



**HAL**  
open science

# Apport de la PCR et de la détection de l'antigène pp65 (antigénémie) pour le diagnostic des infections à cytomégalovirus en transplantation rénale

Nathalie Buthod, Nathalie Thérin

## ► To cite this version:

Nathalie Buthod, Nathalie Thérin. Apport de la PCR et de la détection de l'antigène pp65 (antigénémie) pour le diagnostic des infections à cytomégalovirus en transplantation rénale. Sciences pharmaceutiques. 1994. dumas-03217925

**HAL Id: dumas-03217925**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03217925>**

Submitted on 5 May 2021

**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.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)



115 014616 6

*C. Kempf*

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1 -  
U.F.R. DE PHARMACIE**  
Domaine de la Merci - LA TRONCHE -

Année 1994

Mémoire n°

7038

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

Présenté et soutenu publiquement

le 13 Septembre 1994, par

**Nathalie BUTHOD**

[Données à caractère personnel]

et

**Nathalie TONDUT ep.THERIN**

[Données à caractère personnel]

Conformément aux dispositions de l'Arrêté  
du 4 Octobre 1988 tient lieu de :

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE  
DOCTEUR EN PHARMACIE**

**APPORT DE LA PCR ET DE LA DETECTION DE L'ANTIGENE  
pp65 (ANTIGENEMIE) POUR LE DIAGNOSTIC DES  
INFECTIONS A CYTOMEGALOVIRUS EN  
TRANSPLANTATION RENALE**

JURY

PRESIDENT

Monsieur le Professeur A. FAVIER

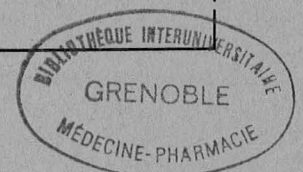
MEMBRES

Monsieur le Professeur J. M. SEIGNEURIN

Monsieur le Docteur P. MORAND

Madame le Docteur B. GRATACAP-CAVALLIER

Monsieur le Docteur F. BAYLE



**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1 -  
U.F.R. DE PHARMACIE**  
Domaine de la Merci - LA TRONCHE -

Année 1994

Mémoire n° 7038

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

Présenté et soutenu publiquement

le 13 Septembre 1994, par

**Nathalie BUTHOD**

[Données à caractère personnel]

et

**Nathalie TONDUT ep.THERIN**

[Données à caractère personnel]

Conformément aux dispositions de l'Arrêté  
du 4 Octobre 1988 tient lieu de :

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE  
DOCTEUR EN PHARMACIE**

**APPORT DE LA PCR ET DE LA DETECTION DE L'ANTIGENE  
pp65 (ANTIGENEMIE) POUR LE DIAGNOSTIC DES  
INFECTIONS A CYTOMEGALOVIRUS EN  
TRANSPLANTATION RENALE**

JURY

PRESIDENT

Monsieur le Professeur A. FAVIER

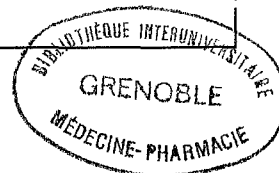
MEMBRES

Monsieur le Professeur J. M. SEIGNEURIN

Monsieur le Docteur P. MORAND

Madame le Docteur B. GRATACAP-CAVALLIER

Monsieur le Docteur F. BAYLE



*A mes parents et toute ma famille  
A Laurence*

*A James*

*A tous mes amis*

*A mes parents et toute ma famille  
A Isabelle, Jean-Pierre, Romain, Rémi*

*A Jean-Yves  
A Manon et Thomas*

*A tous mes amis*

A NOTRE PRESIDENT DU JURY,

**Monsieur le Professeur A. FAVIER**

*Nous avons pu tout au long de nos études apprécier son  
enthousiasme et ses compétences.*

*Il nous fait l'honneur d'accepter d'être le Président de notre jury.*

*Nous lui exprimons tout notre respect et toute notre gratitude.*

**A Monsieur le Professeur J. M. SEIGNEURIN**

*qui nous a permis de réaliser ce travail  
au sein de son laboratoire*

*Il nous fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.*

*Qu'il nous permette d'exprimer ici le témoignage de notre  
profonde gratitude.*



**A Madame le Docteur B. GRATACAP-CAVALLIER**

*qui a suivi et dirigé ce travail*

*Nous tenons à la remercier tout particulièrement  
pour la gentillesse et la grande disponibilité  
dont elle fit preuve.*

**A Monsieur le Docteur P. MORAND**

*qui nous a apporté de précieux conseils dans la  
rédaction de ce travail.*

*Qu'il reçoive ici tous nos remerciements.*

**A Monsieur le Docteur F. BAYLE**

*Nous sommes très touchés de l'honneur que vous nous faites  
en acceptant de juger ce travail.*

*Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde  
reconnaissance et de nos sincères remerciements.*

*Nous tenons enfin à remercier les techniciennes  
du laboratoire de Virologie, secteur de la culture,  
pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce  
travail.*

# SOMMAIRE

# SOMMAIRE

Page

## INTRODUCTION

1

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE 1: GÉNÉRALITÉS SUR LE CYTOMÉGALOVIRUS

#### 1. CLASSIFICATION

2

#### 2. CARACTERES DU VIRUS

3

2.1. Morphologie du virus

3

2.2. Le génome viral

2.2.1. Structure

3

2.2.2. Variabilité des souches

4

#### 3. MULTIPLICATION DU VIRUS SUR CULTURE CELLULAIRE

4

3.1. Cycle du CMV sur cellules permissives

4

3.2. Adsorption, pénétration, décapsidation

5

3.3. Transcription et réplication

5

3.4. Enveloppement et libération de virions

6

#### 4. PHYSIOPATHOLOGIE

6

4.1. Quelles sont les cellules cibles lors de la primo-infection ou des réactivations ?

7

4.1.1. Leucocytes du sang périphérique

7

4.1.2. Progéniteurs de la moelle osseuse

7

4.1.3. Les cellules endothéliales et épithéliales

7

4.2. Dans quelles cellules persiste le virus latent ?

8

4.2.1. Au niveau sanguin

8

4.2.2. Au niveau tissulaire

9

4.3. Quels sont les mécanismes entraînant des signes cliniques ?

9

4.3.1. La cytolysse directe

10

4.3.2. La cytolysse immune

10

4.4. Quels sont les effets du CMV sur le système immunitaire ?

10

4.4.1. Relation du CMV avec l'immunité à médiation cellulaire

10

4.4.2. Relation du CMV avec l'immunité à médiation humorale

11

## **CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS À CMV**

<b>1. CULTURE CELLULAIRE</b>	15
1.1. Culture classique	15
1.2. Culture courte avec recherche d'antigènes précoces	15
<b>2. MISE EN EVIDENCE DU VIRUS OU DE SES STRUCTURES A PARTIR DU PRELEVEMENT</b>	16
2.1. Détection d'un effet cytopathique cellulaire par techniques cytologiques et histologiques	16
2.2. Détection directe des antigènes viraux à partir du produit pathologique	16
2.2.1. Recherche d'antigènes viraux sur les polynucléaires circulants	
Antigénémie	17
2.2.2. Détection d'antigènes viraux intracellulaires par immunocytochimie à partir des autres prélèvements	18
2.3. Détection directe des acides nucléiques dans les produits pathologiques	19
2.3.1. Techniques de Dot-Blot et Southern Blot	19
2.3.2. L'hybridation in situ	20
2.3.3. Amplification génique in vitro par réaction de polymérisation en chaîne	20
<b>3. MISE EN EVIDENCE DE LA REponse HUMORALE</b>	24
3.1. Les réponses anticorps	24
3.2. Les réactions utilisées	25
3.2.1. La réaction d'agglutination	25
3.2.2. Les tests ELISA	25
3.2.3. La réaction de neutralisation	25
3.3. Interprétation des sérologies	26

## **CHAPITRE 3 : CMV ET GREFFE RENALE**

<b>1. EPIDEMIOLOGIE</b>	28
1.1. Mode de contamination	28
1.1.1. La primo-infection	28
1.1.2. La réactivation	29
1.1.3. La surinfection	29
1.2. Fréquence de l'infection	29
1.3. Facteurs aggravant le risque d'infection	30
1.3.1. Le type d'immunosuppression	30
1.3.2. Les antigènes du CMH de classe 2	31
<b>2. LA MALADIE A CMV: PRINCIPALES FORMES CLINIQUES</b>	31
2.1. Formes modérées	32
2.2. Formes sévères	32
<b>3. REJET ET INFECTION A CMV</b>	33
<b>4. LES SURINFECTIONS OPPORTUNISTES</b>	33
<b>5. THERAPEUTIQUE ANTIVIRALE CURATIVE EN TRANSPLANTATION RENALE</b>	34
5.1. Le Cymevan	34
5.1.1. Mécanisme d'action	34
5.1.2. Utilisation du Cymevan	34
5.1.3. Résistance au Cymevan	35

