviral prolongé » (médiane de nombre de jour de traitement = 50,5 jours), qu'ils définissaient comme des patients ayant poursuivi le traitement anti viral malgré éradication, que ce soit à dose préventive ou à dose curative. Peu d'informations étaient données sur les clairances virales. A noter qu'il s'agit d'une étude menée sur une faible minorité de patients transplantés rénaux (16%, n=45), avec en majorité des patients transplantés pulmonaires dont on sait qu'il s'agit d'un facteur de risque de récurrence d'infection à CMV. Il était retrouvé un taux de récurrence d'ADNémie de 30,5%. L'un des résultats principaux était l'absence de différence du taux de récurrence entre le groupe « traitement antiviral prolongé » et l'autre. Lors de l'analyse multivariée, les facteurs de risque de survenue de récurrence étaient le sérostatut D+/R-, la transplantation pulmonaire, l'antécédent de rejet aigu, et enfin une clairance virale de moitié atteinte dans les 3 jours suivant le début du traitement (40).

c. Enfin, différentes équipes ont évalué l'importance spécifique de la réponse immunologique dans ce contexte :

La première est l'étude du JASN publiée en 2016 par H. Kaminski *et al* déjà décrite précédemment. Nous avons observé que l'expansion des cellules T V $\delta$ 2neg  $\gamma\delta$  était présente chez 95% des patients sans récurrence, alors que l'absence d'expansion des cellules

T V $\delta$ 2neg  $\gamma\delta$  a été observée dans 86% des patients avec récurrence d'ADNémie et 93% des patients avec une maladie récidivante. Par conséquent, l'expansion des cellules T V $\delta$ 2neg  $\gamma\delta$  avait une sensibilité de 93%, une spécificité de 94%, une VPP de 87% et un VPN de 97% dans la prévision de l'absence de récurrence du CMV à la fin de la traitement antiviral curatif (8).

La seconde, une étude publiée dans le *Clinical Infectious Disease* en 2018 par Gardiner *et al*, consistait en l'analyse de facteur prédictif de récurrence et plus particulièrement du nombre de lymphocytes totaux, sur une cohorte rétrospective de patients transplantés cardiaques, hépatiques et rénaux traités pour un épisode d'infection et / ou de maladie à CMV. Une récurrence virologique ou clinique dans les 6 mois s'est produite chez 33 des 170 participants (19,4%). Un taux de lymphocyte abaissé était un facteur de risque indépendant de récurrence, avec un impact croissant selon la profondeur de la lymphopénie, ainsi que l'utilisation d'ATG, une charge virale maximale élevée, et un sérostatut receveur négatif, en analyse multivariée (41).

Enfin, Kumar *et al* ont publié dans l'*AJT* en 2017 une étude interventionnelle qui avait pour objectif de démontrer la faisabilité d'un arrêt précoce des antiviraux basé sur l'évaluation de la réponse immunologie à médiation cellulaire CD8 anti-CMV chez les patients atteints d'infection à CMV traitée, par mesure du Quantiféron. Parmi les 14 patients de l'étude ayant eu un test immunologique positif, il n'y eu qu'une seule récurrence, virologique, asymptomatique, sans prophylaxie secondaire. Chez les 13 autres patients ne faisant pas la preuve d'une réponse immunitaire CD8 spécifique du CMV, malgré une prophylaxie secondaire de 2 mois, 9 d'entre eux ont présenté une récurrence (42). Cette étude montre donc qu'une réponse T CD8 protège de la survenue d'une récurrence à la fin de la prophylaxie. Elle vient confirmer l'importance de la réponse immunitaire cellulaire T qu'avait mise en évidence Martin-Gandul *et al* dans une étude de cohorte rétrospective publiée en 2014 dans *Transplantation International*, qui montrait que le seul facteur associé en analyse multivariée à une diminution du risque de récurrence virale était le développement d'une réponse immunitaire cellulaire spécifique anti CMV CD8+ (34). Le tableau 3 illustre les facteurs associés dans les études précédents à des récurrences à CMV.

Tableau 3 : Facteurs associés à une infection à CMV récidivante

Facteurs associés à une récurrence		
<b>Général</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transplantation pulmonaire</li> <li>- Retard de reprise de fonction à la greffe</li> <li>- Délai entre la transplantation et l'infection court</li> <li>- Antécédent de rejet aigu</li> <li>- Colite à CMV étendue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Natori et al. 2017</i></li> <li>- <i>Helantera et al. 2011</i></li> <li>- <i>Kaminski et al. 2015</i></li> <li>- <i>Eid et al. 2010</i></li> </ul>
<b>Immunologique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Serostatut D+ / R-</li> <li>- Induction par ATG</li> <li>- Absence de réponse T CD8</li> <li>- Absence d'expansion lymphocytaire T V<math>\delta</math>2neg <math>\gamma\delta</math></li> <li>- Taux de lymphocytes totaux diminué</li> <li>- Utilisation de la Ciclosporine plutôt que du Tacrolimus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Natori et al. 2017</i></li> <li>- <i>Kumar et al. 2017</i></li> <li>- <i>Martin-Gandul et al. 2014</i></li> <li>- <i>Kaminski et al. 2016</i></li> <li>- <i>Gardiner et al. 2018</i></li> <li>- <i>Asberg et al. 2010</i></li> </ul>
<b>Virologique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Charge virale initiale élevée</li> <li>- Cinétique de clairance virale lente</li> <li>- Non éradication virale à J21</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Gardiner et al. 2018</i></li> <li>- <i>Natori et al. 2017</i></li> <li>- <i>Asberg et al. 2009</i></li> </ul>

### *Problématique des infections/Maladies à CMV avec apparition de mutations conférant une résistance aux antiviraux*

La résistance aux médicaments antiviraux est définie comme une altération génétique virale qui diminue la sensibilité à un ou plusieurs médicaments antiviraux. Les deux mutations principalement décrites en termes de fréquence sont les mutations de génome codant pour la kinase UL97 (la grande majorité) et le gène codant la polymérase virale UL54 (27).

La fréquence d'apparition de mutation varie selon les études. Dans une étude rétrospective portant sur 1244 receveurs de transplantation rénale ayant reçu un traitement préventif par VGCV, 2,2% ont développé plus tard un CMV mutant résistant au GCV, dont 96% étaient CMV D+R- (35). Les experts recommandent de rechercher une résistance aux antiviraux chez les patients qui présentent les deux critères suivants : 1 / une exposition cumulée au GCV > 6 semaines et 2 / un échec de traitement après > 2 semaines de GCV ou VGCV à dose complète en cours (18). Ce dernier critère, défini comme l'absence de

diminution de la charge virale après deux semaines de traitement, est appelé infection à CMV réfractaire (43).

L'apparition de mutations conférant une résistance aux antiviraux est un tournant au cours de l'infection à CMV d'un patient transplanté rénal, car elle est associée à un pronostic rénal défavorable, une augmentation de la morbidité et de la mortalité (44). De nombreuses équipes se sont penchées sur les facteurs de risques d'apparition de ces mutations.

In vitro d'abord, une étude d'Emery et Griffiths en 2000 s'intéressait à l'émergence d'un mutant résistant (45). Ils estimaient qu'elle dépendait essentiellement de la concentration initiale en virus et de ses capacités de réplication. Les auteurs suggèrent par leurs recherches que pendant des périodes prolongées de thérapie par le GCV, l'apparition soudaine de la résistance s'explique par la combinaison de deux populations en augmentation exponentielle (type sauvage et mutant) à des doses de GCV qui n'inhibent pas complètement la réplication du CMV. Une exposition prolongée au GCV à des doses insuffisantes favorise de manière claire le développement de population de CMV résistants.

En pratique clinique, une publication de 2002 par Limaye *et al* a montré une fréquence de 9% d'apparition de mutation conférant une résistance au GCV chez des patients transplantés pulmonaires présentant une infection à CMV, préférentiellement chez les patients D+ R- (46).

Puis, Boivin *et al* ont repris les données virologiques de 275 des patients de l'essai clinique VICTOR, pour s'intéresser au développement de résistance au GCV confirmée ou probable (30). 13 patients (4,7%) ont présenté une mutation confirmée ou probable conférant une résistance au GCV. Cinq diagnostics sur 13 étaient retrouvés dès J0. Le sérostatut D+/R- était un facteur de risque associé au développement d'une résistance au GCV ainsi que la persistance d'une ADNémie à J21. Une tendance au sur-risque de mutation était évoquée concernant la charge virale initiale élevée > 10000 copies/mL ( $p=0.06$ ). Un tiers des patients présentant des mutations confirmées de résistance au CMV avaient une maladie à CMV récidivante. Ils ont aussi réalisé une analyse de régression logistique multivariée à la recherche de facteurs de risques d'échec virologique, équivalent à la persistance d'une ADNémie à J21 et J49. Seule la présence de mutations de résistances confirmées ou probables (OR = 8,50) et la charge virale de base > 10 000 copies / ml (OR =5,89), étaient associées à une absence de clairance virale complète à J49, confirmant la relation étroite entre les différentes infections à CMV compliquées. Cette situation a été mieux décrite en 2012 par Cunha-Bang *et al* dans l'AJT évaluant 49 allogreffés de moelle et



50 transplantés d'organes solides (47). Les auteurs ont retrouvé que la prévalence de Mutant GCV-résistants était de 0% lors du premier épisode, alors que durant les épisodes de récurrence, la prévalence était de 37%. L'autre facteur de risque associé à un échec de traitement lors d'une analyse multivariée était l'importance de la charge virale.

Par ailleurs, trois articles dans le domaine des infections/maladies à CMV dites « compliquées » ont été publiés par notre équipe et s'intéressent aux CMV mutants. Tout d'abord, l'étude de 2012 qui s'intéressait à la comparaison des infections à CMV chez les patients D+/ R- avec stratégie préemptive ou stratégie prophylactique, on observait que les patients traités par la stratégie préemptive développaient plus de résistance (16% vs 3%,  $p=0.05$ ). Aussi, on retrouvait que 56% des patients avec une « ADNémie persistante » à 8 semaines de traitement présentaient une mutation de résistance contre aucun des 30 patients traités ayant eu une clairance virale complète ( $p=0.0001$ ). Enfin un pic de charge virale  $> 180000$  copies/mL était un facteur de risque de survenue de résistance (OR = 16.91,  $p = 0.0008$ ) (33). Par la suite, H. Kaminski *et al* par deux fois se sont intéressés à cette question, dans deux études précédemment décrites dans ce mémoire. Dans l'étude comparant les EOD et les LOD, on observait une incidence plus élevée significativement des CMV résistants chez les patients présentant une EOD ( $p=0.008$ )(10). Dans l'étude soulignant l'impact de l'expansion des Lymphocytes T V $\delta$ 2neg  $\gamma\delta$  sur les infections à CMV, chez les 15 patients D+/R- infectés présentant une résistance aux antiviraux, le temps médian de l'expansion des cellules T V $\delta$ 2neg  $\gamma\delta$  était significativement retardé par rapport aux patients sans résistance (8).

Enfin, une publication récente de 2017 dans le CID par Fisher *et al*, avait pour objectif principal d'étudier les facteurs de risques d'apparition de résistance dans une cohorte cas témoins rétrospective (44). Trente-sept patients transplantés d'organe solide ont présenté une infection à CMV GCV-résistants, et ils étaient comparés à 109 patients infectés à CMV GCV-sensibles. Le facteur de risque majeur d'apparition de résistance était l'exposition prolongée au GCV. L'autre facteur de risque retrouvé était l'importance de la charge virale initiale. Le délai de clairance virale n'était pas étudié ici. Le tableau 4 présente les facteurs associés à l'apparition de CMV résistants aux antiviraux de première ligne, retrouvés dans les études précédentes.

Tableau 4 : Facteurs associés à l'apparition de CMV résistants aux antiviraux de première ligne.

Facteurs associés à l'apparition de CMV résistants		
<b>Général</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation d'une stratégie préventive préemptive</li> <li>- Délai entre la transplantation et l'infection court</li> <li>- Exposition à un traitement anti viral prolongé et / ou à doses inadéquates</li> <li>- Transplantation pulmonaire</li> <li>- Infection à CMV récidivante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Couzi et al. 2012</li> <li>- Kaminski et al. 2015</li> <li>- Emery et al. 2002</li> <li>- Limaye et al. 2002</li> <li>- Cunha-bang et al. 2002</li> </ul>
<b>Immunologique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Serostatut D+ / R-</li> <li>- Absence d'expansion lymphocytaire T Vδ2neg γδ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Limaye et al. 2002 ; Myhre et al. 2011</li> <li>- Kaminski et al. 2016</li> </ul>
<b>Virologique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Charge virale initiale élevée</li> <li>- Non éradication virale à J21 ; J30 ; J49</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Boivin et al. 2009 ; Couzi et al. 2012 ; Fisher et al. 2017</li> <li>- Boivin et al. 2009 ; Cunha-Bang et al. 2012 ; Couzi et al. 2012</li> </ul>

### Objectifs de l'étude

Cette revue de la littérature illustre le fait qu'une immunosuppression importante, une absence d'immunité spécifique anti-CMV et une charge virale élevée sont des facteurs associés à une évolution défavorable de l'infection à CMV. Cependant, alors que ces facteurs de risque semblent favoriser l'apparition d'ADNémie CMV persistante, la survenue de récurrences, et enfin l'émergence de CMV mutés, aucune étude n'a analysé ces événements de manière conjointe.

La question de recherche posée était donc tout d'abord de décrire l'évolution chronologique des épisodes à CMV nécessitant un traitement, chez les patients transplantés rénaux. Par la suite, il nous semblait nécessaire d'analyser les différents liens entre les événements marquant de l'histoire du CMV, et plus particulièrement l'ADNémie CMV persistante, les récurrences, et enfin l'apparition de mutation conférant une résistance antivirale.

## Références

1. Fishman JA. Overview: Cytomegalovirus and the Herpesviruses in Transplantation: Overview: The Herpesviruses. *American Journal of Transplantation*. 2013;13(s3):1-8.
2. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*. 2010;20(4):202-13.
3. Mazon M-C, Alain S, Leruez-Ville M, Schnepf N. Infections à cytomégalo­virus. *EMC - Maladies infectieuses*. 2009;6(2):1-19.
4. Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between Toll-Like Receptor 2 Polymorphism and Cytomegalovirus Disease after Liver Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;44(10):1315-20.
5. Stern M, Elsässer H, Hönger G, Steiger J, Schaub S, Hess C. The Number of Activating KIR Genes Inversely Correlates with the Rate of CMV Infection/Reactivation in Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. 2008;8(6):1312-7.
6. Atabani SF, Smith C, Atkinson C, Aldridge RW, Rodriguez-Perálvarez M, Rolando N, et al. Cytomegalovirus Replication Kinetics in Solid Organ Transplant Recipients Managed by Preemptive Therapy: CMV and Preemptive Antiviral Therapy. *American Journal of Transplantation*. 2012;12(9):2457-64.
7. Dechanet J, Merville P, Berge F, Bone-Mane G, Taupin J-L, Michel P, et al. Major Expansion of gd T Lymphocytes following Cytomegalovirus Infection in Kidney Allograft Recipients. *The Journal of Infectious Disease* 1999.
8. Kaminski H, Garrigue I, Couzi L, Taton B, Bachelet T, Moreau J-F, et al. Surveillance of  $\gamma\delta$  T Cells Predicts Cytomegalovirus Infection Resolution in Kidney Transplants. *Journal of American Society of Nephrology*. 2016;27(2):637-45.
9. Fishman JA. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *The New England Journal of Medicine*. 2007;14.
10. Kaminski H, Couzi L, Garrigue I, Moreau J-F, Déchanet-Merville J, Merville P. Easier Control of Late-Onset Cytomegalovirus Disease Following Universal Prophylaxis Through an Early Antiviral Immune Response in Donor-Positive, Recipient-Negative Kidney Transplants. *Am J Transplant*. 2016;16(8):2384-94.
11. Webster AC, Ruster LP, McGee RG, Matheson SL, Higgins GY, Willis NS, et al. Interleukin 2 receptor antagonists for kidney transplant recipients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010
12. Santos CAQ, Brennan DC, Fraser VJ, Olsen MA. Delayed-Onset Cytomegalovirus Disease Coded During Hospital Readmission After Kidney Transplantation: Transplantation. 2014;98(2):187-94.
13. Manuel O, Kralidis G, Mueller NJ, Hirsch HH, Garzoni C, van Delden C, et al. Impact of Antiviral Preventive Strategies on the Incidence and Outcomes of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients: Impact of CMV Prevention. *American Journal of Transplantation*. 2013;13(9):2402-10.
14. Azevedo L, Pierrotti L, Abdala E, Costa S, Strabelli T, Campos S, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics*. 2015;70(7):515-23.
15. Ramanan P, Razonable RR. Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation: A Review. *Infection & Chemotherapy*. 2013;45(3):260.
16. 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: Table 1. Snyderman DR, éditeur. Clin Infect Dis. 1 janv 2017;64(1):87-91.
17. Freeman, Jr. RB. The 'Indirect' Effects of Cytomegalovirus Infection. American Journal of Transplantation. 2009;9(11):2453-8.
  18. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation: Transplantation. 2018;102(6):900-31.
  19. Humar A, Lebranchu Y, Vincenti F, Blumberg EA, Punch JD, Limaye AP, et al. The Efficacy and Safety of 200 Days Valganciclovir Cytomegalovirus Prophylaxis in High-Risk Kidney Transplant Recipients. American Journal of Transplantation. mai 2010;10(5):1228-37.
  20. Witzke O, Hauser IA, Bartels M, Wolf G, Wolters H, Nitschke M. Valganciclovir Prophylaxis Versus Preemptive Therapy in Cytomegalovirus-Positive Renal Allograft Recipients: 1-Year Results of a Randomized Clinical Trial: Transplantation. janv 2012;93(1):61-8.
  21. Pascual J, Berger SP, Witzke O, Tedesco H, Mulgaonkar S, Qazi Y, et al. Everolimus with Reduced Calcineurin Inhibitor Exposure in Renal Transplantation. Journal of American Society of Nephrology. 2018;29(7):1979-91.
  22. Mallat SG, Tanios BY, Itani HS, Lotfi T, McMullan C, Gabardi S, et al. CMV and BKPyV Infections in Renal Transplant Recipients Receiving an mTOR Inhibitor-Based Regimen Versus a CNI-Based Regimen: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. Clinical Journal of American Society of Nephrology. 2017;12(8):1321-36.
  23. Basso G, Felipe CR, Cristelli MP, Mansur Siliano J, Viana L, Ferreira Brigido AN, et al. The effect of anti-thymocyte globulin and everolimus on the kinetics of cytomegalovirus viral load in seropositive kidney transplant recipients without prophylaxis. Transpl Infect Dis. 2018;20(4):e12919.
  24. de Sandes-Freitas TV, Pinheiro PMA, Sales ML de MBO, Girão CM, Campos ÉF, Esmeraldo R de M. The impact of everolimus in reducing cytomegalovirus events in kidney transplant recipients on steroid-avoidance strategy: 3-year follow-up of a randomized clinical trial. Transpl Int. 2018;31(12):1345-56.
  25. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J, Rohde F. Improvement in Long-Term Renal Graft Survival due to CMV Prophylaxis with Oral Ganciclovir: Results of a Randomized Clinical Trial. Am J Transplant. 2008;8(5):975-83.
  26. Kaminski H. Complications infectieuses de la transplantation rénale. EMC Néphrologie. 2020.
  27. Lurain NS, Chou S. Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus. Clinical Microbiology Reviews. 2010;23(4):689-712.
  28. Åsberg A, Humar A, Rollag H, Jardine AG, Mouas H, Pescovitz MD, et al. Oral Valganciclovir Is Noninferior to Intravenous Ganciclovir for the Treatment of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. Am J Transplant. 2007;7(9):2106-13.
  29. Åsberg A, Humar A, Jardine AG, Rollag H, Pescovitz MD, Mouas H, et al. Long-Term Outcomes of CMV Disease Treatment with Valganciclovir Versus IV Ganciclovir in Solid Organ Transplant Recipients. American Journal of Transplantation. 2009;9(5):1205-13.
  30. Boivin G, Goyette N, Rollag H, Jardine AG, Pescovitz MD, Asberg A, et al. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. Antiviral Therapy. 2009.
  31. Åsberg A, Jardine AG, Bignamini AA, Rollag H, Pescovitz MD, Gahlemann CC, et al. Effects of the Intensity of Immunosuppressive Therapy on Outcome of Treatment for CMV Disease in Organ Transplant Recipients: Effect of Immunosuppressive Therapy on CMV. American Journal of Transplantation. 2010;10(8):1881-8.