5.2. Le Foscarnet	36
5.3. Les gamma-globulines	36
5.4. L'acyclovir	36
<b>6. PREVENTION DE L'INFECTION A CMV EN TRANSPLANTATION RENALE</b>	<b>37</b>
6.1. La prévention systématique	37
6.1.1. La prévention de la transmission du CMV par le rein greffé et les produits sanguins chez les receveurs CMV séronégatifs	37
6.1.2. Le choix du traitement immunosuppresseur	38
6.1.3. La vaccination anti-CMV	38
6.1.4. Les gamma-globulines standards ou spécifiques anti-CMV	38
6.1.5. La chimioprophylaxie	39
6.2. La prévention ciblée	39
6.2.1. Les malades à risques	40
6.2.2. Les situations à risques	40
<b>7. RETENTISSEMENT ECONOMIQUE DE LA MALADIE A CMV</b>	<b>40</b>

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **INTRODUCTION**

#### **CHAPITRE 1 : PATIENTS ET PROTOCOLE**

<b>1. DESCRIPTION DE LA POPULATION</b>	<b>43</b>
<b>2. SUIVI DES SUJETS</b>	<b>43</b>
<b>3. TRAITEMENT IMMUNOSUPPRESSEUR PROPHYLACTIQUE</b>	<b>44</b>
3.1. Immunosuppression classique	44
3.2. Protocole RS. 61.443	45
<b>4. TRAITEMENT DES REJETS</b>	<b>46</b>
<b>5. PROPHYLAXIE ANTI- CMV</b>	<b>46</b>
5.1. Gammaglobulines	46
5.2. Ganciclovir	46

#### **CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES**

<b>1. CULTURE RAPIDE</b>	<b>47</b>
<b>2. RECUEIL DES POLYNUCLEAIRES</b>	<b>47</b>
<b>3. ANTIGENEMIE LEUCOCYTAIRE</b>	<b>48</b>
<b>4. POLYMERASE CHAIN REACTION ( PCR)</b>	<b>49</b>
4.1. Traitement des échantillons	49
4.2. Réaction d'amplification génique	49
4.2.1. Caractéristiques des amorces choisies	49
4.2.2. Conditions de la réaction	49



4.3. Révélation	50
4.3.1. Southern-Blott	50
4.3.2. Hybridation avec une sonde chaude marquée au 32 P	50
<b>5. SEROLOGIE</b>	<b>52</b>
5.1. Technique de dosage des IgG	52
5.2. Technique de dosage des IgM	52
<b><u>CHAPITRE 3 : RESULTATS</u></b>	
<b>1. RESULTATS INDIVIDUELS</b>	<b>53</b>
<b>2. RESULTATS GLOBAUX</b>	<b>98</b>
2.1. Analyse globale des prélèvements	98
2.2. Analyse des résultats selon le statut sérologique du couple donneur/ receveur	98
2.3. Valeurs prédictives positives et négatives des différents tests	99
2.4. Comparaison : Antigénémie / PCR	101
2.4.1. Délai de positivité de l' antigénémie et de la PCR après transplantation	101
2.4.2. Délai de positivité de la PCR et de l'antigénémie par rapport à la clinique	102
2.4.3. Evolution de l'antigénémie et de la PCR chez les patients traités	102
2.5. Quantification de l'antigénémie : Relation avec la clinique	105
2.6. Place de la culture dans le diagnostic biologique de l'infection à CMV chez les 22 greffés rénaux	106
2.7. Place de la sérologie dans le diagnostic biologique de l'infection à CMV chez les 22 greffés rénaux	107
<b><u>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</u></b>	
<b>1. LES GRANDS CARACTERES DE L'INFECTION A CMV DANS NOTRE ETUDE PAR RAPPORT A LA LITTERATURE</b>	<b>109</b>
1.1. Fréquences	109
1.1.1. Fréquence de l'infection	109
1.1.2. Fréquence de la maladie	109
1.1.3. Evolution sous traitement	110
1.1.4. Délai d'apparition de l'infection après transplantation	110
1.2. Facteurs favorisant	111
1.2.1. Le type d'immunosuppression	111
1.2.2. Le rejet de greffe	112
1.3. Apport de la prévention	112
<b>2. APPORT DE L'ANTIGENEMIE</b>	<b>113</b>
2.1. Discussion des méthodes	113
2.1.1. Technique de fixation	113
2.1.2. Comparaison : Immunofluorescence/Immunoperoxydase	114
2.1.3. Choix des Acmc	114
2.2. Discussion des résultats	114
<b>3. APPORT DE LA PCR</b>	<b>117</b>
3.1. Discussion des méthodes	117
3.1.1. Choix d'une technique de lyse	117
3.1.2. Choix des amorces	117
3.2. Discussion des résultats	117

<b>4. COMPARAISON DES DEUX TECHNIQUES PAR RAPPORT A LA CULTURE COURTE</b>	120
<b>5. PLACE DE LA SEROLOGIE</b>	121
<b>6. CONCLUSION</b>	122

<b><u>CONCLUSION</u></b>	123
--------------------------	-----

<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	124
-----------------------------	-----

## **ABREVIATIONS**

## **TAMPONS ET SOLUTIONS**

# INTRODUCTION

## **INTRODUCTION**

En 1994, l'infection à Cytomégalovirus (CMV) reste la plus fréquente et la plus sévère des infections virales observées après transplantation rénale, aussi bien en terme de morbidité que de mortalité.

L'existence d'une thérapeutique antivirale spécifique a accru la nécessité d'un diagnostic virologique rapide et précis car son efficacité dépend fortement de la précocité de son administration. Pour assurer le meilleur suivi des patients transplantés rénaux, il importe donc de définir les critères virologiques prédictifs de la survenue d'une infection ou d'une maladie à CMV. Ces critères sont encore imparfaitement connus d'autant que le diagnostic virologique de l'infection à CMV repose aujourd'hui sur la mise en oeuvre de méthodes nouvelles qui ne sont pas encore parfaitement évaluées.

Dans ce travail, nous rappelons dans la première partie bibliographique l'essentiel de la biologie et du diagnostic du CMV, ainsi que ses implications en transplantation rénale. La deuxième partie rapporte et commente les résultats d'une étude prospective effectuée au CHRU de Grenoble en collaboration avec le service de Transplantation rénale du Professeur CORDONNIER et le service de Virologie du Professeur SEIGNEURIN : cette étude incluant 25 sujets ayant bénéficié d'une transplantation rénale a eu pour but d'évaluer l'apport et l'intérêt diagnostique de deux nouvelles techniques : l'ANTIGENEMIE et la PCR (Polymerase Chain Reaction) dans la détection des infections à CMV après transplantation.

SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE

# CHAPITRE 1

## GENERALITES SUR LE CYTOMEGALOVIRUS

### 1. CLASSIFICATION

Le Cytomegalovirus (CMV) appartient à la famille des Herpesviridae. Au sein de cette famille, il est classé du fait de ses propriétés biologiques dans la sous-famille des Béta-Herpesviridae (Tableau 1). Le CMV est désigné dans la nomenclature internationale sous le nom de Human Herpès virus 5 (HHV5).

	Alpha HERPES VIRIDAE	Beta HERPES VIRIDAE	Gamma HERPES VIRIDAE
Spécificité d'hôte	Variable	Etroite Fibroblastes (in vitro)	Limitée Lymphoblastes (in vitro)
Durée du cycle	Court	Long	Variable
Effet cytopathogène	Extension rapide	Progression lente en foyer	Variable
Infection latente	Ganglions	Nombreux tissus	Tissu lymphoïde
Virus humains concernés	Herpès simplex virus 1 et 2  Virus Varicelle- zona	Cytomegalovirus	Virus Epstein-Bar

**Tableau 1**: Subdivision des Herpès virus d'après leurs propriétés biologiques (ROIZMAN, 1982)

## **2. CARACTERES DU VIRUS**

### **2. 1. Morphologie du virus**

Il s'agit d'un virus enveloppé de 180 à 200 nm de diamètre. De l'extérieur vers l'intérieur, on rencontre :

- L'enveloppe formée d'une membrane bilamellaire, contenant les glycoprotéines majeures du virus : gp 93 / 130 et gp 55 / 58. Elles résultent du clivage d'une protéine précurseur présente dans les cellules infectées mais absente dans les virions : la gp 150. Ces glycoprotéines d'enveloppe sont très spécifiques de souches et sont impliquées dans les réactions de séroneutralisation.