32. Åsberg A, Humar A, Rollag H, Jardine AG, Kumar D, Aukrust P, et al. Lessons Learned From a Randomized Study of Oral Valganciclovir Versus Parenteral Ganciclovir Treatment of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients: The VICTOR Trial. Snyderman DR, éditeur. *Clin Infect Dis*. 2016;62(9):1154-60.
33. Couzi L, Helou S, Bachelet T, Moreau K, Martin S, Morel D, et al. High Incidence of Anticytomegalovirus Drug Resistance Among D+R- Kidney Transplant Recipients Receiving Preemptive Therapy: Preemptive Therapy and Drug-Resistant CMV. *American Journal of Transplantation*. 2012;12(1):202-9.
34. Martín-Gandul C, Pérez-Romero P, Blanco-Lobo P, Benmarzouk-Hidalgo OJ, Sánchez M, Gentil MA, et al. Viral load, CMV-specific T-cell immune response and cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients at higher risk for cytomegalovirus infection during preemptive therapy. *Transpl Int*. 2014;27(10):1060-8.
35. Myhre H-A, Haug Dorenberg D, Kristiansen KI, Rollag H, Leivestad T, Åsberg A, et al. Incidence and Outcomes of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infections in 1244 Kidney Transplant Recipients: *Transplantation*. 2011;92(2):217-23.
36. Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, Wilhelm MP, Razonable RR. Clinical Predictors of Relapse after Treatment of Primary Gastrointestinal Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients: Predictors of Relapse of GI CMV Disease after SOT. *American Journal of Transplantation*. 2010;10(1):157-61.
37. Helanterä I, Lautenschlager I, Koskinen P. The risk of cytomegalovirus recurrence after kidney transplantation: Recurrent CMV after kidney transplantation. *Transplant International*. 2011;24(12):1170-8.
38. Sullivan T, Brodowski A, Patel G, Huprikar S. The Role of Secondary Cytomegalovirus Prophylaxis for Kidney and Liver Transplant Recipients: *Transplantation*. 2015;99(4):855-9.
39. Gardiner BJ, Chow JK, Price LL, Nierenberg NE, Kent DM, Snyderman DR. Role of Secondary Prophylaxis With Valganciclovir in the Prevention of Recurrent Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(12):2000-7.
40. Natori Y, Humar A, Husain S, Rotstein C, Renner E, Singer L, et al. Recurrence of CMV Infection and the Effect of Prolonged Antivirals in Organ Transplant Recipients: *Transplantation*. 2017;101(6):1449-54.
41. Gardiner BJ, Nierenberg NE, Chow JK, Ruthazer R, Kent DM, Snyderman DR. Absolute Lymphocyte Count: A Predictor of Recurrent Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 15 oct 2018;67(9):1395-402.
42. 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*. 2017;17(9):2468-73.
43. Chemaly RF, Chou S, Einsele H, Griffiths P, Avery R, Razonable RR, et al. Definitions of Resistant and Refractory Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients for Use in Clinical Trials. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;68(8):1420-6.
44. Fisher CE, Knudsen JL, Lease ED, Jerome KR, Rakita RM, Boeckh M, et al. Risk Factors and Outcomes of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infection in Solid Organ Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(1):57-63.
45. Emery VC, Griffiths PD. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 5 juill 2000;97(14):8039-44.
46. Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang M, Boeckh M. High Incidence of Ganciclovir - Resistant Cytomegalovirus Infection among Lung Transplant Recipients Receiving Preemptive Therapy. *Journal of Infectious Disease*. 2002;185(1):20-7.

47. Cunha-Bang C da, Kirkby N, Sønderholm M, Sørensen SS, Sengeløv H, Iversen M, et al. The Time Course of Development and Impact From Viral Resistance Against Ganciclovir in Cytomegalovirus Infection: Resistance Against Ganciclovir in CMV. *American Journal of Transplantation*. 2013;13(2):458-66.

**Characteristics and time course of CMV infections leading to  
antiviral drug resistance**

M Acquier<sup>1</sup>, B Taton<sup>1,2</sup>, J Mary<sup>1</sup>, I Garrigue<sup>3</sup>, P Pfirmann<sup>1</sup>, J Visentin<sup>5</sup>, P Merville<sup>1,4</sup>, H Kaminski<sup>1,4</sup>, L Couzi<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Transplantation, Dialysis and Apheresis, Pellegrin University Hospital, Bordeaux 33000, France.

<sup>2</sup>MONC- Mathematics Modelisation for Oncology, IMB – Institute of Bordeaux Mathematics, INRIA, UMR 5251, Talence, France

<sup>3</sup>Laboratory of Virology, Pellegrin University Hospital, Bordeaux 33000, France

<sup>4</sup>CNRS-UMR 5164 ImmunoConcEpT, Bordeaux University, Bordeaux 33076, France.

<sup>5</sup> Laboratory of Immunology and Immunogenetics, Pellegrin University Hospital, Bordeaux 33000, France.

**Running title:** Clinical time course of antiviral drug resistance

Word count for abstract: 253

Word count for text: 3658

**Corresponding author:**

Prof. Lionel Couzi, Department of Nephrology, Transplantation, Dialysis and Apheresis, Pellegrin University Hospital, Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux, France. Tel (+33) 5 56 79 55 38; Fax: (+33) 5 56 79 61 07; Mail [lionel.couzi@chu-bordeaux.fr](mailto:lionel.couzi@chu-bordeaux.fr)

## **Abstract**

**Introduction:** CMV guidelines recommend testing for an antiviral drug resistance in kidney transplant recipients (KTR) who exhibit the two following criteria: 1/ a cumulative (Val)ganciclovir ((V)GCV) exposure >6 weeks and 2/ a treatment failure after >2 weeks of ongoing full dose (V)GCV. The objectives of this study were to describe the characteristics, the risk factors and the time course of CMV infections leading to antiviral drug resistance.

**Material and methods:** We performed a retrospective cohort study in 313 KTR treated for a first episode of CMV infection or disease from Oct 2004 to December 2017. Logistic and Cox regression analyses were performed for identifying risk factors of persistent CMV DNAemia, CMV recurrence, and antiviral drug resistance.

**Results:** Fifty-eight (18%) of the 313 KTR developed persistent CMV DNAemia and 65 (21%) clinical recurrence. The risk factors of persistent CMV DNAemia and clinical recurrence were similar: treatment with corticosteroid and anti-lymphocyte globulin, D+R-CMV serostatus, lymphopenia, high viral load and CMV disease. The incidence of an antiviral drug resistance was 6.3% (20/313). Importantly, 30% of antiviral drug resistances were detected outside the screening criteria indicated by the guidelines. We found that persistent CMV DNAemia (HR = 6.25, CI95% 2.45-15.96, p <0.001) and clinical recurrence (HR = 7.20, CI95% 2.57-18.09, p <0.001) were the only risk factors associated with the development of antiviral drug resistance. The addition of the clinical recurrence to the 2 current criteria improved the screening strategy of antiviral drug resistance by 10%.

**Conclusion:** We identified a new scenario leading to resistance to antivirals associating persistent CMV DNAemia and clinical recurrence. This perspective involving a chronological analysis of the history of the CMV episode could allow a better and earlier diagnosis of antiviral resistance.

**Key words:** cytomegalovirus, kidney transplantation, antiviral drug resistance



## **Introduction**

Cytomegalovirus (CMV) infection and disease are important causes of morbidity and mortality in solid-organ transplant recipients (1). Based on the VICTOR study conducted in adult solid organ transplant recipients (2), the third international consensus guidelines recommend oral Valganciclovir (VGCV) in mild to moderate CMV disease, and intravenous Ganciclovir (GCV) in life-threatening CMV disease (3). Current available drugs (GCV and VGCV) are efficient to manage an undetermined number of CMV infection. However, “difficult to treat” CMV infections need to be improved in their management, especially CMV infections with an antiviral drug resistance.

Antiviral drug resistant CMV infection is defined as a viral genetic alteration (on UL97 and/or UL54 gens) that decreases susceptibility to one or more antiviral drugs (4). It occurs in up to 10% of the Solid Organ Transplant Recipients (SOTR) with CMV infection (5-8). A strong immunosuppressive therapy, a lack of prior CMV immunity (Donor positive - recipient negative D+ R-), a high CMV load during CMV disease, CMV DNAemia replication after 49 days of antiviral treatment (CMV DNAemia persistence), an extended period of antiviral drug exposure and inadequate antiviral drug delivery are the most described risk factors of antiviral drug resistance (8-13). CMV mutation is associated with a poorer renal function, an increased morbidity and mortality (12,14,15). Although many risk factors were identified, all the clinical scenarios and especially the time course of CMV infection associated with this complication have not been fully captured. CMV guidelines recommend to test for an antiviral drug resistance in patients who exhibit the two following criteria: 1/ a cumulative GCV exposure >6 weeks and 2/ a treatment failure after >2 weeks of ongoing full dose GCV or VGCV (3). We previously observed that a persistent CMV DNAemia after 7 weeks of antiviral treatment was strongly associated with the occurrence of antiviral drug resistance (2). However, it is still unclear whether recurrent CMV infection and disease which occur in

30% and 15% of patients, respectively (16), are associated with an increased risk of antiviral drug resistance.

The objectives of this study were then to describe the characteristics, the risk factors and the time course of CMV infections leading to antiviral drug resistance.

## **Material and methods**

### **Study design**

We conducted a monocentric retrospective study at Bordeaux University Hospital, France, from October 2004 to December 2017. Among the 1792 kidney transplantations performed at our institution, we retrospectively included the consecutive 313 kidney transplant recipients (KTR) who underwent CMV infections or diseases requiring a CMV treatment during this period (17.5%). Combined transplantations were excluded. All patients were monitored for two years after their first treated CMV episode. This study was approved by the Institutional Review Board of the Bordeaux University Hospital.

### **Immunosuppression**

HLA-sensitized patients were given rATG (THYMOGLOBULIN<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis) protocol on day 0 (1.5 mg per kilogram of body weight) and on days 1 through 4 (1mg/kg). In non-HLA-sensitized patients, anti-IL2RA (20 mg) (SIMULECT<sup>®</sup>, Novartis Pharma SAS) was similarly used on day 0 and day 4. Maintenance immunosuppressive regimen was based on calcineurin inhibitors. Either tacrolimus (trough level 8-12 ng/ml for the first 3 months, then 5-10 ng/ml), or cyclosporine A (trough level 150-200 ng/ml for the first 3 months, then 75-125 ng/ml) were used. Mycophenolic acid was mainly used in association with calcineurin inhibitors. Steroids were used concomitantly, decreased in the first year and stopped only in non-HLA-sensitized.