Deux protéines de l'enveloppe 36 et 65 Kd fixent la  $\beta$ 2 microglobuline des antigènes du CMH de classe I. Cette propriété contribuerait à l'adsorption du virion sur les récepteurs des cellules cibles ce qui augmenterait son infectivité (BECK, 1988). Par ailleurs, le CMV recouvert de la  $\beta$ 2 microglobuline pourrait ainsi être protégé des anticorps neutralisants. Les protéines de surface du virus fixent également les IgG par leur fragment Fc ce qui protège les cellules infectées de la lyse médiée par les anticorps en présence de complément et empêche leur reconnaissance par les cellules cytotoxiques.

- Le tégument : Il s'agit d'un matériel fibreux protéique constitué de 5 protéines phosphorylées (pp) dont deux : la pp150 et la pp65 sont très immunogènes.

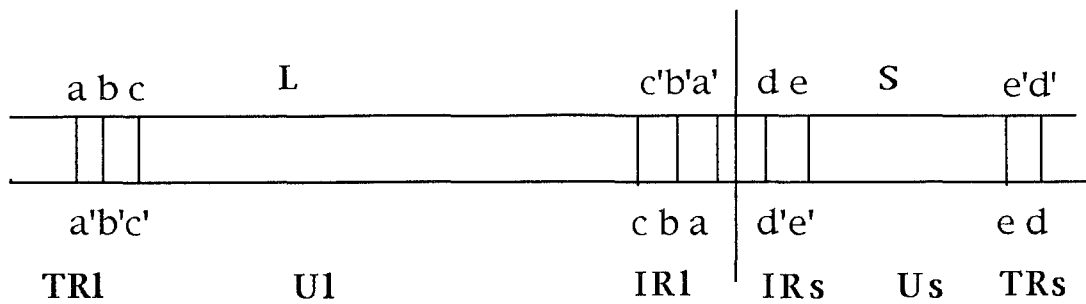
- Une capsid icosaédrique de 110 nm de diamètre, formée de 162 capsomères. Elle renferme deux protéines principales : 153 et 34 Kd et deux petites protéines : 28 et 11 Kd. Une protéine basique de 52 Kd est liée à l'ADN. Une protéine de 38 Kd, présente uniquement dans les particules non infectieuses, contribue à l'assemblage de particules virales.

- Le noyau constitué d'une molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) bicaténaire, enroulée sur un cylindre protéique.

### **2. 2. Le génome viral**

#### **2. 2. 1. Structure**

L'ADN du CMV est le plus grand et le plus complexe de tous les génomes des Herpesviridae avec 240 000 paires de bases et un PM de  $155 \cdot 10^6$ . Il est constitué de deux fragments : L (long : 82% de la molécule) et S (court : 18% de la molécule). La région de jonction des deux fragments est composée de la répétition inversée IRL (Internal Repeat L) - IRS (Internal Repeat S) de séquences d'ADN se trouvant aux deux extrémités de la molécule TRL (Terminal Repeat L) et TRS (Terminal Repeat S). Les séquences uniques de la région L et S sont appelées respectivement UL et US.



**Schéma 1** : Représentation schématique des séquences répétées inversées du génome du CMVH

Chaque segment UI et Us peut être orienté dans deux directions donnant ainsi 4 formes isomères de l'ADN viral, observées pour la première fois lors de l'analyse en microscopie électronique de l'ADN du CMVH partiellement dénaturé et restant donc apparié par des régions riches en G+C (KILPATRICK, 1976).

Cette structure moléculaire particulière range le CMVH dans le groupe E de la classification moléculaire des Herpesviridae.

### 2. 2. 2. Variabilité des souches

D'une souche de CMVH à l'autre, les profils de restriction varient, mais cette hétérogénéité est limitée, toutes les souches ayant au moins 90% d'homologie entre elles et avec l'ADN de la souche de référence AD169. Les génomes des isolats sont colinéaires (COLIMON, 1985).

Dans les régions uniques, l'ordre et la séquence des sites de restriction sont hautement conservés. Les souches ne varient que par la présence ou l'absence de quelques sites de restriction, mais aucune délétion ou insertion majeure n'a été observée.

En revanche, l'analyse des régions répétées montre une grande variabilité de taille des séquences en position terminale (TRI et TRs) et dans la région de jonction (IR1 et IRs) : c'est à leur niveau que sont observées des homologies de séquences avec l'ADN cellulaire humain (SHAW, 1985).

## **3. MULTIPLICATION DU VIRUS SUR CULTURE CELLULAIRE**

### **3. 1. Cycle du CMV sur cellules permissives**

Les Cytomegalovirus ont les caractères généraux des Herpesviridae. Lorsqu'ils pénètrent dans une cellule, l'infection peut se traduire par une réplication active



aboutissant à la production de néo-virions eux même infectieux et à une destruction de la cellule. Alternativement, la persistance du génôme viral à l'intérieur du noyau de la cellule infectée peut entraîner un état de latence et éventuellement pour certaines cellules la transformation cellulaire.

In vitro, le cycle productif est obtenu uniquement sur cellules fibroblastiques embryonnaires humaines (par exemple les cellules MRC5) et les premiers virions infectants ne sont mis en évidence que 72 à 96 heures après l'infection.

Une infection abortive non productive, marquée par l'expression des protéines virales précoces en l'absence de réplication des génomes viraux peut-être obtenue in vitro dans certaines cellules animales et épithéliales humaines.

In vivo, de nombreux types de cellules sont infectées : cellules épithéliales glandulaires (rein, foie, glandes salivaires, épithélium digestif, parenchyme pulmonaire, pancréas), musculaires, osseuses, monocytes, lymphocytes activés, cellules épithéliales, mais toutes ne permettent sans doute pas un cycle permissif.

### **3. 2. Adsorption, pénétration, décapsidation**

L'enveloppe du virus s'attache à des récepteurs, non encore clairement identifiés de la membrane cytoplasmique de la cellule. Après fusion entre enveloppes virales et membranes cytoplasmiques, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme; la capsidie en migrant à travers le cytoplasme est dégradée par les enzymes lysosomiales et le nucléoïde pénètre dans le noyau.

### **3. 3. Transcription et réplication**

Les différentes étapes de la transcription du CMVH ont permis de définir 3 types de gènes répartis dans tout le génome viral.

- Gènes IE (Immediate Early) : gènes d'expression très précoce, correspondant à 20% du génome et comportant 4 unités majeures de transcription IE1, IE2, IE3, IE4.

La transcription de ces gènes se fait en l'absence de synthèse de protéines virales. Ils codent pour des protéines très précoces qui induisent l'élargissement de la cellule et régulent les transcriptions ultérieures.

- Gènes E (Early) : gènes d'expression précoce représentant 55% du génome, transcrits 4 à 6 heures après l'infection. Leur transcription ne se fait que si les gènes IE sont transcrits et traduits.

On ne connaît pas encore le rôle fonctionnel de la plupart des protéines codées par ces gènes. Certaines sont impliquées dans l'induction de l'effet cytopathogène et dans

l'induction de la synthèse de macromolécules de la cellule hôte. Une ADN polymérase virale de 140 Kd est synthétisée à cette période. Une protéine kinase de 68 Kd induite par le virus fait son apparition pendant cette phase.

- Gènes L (Late) : gènes tardifs correspondant à 25% du génome, transcrits à partir de la 24<sup>ème</sup> heure après l'infection. Les gènes tardifs sont des gènes structuraux qui codent pour des phosphoprotéines de la capsidie et du tégument et pour des glycoprotéines d'enveloppe.

Ces gènes ne sont exprimés que si la synthèse de l'ADN viral a eu lieu (la réplication de l'ADN débute à la 12<sup>ème</sup> heure).

### **3. 4. Enveloppement et libération de virions**

Les nucléocapsides virales apparaissent dans le noyau à la 48<sup>ème</sup> heure. Elles sortent du noyau en s'enveloppant à travers le feuillet interne de la membrane nucléaire et migrent vers le cytoplasme. Au sein de l'inclusion cytoplasmique, elles acquièrent les protéines du tégument dont la synthèse en excès dans les saccules de l'appareil de Golgi forment les "corps denses", deux à trois fois plus gros que les virions, très antigéniques. La cellule est ensuite détruite au 4<sup>ème</sup> / 5<sup>ème</sup> jour.

## **4. PHYSIOPATHOLOGIE (INFECTION CONGÉNITALE EXCLUE)**

Comme pour tous les Herpès virus, la physiopathologie du CMV peut se résumer en quatre étapes : la contamination, la primo-infection (phase de réplication virale), la persistance du virus dans l'organisme (virus latent ou réplication à minima), et éventuellement les réactivations virales ou réinfections exogènes (par une souche virale différente chez un sujet antérieurement infecté).