All acute rejections, which included both antibody-mediated and T cell-mediated acute rejections, were biopsy-proven. Glomerular filtration rate was expressed based on MDRD formula.

### **CMV prevention**

CMV preventive strategy evolved over time. From 2004 to November 30<sup>th</sup>, 2006, D+R- patients and R+ rATG-treated patients received universal prophylaxis (valganciclovir 900 mg once daily) for 3 months. A preemptive strategy was used on anti-IL2 RA-treated patients. From December 2006 to June 2010, all patients were preemptively followed: CMV whole-blood real-time quantitative acid nucleic testing (QNAT) was performed once a week for the first three months, twice a month from month 3 to 6, and then at month 8, 10 and 12.

Finally, from July 2010 to December 2017, patients received universal prophylaxis either for 6 months (D+ R-) or for 3 months (R+). After the end of prophylaxis, CMV QNAT was performed at month 4 and 6 (for patients having received prophylaxis for 3 months), 9 and 12 post-transplantation. For all patients after month 12, CMV QNAT was performed annually or when CMV disease was clinically suspected.

### **CMV treatment**

Intravenous (IV) GCV (5 mg/kg twice daily) or oral VGCV (900 mg twice daily) were initiated for the treatment of CMV infection or disease in view to obtain CMV DNAemia eradication. The dose was carefully adjusted at each outpatient visit, following the manufacturer's recommendations, using the Cockcroft–Gault formula.

## **CMV monitoring**

CMV IgG serology was performed (Enzygnost anti-CMV/IgM and IgG [Dade Behring, Marburg, Germany] and Access CMV IgG and IgM [Beckman Coulter, Brea, CA]), following the manufacturer's recommendations.

CMV QNAT techniques evolved overtime.

From October 2004 to June 2012, CMV QNAT was performed with an in-house whole blood real-time polymerase chain reaction, as previously described (17,18). QNAT was reported in copies/ml, however, equivalence in IU/ml was retrospectively calculated by using the WHO International Standard for human Cytomegalovirus (hCMV), in order to homogenize all the results before performing the statistical analysis. The thresholds of CMV DNAemia quantification and detectability were both at 250 IU/ml.

From June 2012 to December 2018, CMV QNAT was performed with a whole blood real-time polymerase chain reaction using LightMix® Kit human Cytomegalovirus (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany). The thresholds of CMV DNAemia quantification and detectability were at 1000 IU/ml and 250 IU/ml, respectively. The laboratory is following the program of Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD, Glasgow, Scotland) from 2004.

Baseline viral load was defined as the first positive viral load of the CMV event. During the viral monitoring of CMV disease, the assay was performed once a week until two consecutives negative CMV QNATs occurred or during the first seven weeks, then once a month until month 3.

Antiviral drug resistance was confirmed by full-length sequencing of the UL97 and UL54 genes (19), performed at the French National Cytomegalovirus Reference Center (Limoges, France).

## **Definitions of CMV events**

CMV infection was defined as a CMV DNAemia  $\geq 1000$  IU/ml (based on the upper threshold of quantification from June 2012 to December 2018) in asymptomatic patients. CMV disease was defined as CMV syndrome or CMV tissue-invasive disease, consistent with the American Society of Transplantation and the CMV Drug Development Forum recommendations (20). “Post-prophylaxis” CMV disease was defined as the first episode of CMV disease occurring  $>3$  months (100 days) after transplantation. Early-onset disease was defined as the first episode of CMV disease occurring  $<3$  months (100 days) after transplantation (21). CMV DNAemia eradication was defined as CMV QNAT  $< 250$  IU/mL (threshold of detectability of our assays), in accordance with the guidelines (3). CMV DNAemia persistence was defined as non CMV DNAemia eradication at 7 weeks of antiviral treatment.

CMV DNAemia recurrence was defined as a new positive CMV DNAemia  $\geq 1000$  IU/ml occurring in patients with CMV eradication. CMV DNAemia increase was defined as a positive CMV DNAemia  $\geq 1000$  IU/ml occurring in patients with a previous CMV DNAemia  $<1000$  IU/mL but no CMV eradication. CMV clinical recurrence was defined as a second CMV disease occurring concomitantly to a CMV DNAemia recurrence or a CMV DNAemia increase (3).

## **Statistical analysis**

Univariate logistic-regression analysis to evaluate risks factors of CMV DNAemia persistence was performed, then covariates with a p-value  $<0.25$  were included in a multivariate logistic-regression analysis. Results were expressed as Odds Ratios (OR) with 95% confidence intervals (95%CI).

Univariate Cox regression analysis for CMV clinical recurrence and antiviral drug resistance on the whole cohort and among “CMV DNAemia persistence” group was performed. Then,

covariates with a  $<0.25$  p-value and “prolonged anti-viral therapy” for the analyses among “CMV persistence” group were included in a multivariate Cox regression analysis. Two different multivariate models were performed with either “Baseline lymphocyte counts” or “7 weeks lymphocyte counts” in case of a p-value $<0.25$  observed in the univariate analysis. Results were expressed as Hazard Ratios (HR) with 95% confidence intervals (95%CI).

The survival curve for “free survival from mutation” was estimated with Kaplan-Meier method compared with log-rank test.

Analyses were performed with conventional statistical methods using the GraphPad Prism (version 6.0; GraphPad Software, San Diego, CA) and the RStudio statistical software (Version 1.1.423 – © 2009-2018 RStudio, Inc).

## **Results**

### **Characteristics of patients and CMV infections**

Three hundred and thirteen KTR requiring antiviral curative therapy for a first episode of CMV infection or disease were included. Their characteristics are shown in Table 1. rATG induction therapy was given in 115 (36,7%) patients. Pretransplant CMV serostatus was as follow: 143 (45.7%) donor positive (D+) recipient negative (R-), 107 (34.2%) D+R+, 47 (15%) D-R+, 4 (1.3%) D-R-, unknown for 12 (3.8%) patients. CMV prevention was based on universal prophylaxis with VGCV in 148 (47.3%), a preemptive strategy in 148 (47.3%) of patients, unknown for 17 (5.4%) patients.

There were 95 (30.4%) CMV infections and 218 (69.6%) CMV diseases, equally distributed between 142 (45.4%) early-onset and 171 (54,6%) post-prophylaxis CMV infection or disease. The median baseline viral load was of 10900 (interquartile (IQR): 4150-73850) IU/mL. The first treatment was VGCV in 148 (47.3%) and GCV in 165 (52.7%) of patients (table 1). Median treatment duration was 49 days (IQR: 32-61). The median time to viral

eradication was 27 days (IQR: 17-45). Thirty-eight (12.1%) patients received a secondary prophylaxis with VGCV.

### **CMV DNAemia persistence at 7 weeks under treatment**

Among these 313 patients, 58 (18.5%) had CMV DNAemia persistence. All these patients with CMV DNAemia persistence were still receiving GCV or VGCR at 7 weeks. Patients characteristics stratified by CMV DNAemia persistence status are shown in Table 1. The median time to viral eradication was 140 days (IQR: 65-285) in the CMV DNAemia persistence group, versus 23 days (IQR: 15-33) in patients who achieved viral clearance (table 1). To determine risk factors of CMV persistence, an univariate (supplemental table 1), then a multivariate analysis were performed. Only D+R- serostatus (HR=3.70 CI95% [1.61- 9.09] p=0.003), high baseline CMV viral load at baseline (HR = 1.0000005 CI95% [1.0000002- 1.000001], p = 0.002), and a lower 7 weeks lymphocyte count (HR=2.94 CI95% [1.15-8.33], p=0.033,) were independently associated with CMV DNAemia persistence (Table 2).

### **CMV recurrence**

CMV DNAemia recurrence and “CMV DNAemia increase” occurred in 11 (19%) and 25 (43%) of the 58 patients with CMV DNAemia persistence, respectively. CMV DNAemia recurrence occurred in 123 (48.2%) of the 255 patients with CMV DNAemia eradication during the 24 months post-CMV treatment (Table 1).

CMV clinical recurrence occurred in 20 (34.5%) patients with CMV DNAemia persistence and 45 (17.6%) patients with CMV DNAemia eradication, during the 24 months post-CMV treatment (p=0.006) (Table 1 and Figure 1). The median times (IQR) to CMV clinical recurrence were 94 (76-138) and 78 (62-97) days post-treatment in the 2 groups, respectively. Risk factors were identified with univariate (supplemental table 2), then multivariate analysis. rATG (HR=2.25 CI95% [1.16-4.35] p=0.016), steroids use (HR= 2.31 CI95% [1.19-4.46]

p=0.012), D+R- serostatus (HR=2.56 CI95% [1.01-3.57] p=0.002), lower day 0 lymphocyte count (HR=2.08 CI95% [1.16-3.70] p=0.013), early onset infection or disease (HR=1.82, CI95% [1.02-3.13], p=0.041), and CMV disease (HR=2.57 CI95% [1.09-6.56], p=0.031) were independently associated with CMV clinical recurrence (Table 3).

### **Antiviral drug resistant CMV infection**

Among the 313 patients, 20 (6%) patients developed an antiviral drug resistant CMV infection. The median time to the diagnosis of antiviral drug resistance was 112 day (IQR: 80-146). In the univariate analysis, some risk factors associated with CMV DNAemia persistence or clinical recurrence, namely D+R- patients, lymphopenia, and CMV disease were also associated with antiviral drug resistance. In the multivariate analysis, only CMV DNAemia persistence (HR= 6.25, CI95% [2.45-15.96] . p<0.001), and clinical recurrence (HR= 7.20, CI95% [2.57-18.09], p<0.001) were independently associated with antiviral drug resistance (Table 4). Moreover, patients cumulating both a CMV DNAemia persistence at 7 weeks under treatment followed by a CMV clinical recurrence (50%) constitute the group with the highest risk of developing antiviral drug resistance (Figure 1 and 2).

### **Criteria for testing antiviral drug resistance**

CMV Guidelines recommend testing for a CMV drug resistance in patients who exhibit two criteria: 1/ a cumulative GCV exposure >6 weeks and 2/ a treatment failure (symptomatic disease or viral load not improving) after >2 weeks of ongoing full dose GCV or VGCV (18). We then checked whether the 20 patients with a genetic diagnosis of CMV drug resistance had these two criteria.



Only, 70% (14/20) of them had these two criteria. One (5%) patient has neither criteria 1 nor 2. He was diagnosed with a CMV mutant strain identified at day 12 post-treatment during a refractory CMV disease (patient 17), whereas five (25%) patients were lacking only the criteria 2 (patients 1, 2, 6, 12, 18) (Figure 3).

All the five patients lacking criteria 2 have had a cumulative GCV/VGCV exposure >6 weeks for a previous CMV episode and this treatment had been stopped in all of them (Figure 3). The diagnosis of CMV drug resistance was made in front of a clinical recurrence in two patients and a CMV DNAemia recurrence or increase in three others patients, before they had received 2 weeks of full dose GCV/VGCV for this new episode.

By integrating the clinical recurrence into new criteria 2 (defined as follow: a clinical recurrence OR a treatment failure after >2 weeks of ongoing full dose GCV/VGCV), we found finally 16 (80%) of the 20 patients had both the criteria 1 and the new criteria 2 before the diagnosis of CMV drug resistance (Figure 4).

## **Discussion**

In this study, we took advantage of a large cohort of KTR who received GCV or VGCV for CMV infection or disease to describe the different steps and kinetic of factors involved in the genesis of CMV antiviral drug resistance. Our sequential approach led us to identify a clinical situation frequently encountered before the genetic diagnosis of CMV mutation, which associates CMV persistence followed by a clinical recurrence.

The first aim was to describe the natural history of CMV disease or infection requiring a treatment. One of the first issue encountered by physicians during the treatment of a first CMV episode is the persistence of CMV DNAemia despite appropriate and prolonged treatment. In the VICTOR trial, CMV DNAemia persistence at 7 weeks occurred in 22.9% of VGCV- and 29.9% of GCV-treated patients. We observed in this cohort that 18.5% of the

patients still had a CMV DNAemia persistence after 7 weeks of GCV or VGCV. The higher incidence observed in the VICTOR study can be explained by the presence of 26% of non-kidney recipients and a majority of CMV disease (2). It was previously observed that CMV DNAemia persistence at 7 weeks occurred mainly after early-onset CMV infection in preemptively treated patients during the early post-transplant period when patients are the most immunosuppressed (8,21). We demonstrate that naïve D+R- serostatus, a low lymphocyte count, and a high basal CMV viral load were strongly associated with this outcome. It suggests that the lack of CMV-specific immunity at transplantation could result to high CMV replication and dissemination, and then delay CMV clearance. The management of CMV DNAemia persistence based on international recommendations remains highly controversial. On one hand, antiviral treatment should be continued until obtaining a viral clearance, but on the other hand a cumulative VGCV exposure that exceeds 6 weeks can lead to CMV antiviral drug resistance (3,7,8). This last point was confirmed in this study, suggesting that CMV persistence at 7 weeks should be considered as a new relevant entity among CMV complications.

A major complication following a first CMV episode requiring antiviral therapy is clinical recurrence. In the VICTOR study, the incidences of CMV DNAemia and clinical recurrences were 30% and 15% during a 1-year follow-up, respectively (16). Recently, Natori *et al.* found a rate of 29.5% for CMV DNAemia recurrence, during a 6-month follow-up (22). In our study, 43% and 21% of the patients displayed a CMV DNAemia and clinical recurrences, respectively. We confirmed that naïve D+/R- patients were at high risk of recurrence, probably because of a delay in the development of a protective CMV-specific cell immunity favors CMV recurrence (23-25). The burden of immunosuppression, which was characterized by rATG and steroids use was also a seminal factor involved in clinical recurrence. It could have participated to induce lymphopenia, another risk factor of recurrence (26). In line with

this, we confirmed that clinical recurrence occurred mainly in patients with CMV disease (27), and high viral load (28). As secondary prophylaxis after CMV clearance is not able to reduce its incidence (22,24,29), CMV clinical recurrence stays an important CMV complication.

Antiviral drug resistant CMV infection remained one of the most problematic issue of CMV infection. We observed a 6% rate of antiviral drug resistance. This is consistent with other cohort studies (5-7). Many previous studies identified the lack of CMV immunity (D+R- at transplantation or at the end of the treatment) (9,23), the burden of immunosuppression (21) and CMV disease with high viral loads (8,12) as strong risk factors of antiviral drug resistance. We then tested these potential contributors. As the D+R- serostatus, lymphopenia, and CMV disease were associated with either a persistent CMV DNAemia at 7 weeks under treatment or clinical recurrence, all these baseline characteristics previously identified as risk factors for CMV drug resistance were no longer associated in the multivariate analysis. Only persistent CMV DNAemia and clinical recurrence were still associated with antiviral drug resistance. Whereas persistent CMV replication with a prolonged antiviral drug exposure is a well-known CMV complication leading to CMV drug resistance (8,12,13), one of the most important findings of this study is the identification of clinical recurrence as new risk factor of antiviral drug resistance. Taken together, our findings can help to depict the kinetics of events leading to CMV drug resistance. D+R- patients and those receiving rATG or steroids are more prone to develop CMV disease with high CMV viral load and lymphopenia, which can then lead to persistent CMV DNAemia at 7 weeks under treatment and clinical recurrence, which in turn expose 50% of patient to the development of an antiviral drug resistance (Figure 5).

Based on the last international consensus guidelines on the management of CMV infection,

only 70% of antiviral drug resistance were diagnosed with the two following criteria which associates: 1/ a cumulative GCV exposure >6 weeks and 2/ a treatment failure (symptomatic disease or viral load not improving) after >2 weeks of ongoing full dose GCV or VGCV (3). Most of our patients with antiviral drug resistance had a cumulative GCV exposure >6 weeks as previously reported (12). However, the criteria 2 was lacking in 25% of cases. Our study shows that a clinical recurrence in patient only having criteria 1, can lead to identify antiviral drug resistance earlier in some patients, without waiting for treatment failure. Consequently, the addition of a clinical recurrence in a new combined criteria 2 (associating a clinical recurrence OR a treatment failure after >2 weeks of ongoing full dose GCV/VGCV), could broaden the clinical spectrum of situations that should give rise to the suspicion of antiviral drug resistance.

Our study has several strengths. It is a large real-life cohort of kidney transplant recipients displaying a CMV infection, including life-threatening disease, a homogeneous treatment based on the VICTOR study, and a regular and long-term follow-up. But it has also potential weaknesses. Due to the relatively uncommon occurrence of mutation, our study was retrospective to include the maximum cases. They occurred during a long-time period during which transplant practices changed. As a single-center study, caution should be used when generalizing these results to other transplant centers with differing immunosuppression or other transplant practices.

In conclusion, we identified a new clinical scenario leading to antiviral drug resistance which associates CMV persistence and clinical recurrence. This perspective involving a chronological analysis of the history of CMV infection could allow an earlier diagnosis of antiviral drug resistance at the beginning of clinical recurrence in patients with history of

CMV DNAemia persistence, without waiting 2 weeks of ongoing full dose of antiviral therapy.

## References

1. Fishman JA. Overview: Cytomegalovirus and the Herpesviruses in Transplantation: Overview: The Herpesviruses. *American Journal of Transplantation*. 2013;13(s3):1-8.
2. Åsberg A, Humar A, Rollag H, Jardine AG, Mouas H, Pescovitz MD, et al. Oral Valganciclovir Is Noninferior to Intravenous Ganciclovir for the Treatment of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2007;7(9):2106-13.
3. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation: Transplantation. 2018;102(6):900-31.
4. Chemaly RF, Chou S, Einsele H, Griffiths P, Avery R, Razonable RR, et al. Definitions of Resistant and Refractory Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients for Use in Clinical Trials. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;68(8):1420-6.
5. Lurain NS, Bhorade SM, Pursell KJ, Avery RK, Yeldandi VV, Isada CM, et al. Analysis and Characterization of Antiviral Drug-Resistant Cytomegalovirus Isolates from Solid Organ Transplant Recipients. *Journal of Infectious Disease*. 2002;186(6):760-8.
6. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazon M-C, Garrigue I, Merville P, Mengelle C, et al. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(12):2628-40.
7. Boivin G, Goyette N, Rollag H, Jardine AG, Pescovitz MD, Asberg A, et al. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antiviral Therapy*. 2009
8. Couzi L, Helou S, Bachelet T, Moreau K, Martin S, Morel D, et al. High Incidence of Anticytomegalovirus Drug Resistance Among D+R- Kidney Transplant Recipients Receiving Preemptive Therapy: Preemptive Therapy and Drug-Resistant CMV. *American Journal of Transplantation*. 2012;12(1):202-9.
9. Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang M, Boeckh M. High Incidence of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infection among Lung Transplant Recipients Receiving Preemptive Therapy. *Journal of Infectious Disease*. 2002;185(1):20-7.
10. Lurain NS, Chou S. Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(4):689-712.
11. Cunha-Bang C da, Kirkby N, Sønderholm M, Sørensen SS, Sengeløv H, Iversen M, et al. The Time Course of Development and Impact From Viral Resistance Against Ganciclovir in Cytomegalovirus Infection: Resistance Against Ganciclovir in CMV. *American Journal of Transplantation*. 2013;13(2):458-66.
12. Fisher CE, Knudsen JL, Lease ED, Jerome KR, Rakita RM, Boeckh M, et al. Risk Factors and Outcomes of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infection in Solid Organ Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(1):57-63.
13. Emery VC, Griffiths PD. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(14):8039-44.
14. Boivin G, Goyette N, Farhan M, Ives J, Elston R. Incidence of cytomegalovirus UL97 and UL54 amino acid substitutions detected after 100 or 200 days of valganciclovir prophylaxis. *Journal of Clinical Virology*. 2012;53(3):208-13.
15. Avery RK, Arav-Boger R, Marr KA, Kraus E, Shoham S, Lees L, et al. Outcomes in Transplant Recipients Treated With Foscarnet for Ganciclovir-Resistant or Refractory Cytomegalovirus Infection: Transplantation. 2016;100(10):e74-80.
16. Åsberg A, Humar A, Jardine AG, Rollag H, Pescovitz MD, Mouas H, et al. Long-Term Outcomes of CMV Disease Treatment with Valganciclovir Versus IV Ganciclovir in

- Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. 2009;9(5):1205-13.
17. Garrigue I, Boucher S, Couzi L, Caumont A, Dromer C, Neau-Cransac M, et al. Whole blood real-time quantitative PCR for cytomegalovirus infection follow-up in transplant recipients. *Journal of Clinical Virology*. 2006;36(1):72-5.
  18. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C, et al. Prediction of Cytomegalovirus (CMV) Plasma Load from Evaluation of CMV Whole-Blood Load in Samples from Renal Transplant Recipients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(2):493-8.
  19. Chou S. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: Current Opinion in Infectious Diseases. 2015;28(4):293-9.
  20. 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: Table 1. Snyderman DR, éditeur. *Clin Infect Dis*. 2017;64(1):87-91.
  21. Kaminski H, Couzi L, Garrigue I, Moreau J-F, Déchanet-Merville J, Merville P. Easier Control of Late-Onset Cytomegalovirus Disease Following Universal Prophylaxis Through an Early Antiviral Immune Response in Donor-Positive, Recipient-Negative Kidney Transplants. *Am J Transplant*. 2016;16(8):2384-94.
  22. Natori Y, Humar A, Husain S, Rotstein C, Renner E, Singer L, et al. Recurrence of CMV Infection and the Effect of Prolonged Antivirals in Organ Transplant Recipients: *Transplantation*. 2017;101(6):1449-54.
  23. Kaminski H, Garrigue I, Couzi L, Taton B, Bachelet T, Moreau J-F, et al. Surveillance of  $\gamma\delta$  T Cells Predicts Cytomegalovirus Infection Resolution in Kidney Transplants. *Journal of American Society of Nephrology*. 2016;27(2):637-45.
  24. 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*. 2017;17(9):2468-73.
  25. Martín-Gandul C, Pérez-Romero P, Blanco-Lobo P, Benmarzouk-Hidalgo OJ, Sánchez M, Gentil MA, et al. Viral load, CMV-specific T-cell immune response and cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients at higher risk for cytomegalovirus infection during preemptive therapy. *Transpl Int*. 2014;27(10):1060-8.
  26. Gardiner BJ, Nierenberg NE, Chow JK, Ruthazer R, Kent DM, Snyderman DR. Absolute Lymphocyte Count: A Predictor of Recurrent Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2018;67(9):1395-402.
  27. Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, Wilhelm MP, Razonable RR. Clinical Predictors of Relapse after Treatment of Primary Gastrointestinal Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients: Predictors of Relapse of GI CMV Disease after SOT. *American Journal of Transplantation*. 2010;10(1):157-61.
  28. Helanterä I, Lautenschlager I, Koskinen P. The risk of cytomegalovirus recurrence after kidney transplantation: Recurrent CMV after kidney transplantation. *Transplant International*. 2011;24(12):1170-8.
  29. Gardiner BJ, Chow JK, Price LL, Nierenberg NE, Kent DM, Snyderman DR. Role of Secondary Prophylaxis With Valganciclovir in the Prevention of Recurrent Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(12):2000-7.

**Table 1: Patients characteristics and CMV Outcomes of the first treated CMV episode stratified by CMV DNAemia persistence at 7 weeks post-treatment**

<b>Patients characteristics</b>	<b>Total cohort n=313</b>	<b>CMV DNAemia persistence n=58</b>	<b>CMV DNAemia eradication n=255</b>
Age at CMV onset (median; IQR)	57 (48-65)	56 (50-68)	57 (48-64)
Male sex (%)	205 (65)	39 (67)	166 (65)
Previous transplant (%)	41 (13.1)	10 (17)	31 (12)
Nephropathy			
Glomerular (%)	79 (25)	16 (27.5)	63 (25)
Tubulo-interstitial (%)	90 (29)	17 (29)	73 (29)
Vascular (%)	35 (11)	11 (19)	24 (9)
Diabetes (%)	20 (6)	2 (3.5)	18 (7)
Nephrectomy (%)	5 (2)	0 (0)	5 (2)
Congenital (%)	31 (10)	6 (10.5)	25 (10)
Unknown (%)	53 (17)	6 (10.5)	47 (18)
Dialysis before transplantation (%)	262 (84)	52 (90)	210 (82)
Antithymocyte globulin therapy (%)	115 (36.7)	24 (41)	91 (36)
Immunosuppressive drugs			
Tacrolimus (%)	224 (71.6)	42 (72)	182 (71)
Ciclosporin (%)	79 (25.2)	13 (22)	66 (26)
Mycophenolate mofetil (%)	286 (91.4)	51(89)	235 (92)
Azathioprine (%)	14 (4.5)	5 (9)	9 (4)
Steroid (%)	212 (67.7)	39 (67)	173 (68)
mTOR Inhibitors (%)	8 (2.6)	1 (2)	7 (3)
Acute rejection before CMV			
TCMR (%)	28 (8.9)	4 (7)	24 (9)
ABMR (%)	10 (3.2)	1 (2)	9 (4)
Glomerular filtration rate (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> , median, IQR)	40 (30-55)	40 (26-52)	40 (30-55)
Baseline tacrolimus blood concentration (ng/ml, median, IQR)	8 (7-10)	8.3 (6.2-10))	8 (7-10)
Day 21 tacrolimus blood concentration (ng/ml, median, IQR)	8 (6.8-10.4)	7.3 (5.9-9.4)	8.8 (7-10.6)
7 weeks tacrolimus blood	8.5 (7-10)	8 (6.4-8.8)	8.5 (7-10)



concentration (ng/ml, median, IQR)			
Baseline ciclosporin blood concentration (ng/ml, median, IQR)	132 (106-165)	120 (104-144)	140 (109-165)
Day 21 ciclosporin blood concentration (ng/ml, median, IQR)	140 (110-170)	151 (132-215)	140 (110-170)
7 weeks ciclosporin blood concentration (ng/ml, median, IQR)	120 (100-150)	151 (104-167)	120 (100-150)
Baseline Lymphocyte count (G/l, median, IQR)	0.77 (0.38-1.15)	0.70 (0.23-1)	0.79 (0.42-1.17)
Day 21 Lymphocyte count (G/l, median, IQR)	0.7 (0.42-1.2)	0.54 (0.40-0.83)	0.76 (0.46-1.20)
7 weeks Lymphocyte count (G/l, median, IQR)	0.76 (0.42-1.1)	0.49 (0.27-0.95)	0.8 (0.50-1.17)
<b>CMV characteristics</b>			
Donor (D)/recipient (R) serostatus at transplantation			
D+ / R- (%)	143 (45.7)	37 (64)	106 (42)
D+ / R+ (%)	107 (34.2)	14 (24)	93 (36)
D- / R+ (%)	47 (15)	3 (5)	46 (18)
D- / R- (%)	4 (1.3)	0 (0)	4 (1.5)
Unknown	12 (3.8)	4 (7)	8 (3)
Preventive strategy			
Universal prophylaxis (%)	148 (47.3)	35 (60)	113 (44)
Preemptive strategy (%)	148 (47.3)	19 (33)	129 (51)
Unknown	17 (5.4)	4 (7)	13 (5)
Type of onset episode			
CMV Infection (%)	95 (30.4)	7 (12)	88 (34.5)
CMV Disease (%)	218 (69.6)	51 (88)	167 (65.5)
Time from transplant to CMV onset (day, median, IQR)	137 (45-249)	215 (85-305)	105 (44-237)
Early onset CMV (%)	142 (45.4)	14 (24)	128 (50.5)
Post-prophylaxis infection or disease (%)	171 (54.6)	44 (76)	127 (49.5)
Initial anti-CMV curative therapy			
Valganciclovir (%)	148 (47.3)	18 (31)	130 (51)
IV Ganciclovir (%)	165 (52.7)	40 (69)	125 (49)
Treatment duration (day, median, IQR)	49 (32-61)	61 (48-84)	47 (30-56)
Baseline CMV DNAemia (UI/mL,	10900 (4150-	67200 (13600-	8600 (3800-

median, IQR)	73850)	686000)	41800)
Day 21 CMV DNAemia (UI/mL, median, IQR)	0 (0-1300)	1400 (999-5900)	0 (0-999)
7 weeks CMV DNAemia (UI/mL, median, IQR)	0 (0-0)	999 (999-999)	0 (0-0)
Time to viral eradication (day, median, IQR)	27 (17-44)	140 (65-285)	23 (15-33)
Received Secondary Prophylaxis (%)	38 (12.1)	4 (6.9)	34 (13.3)
CMV DNAemia recurrence	134 (43%)	11 (19%)	123 (48,2%)
CMV DNAemia increase		25 (43%)	
CMV clinical recurrence at 24 months	65 (21%)	20 (34,5%)	45 (17,6%)
Time to CMV clinical recurrence (day, median, IQR)	84 (63-106)	94 (76-138)	78 (62-97)
Antiviral drug resistance at 24 months	20 (6%)	13 (22,4%)	7 (2,7%)
Time to diagnosis of antiviral drug resistance (day, median, IQR)	112 (80-146)	110 (84-140)	115 (77-146)

Abbreviations: Antibody Mediated Rejection (ABMR); Cytomegalovirus (CMV); Donor (D); Interquartile (IQR); Recipient (R); T Cell Mediation Rejection (TCMR).

**Table 2: Significant factors associated with CMV DNAemia persistence at 7 weeks post-treatment: multivariate analysis**

Variable	Adjusted HR (95% CI)	p-value
D+/R- (vs Recipient CMV seropositive)	3.70 (1.61- 9.09)	0.003
Baseline CMV DNAemia	1.0000005 (1.0000002-1.000001)	0.002
7 weeks low lymphocyte count	2.94 (1.15-8.33)	0.033

Abbreviations: Cytomegalovirus (CMV); Donor (D); Recipient (R); 95% confidence interval (95%CI).

**Table 3: Significant factors associated with clinical recurrence: multivariate analysis**

Variable	Adjusted HR (95% CI)	p-value
Antilymphocyte therapy used	2.25 (1.16-4.35)	0.016
Steroids used	2.31 (1.19-4.46)	0.012
D+/R- (vs Recipient CMV seropositive)	2.56 (1.01-3.57)	0.002
Early onset infection or disease	1.82 (1.02-3.13)	0.041
CMV Disease	2.57 (1.09-6.56)	0.031
Baseline low lymphocyte count	2.08 (1.16-3.70)	0.013

Abbreviations: Cytomegalovirus (CMV); Donor (D); Recipient (R); 95% confidence interval (95%CI).