Il est primordial de noter que, les phases de primo-infection et, de réactivation ou réinfection s'accompagnent de signes biologiques d'infection à CMV (virémie, excrétion virale dans les produits biologiques, réponse sérologique) de façon certainement systématique, alors que les manifestations cliniques qui constituent la maladie à CMV sont très peu fréquentes globalement et dépendent étroitement du système immunitaire du sujet. La forme clinique, la fréquence et la gravité de ces maladies à CMV varient en fonction du type d'immunosuppression.

Les principales caractéristiques admises ou encore discutées de ces quatre étapes sont reprises dans le tableau 2 . Nous ne développerons ici que quelques aspects de cette physiopathologie en abordant certaines questions.

#### **4. 1. Quelles sont les cellules cibles lors de la primo-infection ou des réactivations ?**

Lors de ces deux phases, les signes biologiques d'infection existent et témoignent de la dissémination hématogène et de l'excrétion virale.

##### 4. 1. 1. Leucocytes du sang périphérique

Au niveau du sang périphérique se sont principalement les polynucléaires qui véhiculent le virus après sa phagocytose (sous forme de virions libres ou de virus intracellulaires). Ils deviennent donc cellules productives et par conséquent sites de réplication virale. De 1 à 20 % des polynucléaires circulants (moyenne 5%) transcrivent des ARNm spécifiques du CMV qui ont pu être détectés par hybridation in situ (DANKNER, 1990).

Les monocytes sont infectés à un niveau moindre mais constituent également un site de réplication : 0,01% à 1% détectés par hybridation in situ. Quant aux lymphocytes, ils ne semblent l'être que rarement : <0,01% et l'hypothèse d'une contamination de ces derniers par les monocytes, n'est pas exclue (DANKNER, 1990).

La mise en évidence de protéines spécifiques : IEA, EA, LA ainsi que la présence d'ADN et d'ARNm dans les leucocytes prouve qu'une réplication virale active est possible dans ces cellules et que la phagocytose ne peut pas être le seul mécanisme responsable de la présence virale (DANKNER, 1990).

##### 4. 1. 2. Progéniteurs de la moelle osseuse

Il a également été évoqué l'infection de progéniteurs de la moelle osseuse par le CMV, les infections symptomatiques s'accompagnant de leucopénie, de thrombopénie, et de présence de cellules cytomégaliennes dans la moelle osseuse. Des techniques d'amplification génique (PCR) ont prouvé la présence de génomes du CMV dans ces cellules souches.

La dissémination virale se fait à différents niveaux tissulaires par ces cellules sanguines infectées.

##### 4. 1. 3. Les cellules endothéliales et épithéliales

Un autre site cellulaire de la réplication virale a été mis en évidence récemment : ce sont les cellules endothéliales. Elles sont infectées par les cellules sanguines au niveau des capillaires et des petits vaisseaux, et deviennent permissives pour le virus. Elles infectent les cellules contiguës puis la réplication virale induit une augmentation du

volume nucléaire et finalement à cause de sa taille la cellule se détache de l'endothélium pour rejoindre la circulation sanguine.

Ces cellules endothéliales géantes ont été retrouvées au niveau sanguin de patients immunodéprimés virémiques par plusieurs équipes (GREFTE, 1993; PERCIVALLE, 1992). Elles ont démontré que ces cellules présentes dans le sang périphérique avaient une morphologie proche des cellules à inclusions cytomégaliennes et qu'elles exprimaient les antigènes des trois stades (IEA, EA, LA). L'origine endothéliale de ces cellules a été prouvée par l'utilisation de marquages cellulaires et enzymatiques.

Au niveau sanguin elle peuvent être phagocytées par les polynucléaires ou les macrophages (PERCIVALLE, 1992), mais elles peuvent aussi se disséminer dans l'organisme et être la cause de foyers secondaires d'infection (PEROL, 1993). In situ, ces cellules endothéliales sont responsables de lésions de vascularites oblitérantes et ischémiques et certains auteurs ont évoqué la responsabilité du CMV dans certains phénomènes athérogènes.

Les cellules épithéliales des canaux glandulaires peuvent être de la même façon permissives et productives, elles provoquent des foyers inflammatoires dans les tissus glandulaires et une excrétion virale.

## **4. 2. Dans quelles cellules persiste le virus latent ?**

### 4. 2. 1. Au niveau sanguin

Pour identifier les cellules sanguines responsables de la latence virale, des équipes ont séparé les cellules de sujets sains séropositifs par des techniques de cytométrie en flux (FACS), et recherché soit par hybridation in situ, soit par PCR la présence d'ADN viral.

0, 03% à 2% des leucocytes mononucléés de donneurs de sang séropositifs asymptomatiques transcrivent le gène IE1 (SCHRIER, 1985), la majorité de ces leucocytes étant des cellules T (T4 et T8)

Des techniques d'amplification de l'ADN par PCR ont augmenté la sensibilité de la détection et ce sont les monocytes matures circulants (CD14+) qui semblent être le plus souvent site de latence chez le séropositif asymptomatique (TAYLOR-WIEDERMAN, 1991). D'autre part cette équipe a prouvé que le polynucléaire n'était en aucun cas un site de latence (TAYLOR-WIEDERMAN, 1993).

L'infection des cellules souches de la moelle osseuse par le virus latent pourrait être responsable de l'infection des cellules sanguines, mais l'origine commune des précurseurs des monocytes et des polynucléaires pose un problème. Il semble que, si les précurseurs des granulocytes sont infectés, ils ne seront pas réceptifs aux facteurs de croissance et ne seront pas différenciés contrairement aux monocytes (SING, 1990).

#### 4. 2. 2. Au niveau tissulaire

La détection d'IEA par immunohistochimie ( protéine de 68kD), au niveau de différents tissus a prouvé une grande diversité cellulaire dans les sites de latence.

Les différents organes de séropositifs asymptomatiques où l'IEA a été détecté ont été par ordre de fréquence: le rein, le foie, le poumon , la rate, le cerveau et plus rarement les glandes salivaires, l'estomac (TOORKEY, 1989).

En fait la répartition cellulaire du virus latent montre que les cellules épithéliales (tubulaires et glomérulaires au niveau rénal, bronchiques et alvéolaires au niveau pulmonaire), ainsi que les cellules endothéliales (au niveau du rein , du foie, du poumon, de la rate et du cerveau) constituent des sites préférentiels de latence; ainsi que lymphocytes et macrophages localisés au niveau de certains de ces organes. Toutefois des cellules de la capsule de Bowmans, des hépatocytes, des cellules de Küppfer, et au niveau cérébral des astrocytes ont également été révélés porteurs de cette protéine. Toutes ces localisations permettent d'expliquer des phénomènes particuliers au CMV, telle que l'excrétion asymptomatique du virus dans les urines, qui pourrait être liée à une réplication virale à minima dans les cellules épithéliales rénales pendant la phase de latence.

#### **4. 3. Quels sont les mécanismes entraînant des signes cliniques ?**

Lors de la primo-infection ou des réactivations et réinfections, la présence d'une infection biologique associée à des manifestations cliniques concomitantes correspond à une maladie à CMV.

Ce sont les mécanismes immunitaires qui contrôlent l'infection à CMV, et c'est leur défaillance qui serait responsable de ces signes cliniques.

Le virus peut se retrouver au niveau de différents organes en causant une atteinte uniquement pour certains d'entre eux, et chez certains sujets (GRUNDY, 1990). Par exemple les glandes salivaires et le rein peuvent être sites de réplication, avec une excrétion virale, sans être à priori sites d'une pathologie.

Par contre, une infection du foie, de la rétine ou de l'intestin semble toujours entraîner des signes cliniques. Ces derniers deviennent des sites de réplication virale et les lésions semblent dues aux effets cytopathogènes du CMV .

Les mécanismes physiopathologiques connus impliqués dans les lésions cellulaires dues au CMV sont de deux types :

#### 4. 3. 1. La cytolysse directe

La cytolysse directe est la conséquence de la multiplication intracellulaire du virus avec formation d'inclusions cytomégaliqes. Elle est impliquée notamment au niveau des rétinites et prédomine en fait dans les états d'immunodéficience liés au SIDA où l'immunodéficience est plus globale, plus profonde, plus prolongée.

#### 4. 3. 2. La cytolysse immune

La cytolysse immune fait intervenir le système immunitaire dans la genèse des lésions cellulaires. L'infection à CMV peut par différents mécanismes (défaut de présentation sur la membrane cellulaire d'antigènes viraux, induction ou répression de certains antigènes cellulaires, altération de fonctions lymphocytaires, production de lymphokines) activer le système immunitaire aboutissant ainsi à des lésions cellulaires spécifiques retrouvées au niveau du poumon ou du tube digestif (FREYMUTH, 1993; GRUNDY, 1990).

### **4. 4. Quels sont les effets du CMV sur le système immunitaire ?**

Les relations entre le CMV et le système immunitaire sont très complexes (pour revue, SNYDMAN, 1993). Nous n'aborderons dans ce travail que les effets délétères du CMV sur l'immunité. Ces effets sont résumés dans les tableaux ci-dessous.

#### 4. 4. 1. Relation du CMV avec l'immunité à médiation cellulaire

Interaction directe avec les cellules lymphoïdes (les protéines d'enveloppe du CMV se lieraient à la $\beta 2$ micro globuline des antigènes de classe 1 du CMH)
Production de médiateurs solubles de l'inflammation tels que l'interféron et le TNF (GRUNDY, 1990).
Le CMV est responsable d'un métabolisme anormal dans les lymphocytes et les monocytes conduisant à une baisse de la capacité de ces derniers à produire et répondre aux cytokines comme l'IL1 et l'IL2.
Suppression des fonctions des lymphocytes cytotoxiques en réponse aux antigènes spécifiques.
Baisse des CD4+ circulants et augmentation des CD8+ avec inversion du rapport CD4 / CD8

4. 4. 2. Relation du CMV avec l'immunité à médiation humorale

Les IgM produites au cours de l'infection peuvent former des complexes immuns ayant des propriétés cytotoxiques sur les lymphocytes.

Des facteurs rhumatoïdes induits par le CMV pourraient modifier la réponse immune au travers d'une activité anti-idiotypique.

L'homologie du CMV avec des antigènes de classe 2 et de classe 1 du CMH pourrait entraîner la production d'anticorps réagissant directement contre les tissus de l'hôte ou du greffon

	Caractéristiques connues ou admises	Questions non complètement résolues
Mode de contamination	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Strictement humaine</li> <li>- Salivaire</li> <li>- Sexuelle</li> <li>- Sanguine liée à la transfusion</li> <li>- Greffe d'organe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quelle est la forme contagieuse du virus (virus intra cellulaire ou virus libre)?</li> <li>- Comment le virus pénètre-t-il dans la cellule cible?</li> </ul>
Primo-infection	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dissémination par voie hématogène</li> <li>- Excrétion virale</li> <li>- Asymptomatique le plus souvent chez l'immunocompétant</li> <li>- Symptomatique le plus souvent chez l'immunodéprimé cellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quelles sont les cellules permissives pour le virus au niveau sanguin et des différents organes?</li> <li>- Quels sont les mécanismes responsables des signes cliniques?</li> <li>- Quels sont les mécanismes du contrôle immunitaire?</li> </ul>
Latence et persistance	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Asymptomatique</li> <li>- Toute la vie durant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dans quelles cellules le virus peut-il rester latent?</li> <li>- Existe-t-il une réplication virale à minima?</li> </ul>
Réactivation endogène	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Asymptomatique le plus souvent avec excrétion virale intermittente chez l'immunocompétant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quels sont les mécanismes moléculaires contrôlant le passage de la phase de latence à la réactivation?</li> <li>- Quels sont les mécanismes responsables des signes cliniques?</li> </ul>
Réinfection exogène	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Souvent symptomatique chez l'immunodéprimé cellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quelles sont la fréquence et la gravité d'une réinfection exogène par rapport à une réactivation?</li> </ul>

**Tableau 2** : Principales caractéristiques de la physiopathologie du CMV (infection congénitale exclue)



## CHAPITRE 2

### DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A CYTOMEGALOVIRUS

Le CMV ou ses constituants peuvent être mis en évidence dans différents prélèvements, répertoriés dans le tableau 3.

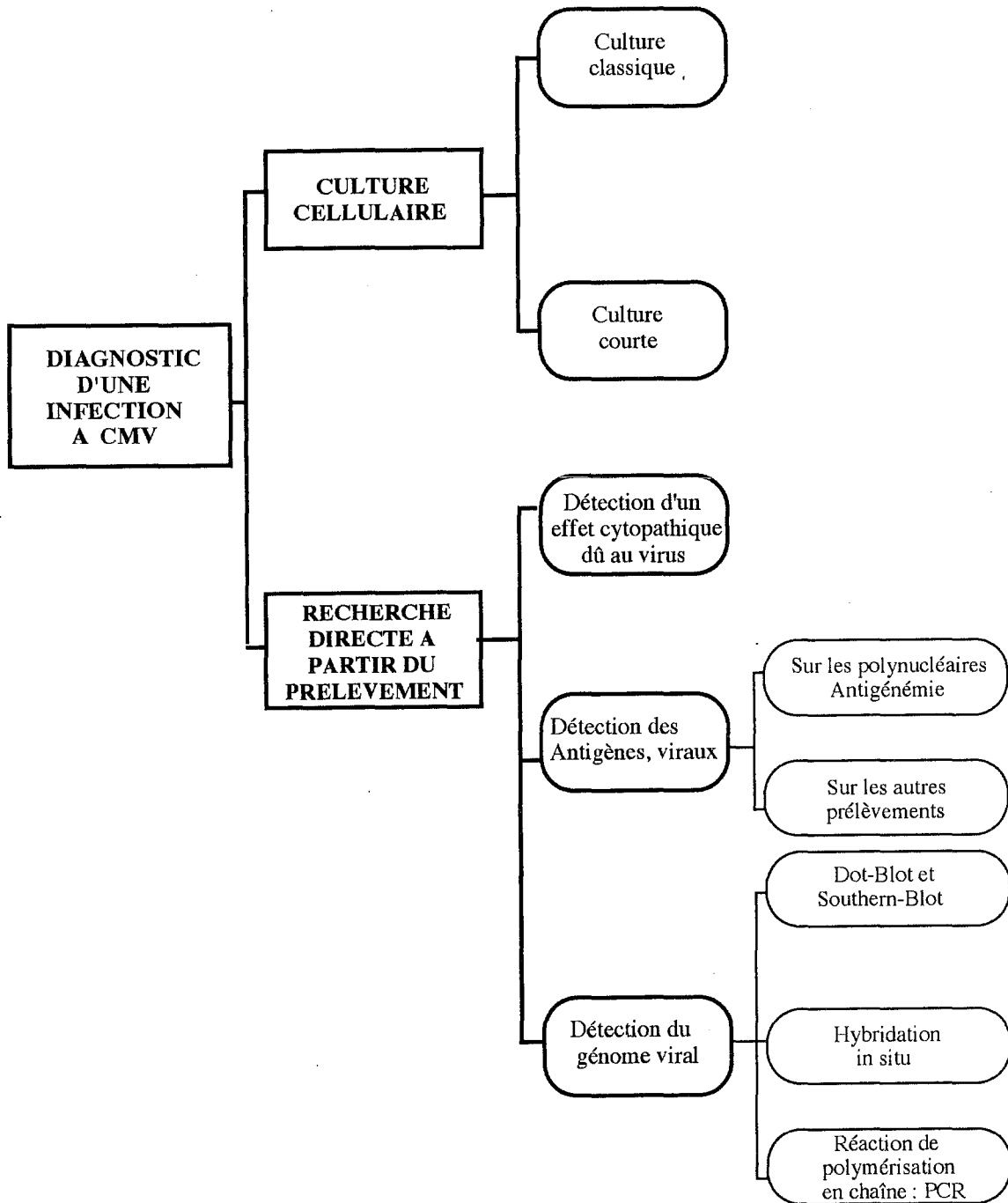
PRELEVEMENT	INTERET DIAGNOSTIQUE	INTERPRETATION DE LA PRESENCE DU CMV
Sang	+++	Infection générale
Biopsies LCR	+++	Atteintes viscérales
Urines LBA	++	Excrétion virale insuffisante à elle seule pour prouver la responsabilité du CMV dans un processus pathologique.
Salive Sécrétions génitales	+	

**Tableau 3** : Prélèvements permettant de rechercher le CMV

Les prélèvements de choix pour diagnostiquer une infection générale ou une maladie à CMV sont représentés par le sang hépariné (virémie, antigénémie) et les biopsies. L'isolement du CMV à partir de la couche leucocytaire (virémie) témoigne d'une infection générale tandis que la détection du virus dans une biopsie permet de suspecter une atteinte viscérale qui devra ensuite être authentifiée par l'analyse histologique.

Dans la pratique, le suivi des sujets immunodéprimés repose sur la recherche à intervalles réguliers (hebdomadaire après transplantation) d'une virémie et d'une virurie, le CMV étant recherché par culture et/ou biologie moléculaire dans les biopsies, le LBA ou le LCR en fonction des signes cliniques.

Les méthodes utilisées dans le diagnostic biologique des infections à Cytomegalovirus sont résumées dans le schéma 2.