**Table 4: Factors associated with Antiviral drug resistant CMV infection**

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Unadjusted HR (95% CI)	p-value	Adjusted HR (95% CI)	p-value
Age at CMV onset	1.008 (0.97-1.04)	0.655		
<b>Male sex</b>	<b>0.51 (0.21-1.22)</b>	<b>0.133</b>		
Previous transplant	1.17 (0.34-3.99)	0.8		
Dialysis before transplantation	0.72 (0.24-2.16)	0.562		
ATG	1.64 (0.68-3.93)	0.27		
Steroids	0.88 (0.35-2.21)	0.79		
<b>Tacrolimus</b>	<b>3.69 (0.86-15.90)</b>	<b>0.079</b>		
<b>Ciclosporin</b>	<b>0.032 (0.07-1.38)</b>	<b>0.126</b>		
Mycophenolate mofetil	0.83 (0.19-3.58)	0.805		
<b>Azathioprine</b>	<b>2.36 (0.55-10.18)</b>	<b>0.249</b>		
eGFR	0.99 (0.97-1.02)	0.778		
<b>TCMR</b>	<b>4.54 (0.6-34.48)</b>	<b>0.142</b>		
<b>D+/R-</b>	<b>4.54 (1.54-13.51)</b>	<b>0.006</b>		
Preemptive strategy	0.62 (0.27-1.42)	0.257		
<b>Early onset infection or disease</b>	<b>1.82 (0.75-4.54)</b>	<b>0.19</b>		
<b>CMV Disease</b>	<b>8.46 (1.13-63.19)</b>	<b>0.037</b>		
Baseline CMV DNAemia	1 (1-1)	0.919		
Day 21 CMV DNAemia	1 (1-1)	0.618		
<b>Baseline low lymphocyte count</b>	<b>3.12 (1.07-9.09)</b>	<b>0.035</b>		
<b>7 weeks low lymphocyte count</b>	<b>7.69 (1.7-33.3)</b>	<b>0.0079</b>		

<b>CMV DNAemia persistence</b>	<b>9.00 (3.59-22.59)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>6.25 (2.45-15.96)</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Clinical recurrence</b>	<b>9.58 (3.68-24.9)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>7.20 (2.57-18.09)</b>	<b>&lt;0.001</b>

Abbreviations: Antithymocyte Globulin (ATG); Cytomegalovirus (CMV); Donor (D); estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR); Recipient (R); T Cell Mediation Rejection (TCMR).

Multivariate analysis was performed for all covariates in case of a p-value<0.25 observed in the univariate analysis (in bold). We decided, for clarity, to show only significant factors in multivariate analysis.

## Supplemental

### Supplemental 1: Factors associated with CMV DNAemia persistence at 7 weeks post-treatment, univariate and multivariate analysis

Variable	Unadjusted HR (95% CI)	p-value	Adjusted HR (95% CI)	p-value
Age at CMV onset	1.003 (0.98-1.02)	0.770		
Male sex	1.1 (0.61-2.05)			
Previous transplant	1.51 (0.66-3.18)	0.303		
<b>Dialysis before transplantation</b>	<b>1.73 (0.75-4.73)</b>	<b>0.235</b>		
ATG	1.36 (0.75-2.47)	0.309		
Steroids	1.03 (0.55-1.85)	0.929		
Tacrolimus	1.05 (0.57-2.04)	0.874		
Ciclosporin	0.99 (0.41-1.59)	0.398		
Mycophenolate mofetil	0.62 (0.26-1.65)	0.304		
mTOR inhibitors	0.54 (0.03-3.04)	0.567		
<b>Azathioprine</b>	<b>2.58 (0.77-7.78)</b>	<b>0.101</b>		
Baseline ciclosporin blood concentration	1.01 (0.99-1.03)	0.398		
Day 21 ciclosporin blood concentration	1.01 (0.99-1.02)	0.732		
7 weeks ciclosporin blood concentration	1.01 (0.99-1.02)	0.784		
Baseline tacrolimus blood concentration	1.02 (0.88-1.19)	0.798		
<b>Day 21 tacrolimus blood</b>	<b>1.11 (0.99-1.27)</b>	<b>0.087</b>		

<b>concentration</b>				
<b>7 weeks tacrolimus blood concentration</b>	<b>1.20 (1.02-1.43)</b>	<b>0.0347</b>		
eGFR	1.01 (0.99-1.02)	0.521		
<b>TCMR</b>	<b>2.33 (1.02-6.25)</b>	<b>0.064</b>		
ABMR	2.08 (0.38-33.3)	0.49		
<b>D+/R-</b>	<b>2.86 (1.59-5.55)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.70 (1.61-9.09)</b>	<b>0.003</b>
<b>Preemptive strategy</b>	<b>2.19 (1.22-4.06)</b>	<b>0.010</b>		
<b>Post-prophylaxis infection or disease</b>	<b>3.17 (1.69-6.25)</b>	<b>&lt;0.001</b>		
<b>CMV Disease</b>	<b>1.78 (1.25-3.33)</b>	<b>0.001</b>		
<b>Baseline CMV DNAemia</b>	<b>1.0000003 (1.0000001-1.0000006)</b>	<b>0.011</b>	<b>1.0000005 (1.0000002-1.0000001)</b>	<b>0.002</b>
<b>Day 21 CMV DNAemia</b>	<b>1.0000067 (0.9999991-1.0000187)</b>	<b>0.129</b>		
<b>Baseline Lymphocyte count</b>	<b>1.55 (0.89-3.03)</b>	<b>0.16</b>		
<b>7 weeks Lymphocyte count</b>	<b>3.13 (1.41-7.69)</b>	<b>0.007</b>	<b>2.94 (1.15-8.33)</b>	<b>0.033</b>

Abbreviations: Antibody Mediated Rejection (ABMR); Antithymocyte Globulin (ATG); Cytomegalovirus (CMV); Donor (D); estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR); Recipient (R); T Cell Mediation Rejection (TCMR).

Multivariate analysis was performed for all covariates in case of a p-value<0.25 observed in the univariate analysis (in bold). We decided, for clarity, to show only significant factors in multivariate analysis.



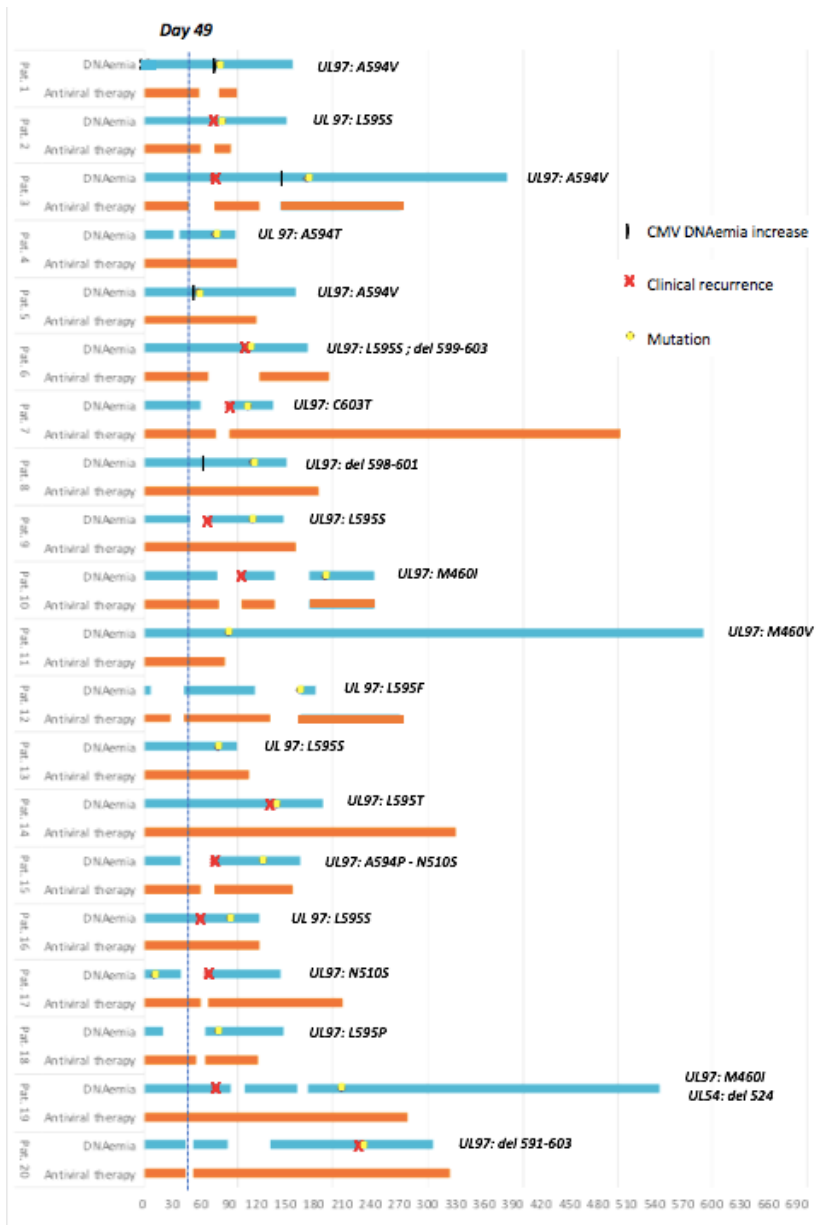
**Supplemental 2: Factors associated with clinical recurrence, univariate and multivariate analysis**

<b>Variable</b>	<b>Unadjusted HR (95% CI)</b>	<b>p-value</b>	<b>Adjusted HR (95% CI)</b>	<b>p-value</b>
Age at CMV onset	1.01 (0.99-1.02)	0.847		
Male sex	1.22 (0.74-2)	0.447		
Previous transplant	1.35 (0.70-2.58)	0.365		
Dialysis before transplantation	1.14 (0.59-2.15)	0.72		
<b>ATG</b>	<b>1.45 (0.85-2.44)</b>	<b>0.168</b>	<b>2.27 (1.16-4.35)</b>	<b>0.016</b>
<b>Steroids</b>	<b>1.41 (0.81-2.44)</b>	<b>0.227</b>	<b>2.31 (1.19-4.47)</b>	<b>0.012</b>
Tacrolimus	1.24 (0.70-2.18)	0.455		
Ciclosporin	1.14 (0.63-2)	0.686		
Mycophenolate mofetil	1.08 (0.43-2.69)	0.866		
mTOR inhibitors	2.08 (0.29-14.9)	0.469		
<b>Azathioprine</b>	<b>2.02 (0.81-5.03)</b>	<b>0.131</b>		
eGFR	1.003 (0.99-1.02)	0.686		
TCMR	1.39 (0.78-2.48)	0.261		
<b>D+/R-</b>	<b>2.49 (1.49-4.16)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>2.56 (1.37-4.76)</b>	<b>0.002</b>
Preemptive strategy	0.93 (0.59-1.49)	0.777		
<b>Early onset infection or disease</b>	<b>1.39 (0.85-2.27)</b>	<b>0.188</b>	<b>1.82 (1.02-3.23)</b>	<b>0.041</b>
<b>CMV Disease</b>	<b>2.97 (1.47-6.01)</b>	<b>0.002</b>	<b>2.57 (1.09-6.06)</b>	<b>0.031</b>
Baseline CMV DNAemia	1 (1-1)	0.975		
Day 21 CMV DNAemia	1 (1-1)	0.646		
<b>Baseline Lymphocyte count</b>	<b>0.61 (0.38-1)</b>	<b>0.05</b>	<b>2.08 (1.16-3.75)</b>	<b>0.013</b>

Abbreviations: Antibody Mediated Rejection (ABMR); Antithymocyte Globulin (ATG); Cytomegalovirus (CMV); Donor (D); estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR); Recipient (R); T Cell Mediation Rejection (TCMR).