**Schéma 2** : Méthodes utilisées dans le diagnostic biologique des infections à CMV.

## **1. CULTURE CELLULAIRE**

### **1.1. Culture classique**

Elle est utilisée pour les prélèvements cités précédemment en inoculant soit

- La couche leucocytaire (sang)
- Le produit biologique directement (LCR).
- Le produit biologique après traitement par un mélange d'antibiotiques (urine, LBA).

Il s'agit de la technique de référence qui fût la première décrite et à laquelle sera comparée toute nouvelle méthode de diagnostic.

Elle a pour but d'observer un effet cytopathogène (ECP) sur culture cellulaire. In vitro le CMV se réplique uniquement sur fibroblastes embryonnaires humains (FEH) : c'est la lignée MRC 5 qui est classiquement utilisée.

L'ECP spécifique est observé à l'état frais, au microscope à phase inversée; il se caractérise par des foyers de cellules cytomégaliqes ovalaires, volumineuses et réfringentes. Le foyer se développe lentement, de cellule à cellule, selon le grand axe des fibroblastes (MAZERON, 1993).

L'effet cytopathogène est observé en moyenne après deux à trois semaines de culture car plusieurs cycles de réplication sont nécessaires. Toutefois, selon le titre infectieux de l'inoculum, l'ECP peut apparaître plus rapidement en 8 à 10 jours ou au contraire nécessiter jusqu'à 6 semaines de culture pour être mis en évidence (MAZERON, 1993).

L'identification du virus et le diagnostic différentiel avec les autres Herpesviridae ou les Adenovirus qui donnent également un ECP sur la lignée MRC5 est obligatoire. Elle fait appel à des techniques d'immunofluorescence (IF) utilisant des anticorps monoclonaux (Acme) ou polyclonaux anti CMV.

Le problème de la culture classique est donc le délai de rendu des résultats peu compatible avec la notion de diagnostic d'urgence. Son intérêt réside dans l'isolement possible de la souche de CMV, isolement qui peut avoir un intérêt pour une étude génomique ou l'étude de la sensibilité de la souche aux antiviraux.

### **1.2 . Culture courte avec recherche d'antigènes précoces**

Cette technique applicable également à tous les prélèvements nécessite un délai de 24 à 48 heures selon les prélèvements. Elle consiste à mettre en évidence sur une culture cellulaire de MRC5 la multiplication du CMV, dès les premiers stades du cycle de réplication en recherchant un antigène très précoce (IEA). Cet antigène est révélé grâce

à un anticorps monoclonal par une réaction d'immunofluorescence ou par une technique immunoenzymatique (MAZERON, 1987; DEGIROLAMI, 1988).

L'Acme le plus utilisé est le E13, Ac dirigé contre les protéines très précoces de PM 72-86 et 52 kD qui ont en commun le produit de l'exon 2 du gène majeur très précoce UL123 (MAZERON, 1992). Ces protéines sont synthétisées dès la deuxième heure de l'infection et persistent pendant tout le cycle de réplication.

La sensibilité de cette technique est fonction de la pénétration du virus dans les FEH. Il a été démontré qu'une centrifugation de la plaque de culture après inoculation était favorable à l'adsorption du virus et à la rapidité de l'infection cellulaire : les conditions optimales de centrifugation sont fixées à 2900 t/mn pendant 45 mn à 36°C (MAZERON, 1987)

De nombreux auteurs ont prouvé que la sensibilité de cette méthode rejoignait ou dépassait même celle de la culture longue (ALPERT, 1985; GLEAVES, 1984; GERNA, 1990).

Des essais de quantification de cette technique ont été effectués : le titre viral de l'inoculum étant obtenu en rapportant le nombre de noyaux positifs dans la totalité de la couche cellulaire, au volume inoculé ou au nombre de cellules inoculées (GERNA, 1990).

## **2. MISE EN EVIDENCE DU VIRUS OU DE SES STRUCTURES A PARTIR DU PRELEVEMENT.**

### **2. 1. Détection d'un effet cytopathique cellulaire par techniques cytologiques et histologiques**

Le diagnostic d'infection à CMV peut se faire par examen cytologique:

- d'étalement ou après cytocentrifugation, à partir de nombreux liquides biologiques (urine, LCR, LBA...)
- de frottis ou appositions de biopsies

Des colorations standards (MGG, Papanicolaou) permettent l'observation de cellules infectées présentant une cytomégalie et des inclusions nucléaires.

Des études histologiques

- de biopsies
  - de pièces opératoires ou autopsiques
- permettent également le diagnostic de l'infection.

Ces techniques sont rapides mais elles manquent de spécificité.

## **2. 2. Détection directe des antigènes viraux à partir du produit pathologique**

La détection d'antigènes viraux intracellulaires par des techniques d'immunofluorescence ou d'immunopéroxydase est réalisable sur les aspirations bronchiques et LBA, les leucocytes et les biopsies .

### 2. 2. 1. Recherche d'antigènes viraux sur les polynucléaires circulants : Antigénémie (à partir de sang total ).

Il s'agit d'une technique qui comme la culture explore la dissémination sanguine du virus en détectant les antigènes viraux sur les polynucléaires circulants. Ses intérêts majeurs résident dans la rapidité de l'exécution (délai de 5 heures), et la simplicité de la technique (ne nécessite pas de culture cellulaire). Elle a de ce fait été évaluée par plusieurs auteurs (VAN DER BIJ, 1989; REVELLO, 1989b; THE, 1990; VAN DEN BERG 1991a; FREYMUTH, 1992; MAZZULI, 1993) .

Le principe de cette méthode est le suivant : les polynucléaires circulants sont extraits en présence de dextran à partir de sang total, ils sont déposés sur une lame en spots de 200000 cellules par cyto centrifugation, et fixés par différentes techniques selon les équipes. Un Acmc anti pp65 est déposé, il se lie aux protéines virales présentes dans le noyau du polynucléaire et une technique d'immunofluorescence (IF) ou d'immunopéroxydase (IP) révèle cette liaison. L'image observée en IF est celle d'un noyau polylobé marqué, net et dense avec une certaine granulation sur toute la surface du noyau. En cas de positivité importante, on observe plusieurs polynucléaires par champ avec un maximum de 1% donc 2000 par spot. En rapportant le nombre de polynucléaires marqués au nombre de polynucléaires testés, on peut rendre cette technique quantitative.

La cible des Acmc utilisés est la phosphoprotéine de matrice pp 65 kD; il s'agit d'une protéine à activité protéine kinase qui est présente en grande quantité dans le tégument viral. Elle est introduite dans la cellule en tant que constituant des virions infectants, et détectée dans le noyau des polynucléaires; elle pourrait être la protéine apportée par l'inoculum, après phagocytose de virions et de corps denses ou endocytose relayée par un récepteur.(CARO, 1993; HALWACHS, 1993).

Les anticorps monoclonaux dirigés contre cette pp65 sont nombreux, plusieurs clones sont disponibles : C10-C11,1C3, F6B, mais un mélange de monoclonaux serait l'idéal (GERNA, 1992).

Certains paramètres contribuent au bon rendement de l'antigénémie. Tout d'abord l'absence de délai entre le prélèvement sanguin, la séparation des polynucléaires, et la préparation des lames est nécessaire pour conserver une morphologie cellulaire qui permette une lecture aisée. La technique de fixation a de l'importance, le méthanol est à rejeter, un mélange méthanol acétone peut être utilisé mais c'est la fixation par le formaldéhyde qui donne les meilleurs résultats (GERNA, 1992; LANDRY, 1993). Ces deux équipes ont également montré que l'IF était plus performante que l'IP.

La réalisation technique est relativement laborieuse, la lecture nécessite une application certaine et c'est avec l'habitude que le lecteur deviendra performant.

L'interprétation de l'antigénémie quantitative pose un problème aux différentes équipes. Un seul noyau marqué sur le spot permet d'affirmer une antigénémie positive pour certains (CARO, 1993; FREYMUTH, 1992); mais d'autres auteurs fixent un seuil à 10 ou 50 cellules positives pour 200000 polynucléaires (REVELLO 1989). On a tenté de corrélérer le résultat quantitatif avec la gravité de l'atteinte clinique (VAN DEN BERG, 1991a; FREYMUTH, 1992; HALWACHS, 1993; LANDRY, 1993). Les controverses sont nombreuses et il faut prendre en compte en analysant un résultat quantitatif, le statut immunitaire du patient et le degré de son immunosuppression.

L'antigénémie est une technique plus sensible que la culture rapide d'après plusieurs équipes (FREYMUTH, 1992; VAN DER BIJ, 1988; ERICE, 1992; LANDRY, 1993; MAZZULI, 1993). Sous traitement antiviral, sa sensibilité est bien supérieure à celle de la culture (longue ou rapide), donc la négativation de la détection est plus lente et cela permet un suivi plus intéressant (REVELLO, 1989a; PEROL, 1993). Une antigénémie persistante sous traitement peut témoigner d'un risque de rechute en cas d'arrêt de l'antiviral (ERICA, 1992).

Un autre intérêt de cette technique réside dans la précocité de la positivité par rapport aux techniques de culture et à la sérologie (VAN DEN BERG, 1991a; THE, 1990; ERICE, 1992). Pour l'équipe de THE dans le suivi de greffe, les cultures se positivent en moyenne une semaine après l'antigénémie et la sérologie deux semaines après.

La valeur prédictive positive de l'antigénémie semble proche de 75% (VAN DER BIJ, 1989), mais elle doit encore être confirmée.

Quoi qu'il en soit, il est déjà acquis que l'antigénémie est très intéressante pour le diagnostic rapide de l'infection à CMV, sans culture. Ses performances au niveau

sensibilité, précocité, valeur prédictive doivent être précisées en particulier en fonction du type de pathologie sous jacente.

### 2. 2. 2. Détection d'antigènes viraux intracellulaires par immunocytochimie à partir des autres prélèvements.

L'anticorps le plus utilisé est le E13, dirigé contre les antigènes précoces du virus. Cette technique est réalisable dans les urines, les LBA et les broyats de biopsies; mais de grandes variations de sensibilité existent cependant selon le type et la qualité du prélèvement. La recherche des antigènes viraux intracellulaires sur les lavages broncho-alvéolaires (LBA) soumis à une centrifugation donne toutefois de bons résultats (GLEAVES, 1989a).

Globalement, cette technique est cependant moins sensible que la culture.

## **2.3. Détection directe des acides nucléiques dans les produits pathologiques**

Le développement des techniques d'hybridation moléculaire a longtemps été limité en pratique pour deux raisons très différentes : d'une part par les contraintes de manipulation des produits radioactifs et d'autre part par la taille du génome du CMV qui présente par ailleurs des homologies de séquences avec les autres Herpès virus.

Actuellement, des sondes très spécifiques sont disponibles, ainsi que des systèmes de marquage non radioactifs.

### 2. 3. 1. Techniques de Dot-Blot et Southern Blot

Plusieurs techniques d'hybridation moléculaire ont été évaluées sur les urines, les LBA et les leucocytes. Les premières, appliquées à la détection du CMV dans les urines ont consisté à extraire l'ADN, à le déposer sur filtre de nitrocellulose ou de nylon puis à l'hybrider : c'est la technique du Dot-Blot.

La technique de Dot-Blot présente une sensibilité insuffisante pour la majorité des prélèvements de LBA et d'urines. Elle ne détecte que 1 à 2 picogrammes d'ADN ( $10^5$  génomes) : la sensibilité est donc bien inférieure à la culture.

Sur les leucocytes, la mise en évidence de l'ADN viral fait apparaître des discordances avec les résultats obtenus par isolement sur cultures cellulaires : le Dot-Blot est aussi sensible que la culture si la technique est réalisée sur la fraction polynucléée alors que des réactions dissociées sont observées avec les cellules mononucléées (SPECTOR, 1984).

puis transfert sur un filtre de nitrocellulose ou de nylon : c'est la technique du Southern-Blot.

L'analyse du génome par Southern-Blot permet la caractérisation des souches rendant ainsi possible chez un greffé séropositif pour le CMV, la distinction entre une réinfection par une souche exogène et une réactivation (GRUNDY, 1988).

### 2. 3. 2. L'hybridation in situ

La détection de l'ADN génomique ou des ARNm du CMV par hybridation in situ est possible sur des cellules ou biopsies d'organes. Des sondes froides ont été utilisées très tôt et des kits permettant de réaliser les différentes étapes de cette technique sont commercialisés. Cette technique combinée aux techniques d'immunocytochimie permet d'identifier les cellules infectées. Elle ne permet habituellement pas de détecter l'infection latente.

La sensibilité de la technique est diversement évaluée selon les auteurs. Sur le tissu pulmonaire, l'hybridation in situ donnerait des résultats comparables à ceux de la détection de l'antigène CMV (REVELLO, 1989b); par contre, sur les cellules obtenues après lavage broncho-alvéolaire, sa sensibilité est inférieure à celle de la culture (GLEAVES, 1989b).

### 2. 3. 3. Amplification génique in vitro par réaction de polymérisation en chaîne.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique d'amplification génique qui permet d'amplifier spécifiquement un fragment précis d'ADN et d'obtenir à partir d'un seul exemplaire du génome viral plusieurs millions de copies d'une séquence de ce génome. L'intérêt majeur d'une telle technique est donc sa très grande sensibilité.

Les différentes étapes de la réaction sont représentées dans le schéma 3.

Différents protocoles d'amplification de gènes du CMVH humain ont été décrits, tout d'abord sur les leucocytes (SHIBATA, 1988) et l'urine (OLIVE, 1989), puis la recherche d'une ADNémie leucocytaire a été ensuite appliquée plus systématiquement dans le dépistage de séquences virales chez les patients greffés (JIWA, 1989).

Les séquences d'ADN à amplifier, sont choisies pour leur spécificité et leur absence d'homologie avec le génome humain et le génome des autres Herpès virus. D'autre part, les amorces utilisées se situent dans les régions les mieux conservées d'un isolat de CMV à l'autre, afin de détecter à l'aide d'un seul couple d'amorces toutes les souches (CHOU, 1992).

La PCR classique utilise après extraction de l'ADN, l'amplification de séquences localisées dans les gènes codant pour les protéines très précoces ou tardives. Après



transfert sur membrane des produits amplifiés, la détection peut se faire par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde nucléique marquée à froid (par la biotine ou la digoxigénine) ou à chaud ( $^{32}\text{P}$ ).

En fonction du nombre de cycles, du type d'amorces et de l'utilisation ou non d'une étape d'hybridation pour révéler les produits d'amplification, la limite de détection de la technique varie de 5 à 60 copies d'ADN viral pour 100 000 cellules (THE, 1992).

Du fait de sa grande sensibilité, même une très faible trace d'ADN contaminant peut donner des résultats faussement positifs. Les contaminations peuvent survenir à tous les stades de la réaction et la cause de contamination la plus souvent incriminée est représentée par des aérosols de fragments d'ADN amplifiés à l'issue de la PCR. Ainsi, pour éviter les risques de contaminations, des mesures de prévention doivent être prises comme la séparation des pièces où s'effectuent les étapes de pré-amplification et de post-amplification, l'utilisation de hottes et d'équipements différents pour chacune des étapes.

L'hybridation du produit d'amplification avec une sonde spécifique permet de vérifier l'authenticité des séquences amplifiées.

L'utilisation d'une "nested PCR" (Les produits amplifiés dans la PCR primaire sont réamplifiés dans une PCR secondaire en utilisant une paire d'amorces internes) permet d'obtenir une meilleure spécificité par rapport à l'hybridation primaire tout en conservant une sensibilité identique (PORTER-JORDAN, 1990).

A l'inverse, des résultats faussement négatifs peuvent être obtenus et sont dûs soit à la présence d'inhibiteurs (héparine, hémoglobine), soit au fait qu'il existe une très grande variabilité des souches de CMV. L'utilisation d'amorces choisies dans des régions hautement conservées limite l'importance de ce phénomène.

Selon les paramètres de la réaction, cette méthode extrêmement sensible, permet même pour certains auteurs de révéler les virus latents dans les polynucléaires chez les sujets séropositifs (TAYLOR, 1991). Cette détection pose un problème pour différencier une véritable infection à CMV de ce que l'on pourrait appeler un "portage sain" à CMV. La diminution du nombre de cycles d'amplification permet d'éviter la détection de virus latents (JIWA, 1989).

La valeur diagnostique de la PCR a été comparée à celle de l'antigénémie au cours de plusieurs études chez les greffés rénaux (VAN DORP, 1992; JIWA, 1989; KIDD, 1993).

L'ADNémie leucocytaire détectée par PCR précède de quelques jours à une semaine l'antigénémie (GERNA, 1991; ROWLEY, 1991). et persiste beaucoup plus longtemps (BITSCH, 1993a).

Parfois, l'ADNémie leucocytaire reste isolée et n'est accompagnée ni d'antigénémie ni de virémie à aucun moment du suivi post-greffe. Au total, il s'agit d'une technique sensible et spécifique mais sa valeur prédictive positive est inférieure aux autres techniques, ce qui limite considérablement son intérêt en clinique.

Les études visant à évaluer la technique sont très nombreuses, mais il est sûr que les travaux sont difficilement comparables entre eux du fait d'un manque de standardisation de la technique.