Multivariate analysis was performed for all covariates in case of a p-value<0.25 observed in the univariate analysis (in bold). We decided, for clarity, to show only significant factors in multivariate analysis.

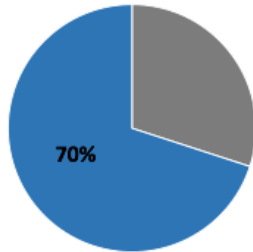




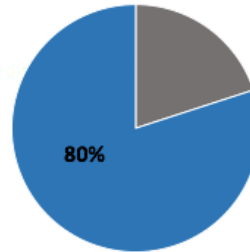
**Figure 3:** Description of the CMV infection history of the twenty patients who developed an antiviral drug resistance CMV infection.

Testing for a CMV drug resistance if 2 criteria are present:  
 1/ a cumulative GCV exposure >6 weeks  
 2/ a treatment failure after >2 weeks of ongoing full dose GCV or VGCV

Testing for a CMV drug resistance if 2 criteria are present:  
 1/ a cumulative GCV exposure >6 weeks  
 2/ **clinical recurrence OR** a treatment failure after >2 weeks of ongoing full dose GCV or VGCV

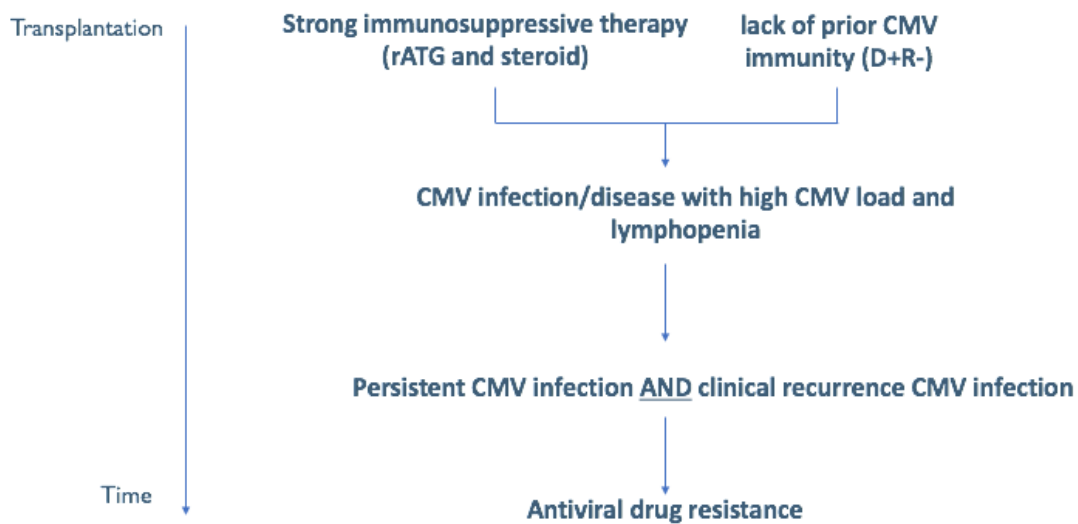


**A**



**B**

**Figure 4:** Detected antiviral drug resistant CMV infection using screening criteria for testing CMV drug resistance (A), and adding the clinical recurrence in the criteria 2 (B).



**Figure 5:** Kinetics of events leading to an antiviral drug resistance CMV infection.

## Conclusions et perspectives

### *Résultats principaux et discussion*

La question de recherche portait sur la description et l'analyse détaillée de l'histoire de l'infection à CMV, de ses complications, et particulièrement de l'émergence de CMV mutants résistants aux antiviraux.

Le premier objectif de notre étude était de décrire l'évolution de l'infection à CMV nécessitant un traitement. Nous avons constaté que 42% des patients ont présenté une évolution favorable de leur infection à CMV traité par GCV ou VGCV, sans récurrence. À l'inverse, 58% des patients ont développé une infection à CMV d'évolution défavorable (ADNémie CMV persistante ou une récurrence à CMV). Le premier problème rencontré par le clinicien lors d'un traitement initial d'un épisode de CMV est l'échec d'éradication virale. Nous avons observé que 18,5% des patients avaient une ADNémie CMV toujours détectable à 7 semaines de traitement. Par la suite, la récurrence à CMV est une autre complication importante d'une infection à CMV. Nous avons décidé de distinguer la récurrence virologique et clinique. Respectivement, 43% et 21% des patients de notre population d'étude ont présenté une récurrence d'ADNémie et une récurrence clinique. Enfin, nous avons observé un taux de 6% de mutation conférant une résistance aux antiviraux prouvée génétiquement. Ce résultat est cohérent avec la littérature précédemment citée.

Le deuxième objectif était de clarifier les facteurs de risque associés à ces CMV compliqués ainsi que les liens entre ces différents événements. Grâce à une analyse multivariée, nous avons pu identifier que dans notre cohorte de transplantés rénaux, les facteurs indépendamment associés à l'ADNémie CMV persistante étaient le statut sérologique D + R-, une charge virale CMV élevée et un taux abaissé de lymphocytes à 7 semaines. Les facteurs de risque associés à la récurrence clinique étaient le statut sérologique D + R-, l'utilisation d'ATG et de corticostéroïdes, un faible nombre de lymphocytes à J1, une infection dans les trois premiers mois de la transplantation et enfin une maladie à CMV. Ces facteurs de risques sont conformes à ceux retrouvés dans la littérature scientifique décrite en première partie. Concernant l'infection à CMV muté résistant aux antiviraux, seulement deux facteurs ont montré une association significative en analyse multivariée : l'ADNémie CMV persistante et la récurrence clinique. La combinaison de ces deux événements semble

intégrer les facteurs de risque de base connus dans la littérature scientifique, pour finalement conduire à une mutation conférant une résistance aux antiviraux. Notre approche chronologique permet donc de relier ces différentes complications de l'infection à CMV, pour mener au final au développement de mutation conférant une résistance antivirale.

### *Les perspectives*

Nos données fournissent des informations pour la conception d'études futures. L'identification précoce des patients qui développeront une infection à CMV d'évolution défavorable est d'une importance majeure pour tester de nouvelles stratégies dans cette population. En effet, le développement de score prédictif, basé sur des critères tels que le sérostatut CMV, le traitement immunosuppresseur, ou encore la charge virale et le taux de lymphocytes, permettrait *in fine* de mieux classer les patients à risque et de leur proposer une stratégie adéquate telle que la minimisation précoce de l'immunosuppression. Des études prospectives sont nécessaires pour déterminer quel type de stratégie de minimisation serait efficace pour améliorer la prise en charge de ces épisodes à CMV.

Aussi, l'analyse chronologique réalisée montre que l'ADNémie CMV persistante est une étape clé dans le développement de mutation conférant une résistance antivirale. Il semble pertinent d'étudier de manière plus précise la conduite à tenir vis-à-vis de ces patients. Les recommandations actuelles préconisent une poursuite des traitements antiviraux jusqu'à l'éradication virale, tout en indiquant qu'une clairance virale complète peut ne pas être atteinte dans certains cas. On sait pourtant qu'une exposition prolongée aux antiviraux favorise l'émergence des CMV mutants. Il s'agit donc d'une situation où les bonnes pratiques ne sont pas connues.

Enfin, nous avons identifié un nouveau facteur de risque associé à une résistance aux antiviraux, qui est la récurrence clinique. L'ajout de cet événement dans les critères de dépistage des CMV mutants est bénéfique dans notre cohorte, mais nécessite une validation lors d'études prospectives.

## Serment d'Hippocrate

« Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.

Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances.

Je ne prolongerai pas abusivement les agonies.

Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences.

Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque. »



# Characteristics and time course of CMV infections leading to antiviral drug resistance

## Abstract

**Introduction:** CMV guidelines recommend testing for an antiviral drug resistance in kidney transplant recipients (KTR) who exhibit the two following criteria: 1/ a cumulative (Val)ganciclovir ((V)GCV) exposure >6 weeks and 2/ a treatment failure after >2 weeks of ongoing full dose (V)GCV. The objectives of this study were to describe the characteristics, the risk factors and the time course of CMV infections leading to antiviral drug resistance.

**Material and methods:** We performed a retrospective cohort study in 313 KTR treated for a first episode of CMV infection or disease from Oct 2004 to December 2017. Logistic and Cox regression analyses were performed for identifying risk factors of persistent CMV DNAemia, CMV recurrence, and antiviral drug resistance.

**Results:** Fifty-eight (18%) of the 313 KTR developed persistent CMV DNAemia and 65 (21%) clinical recurrence. The risk factors of persistent CMV DNAemia and clinical recurrence were similar: treatment with corticosteroid and anti-lymphocyte globulin, D+R- CMV serostatus, lymphopenia, high viral load and CMV disease. The incidence of an antiviral drug resistance was 6.3% (20/313). Importantly, 30% of antiviral drug resistances were detected outside the screening criteria indicated by the guidelines. We found that persistent CMV DNAemia (HR = 6.25, CI95% 2.45-15.96,  $p < 0.001$ ) and clinical recurrence (HR = 7.20, CI95% 2.57-18.09,  $p < 0.001$ ) were the only risk factors associated with the development of antiviral drug resistance. The addition of the clinical recurrence to the 2 current criteria improved the screening strategy of antiviral drug resistance by 10%.

**Conclusion:** We identified a new scenario leading to resistance to antivirals associating persistent CMV DNAemia and clinical recurrence. This perspective involving a chronological analysis of the history of the CMV episode could allow a better and earlier diagnosis of antiviral resistance.

**Key words:** cytomegalovirus, kidney transplantation, antiviral drug resistance