D'autre part, les étapes de la PCR sont longues et limitent l'intérêt réel de la méthode pour le diagnostic rapide de l'infection à CMV chez un sujet transplanté (FREYMUTH, 1993). Actuellement, d'autres méthodologies PCR sont évaluées pour le diagnostic des virémies à CMV comme méthodes de diagnostic rapide :

- Recherche d'un génome d'Herpes viridae

L'amplification porte sur une partie du gène de la polymérase virale dont la séquence est relativement bien conservée entre le virus Herpès simplex, le CMV et l'EBV. Le virus est ensuite identifié par migration spécifique des fragments obtenus après action des enzymes de restriction spécifiques sur le produit d'amplification (Technique par RFLP).

- Détection des ARNm-CMVH par PCR réverse
- Mise en évidence d'ADN CMV plasmatique

Ces deux dernières méthodologies seront détaillées dans le chapitre discussion de ce travail.

Par ailleurs, la quantification du signal PCR pourrait aider au diagnostic d'une infection à CMV et à l'évaluation du risque de développer une maladie à CMV. Elle pourrait également permettre d'assurer un meilleur suivi des patients recevant une thérapie antivirale. Actuellement, aucune technique de quantification n'a encore réellement fait ses preuves.

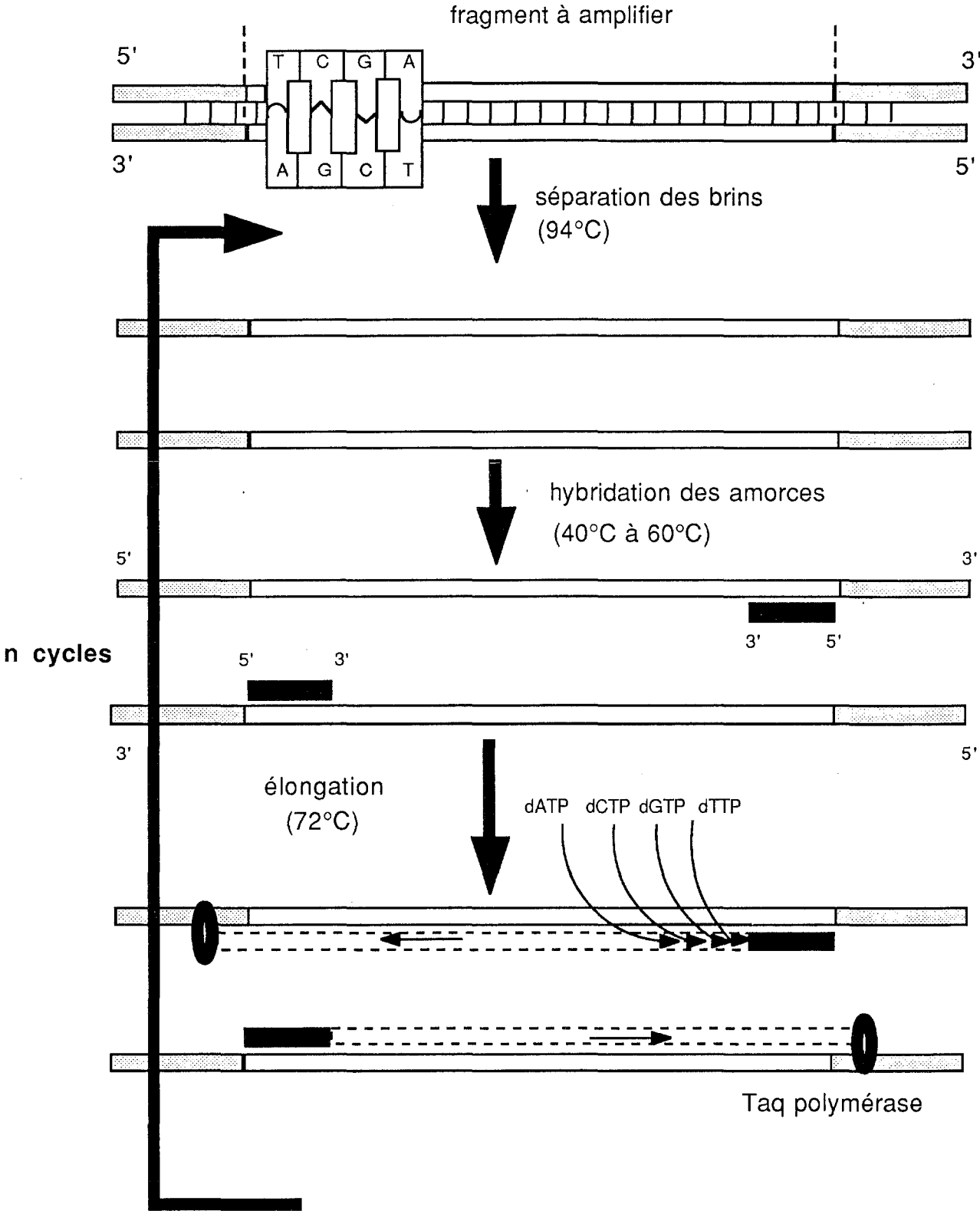


Schéma 3 : Principe de la PCR

### **3. MISE EN EVIDENCE DE LA REPOSE HUMORALE**

La prévalence de la séropositivité vis à vis du CMV chez les adultes va de 50 à 100%. Plus les conditions socio-économiques sont défavorables, plus le pourcentage des individus infectés dans la population est élevé

Les anticorps apparaissent lors de la primo-infection et persistent indéfiniment. Ils ne préviennent ni les réactivations du virus endogène, ni les réinfections par une souche exogène (GREFFE, 1991).

#### **3. 1. Les réponses anticorps**

Le CMV code pour un très grand nombre de protéines mais seules certaines d'entre elles sont immunogènes et les anticorps détectés sont dirigés contre un nombre restreint de ces protéines; il s'agit principalement :

- pour les protéines structurales constitutives du tégument de : la pp150, pp65, p28 et des protéines de poids moléculaire 82, 55 et 38 Kd (LANDINI, 1988)

- pour les protéines non structurales de la p52 (protéine majeure de la liaison à l'ADN).

La pp150 est un antigène très spécifique, reconnu par les IgM et les IgG de façon persistante. La présence d'anticorps spécifiques de la pp150 suffit à affirmer la séropositivité. Les anticorps anti-pp150 sont présents chez près de 100% des patients séropositifs vis à vis du CMVH (LANDINI, 1988).

La pp65, la plus abondante, la plus immunogène est reconnue par les IgM et les IgG dès les débuts de la primo-infection.

La p28 réagit avec la majorité des sérums post-infection, mais une ascension des anticorps anti-p28 serait préférentiellement observée dans les réactivations après greffe.

La p52 est également reconnue par les IgM.

Les glycoprotéines de l'enveloppe portent des épitopes qui sont les cibles des anticorps neutralisants fixant ou non le complément.

Les protéines constitutives de la capsidie sont peu immunogènes. La protéine majeure de 153Kd qui présente des homologies avec les autres herpès viridae humains est reconnue par tous les sérums ayant des anticorps anti CMV mais cette réponse constante est d'apparition lente après la primo-infection.

### **3. 2. Les réactions utilisées**

Outre les réactions classiques (Fixation du complément, immunofluorescence), les tests modernes les plus utilisés sont l'agglutination passive (IgG) et les tests immunoenzymatiques ELISA (IgG et IgM).

#### 3. 2. 1. La réaction d'agglutination

C'est une technique simple et rapide. Le résultat est obtenu en quelques minutes et lisible à l'oeil nu. Cette technique a l'inconvénient d'une lecture subjective et d'un manque de sensibilité (bien que celle-ci se soit nettement améliorée avec les tests les plus récents). Le pourcentage de faux négatifs varie de 2 à 5 % selon la technique utilisée (CHOU, 1988).

#### 3. 2. 2. Les tests ELISA

Ils sont très sensibles et ont l'avantage d'être automatisables. Il existe de nombreuses troupes commercialisées et une certaine variabilité des résultats de la sérologie CMV d'une trousse à l'autre notamment pour les valeurs proches du seuil. Ceci est lié à la fois au nombre et à la complexité des Ag du CMVH, à la réponse hétérogène des individus, à la souche et au mode de préparation de l'antigène utilisé dans le test.

La recherche des IgM initialement décrite par des techniques ELISA doit plutôt faire appel aujourd'hui à des techniques d'immunocapture afin d'éviter certaines réactions faussement positives (Facteurs rhumatoïdes, anticorps anti-nucléaires) ou faussement négatives (compétition pour l'antigène).

#### 3. 2. 3. La réaction de neutralisation

Les performances de la réaction de neutralisation en présence de complément ont été améliorées par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. En pratique, la réaction de neutralisation a peu d'indication. Il a été montré en effet, que les réactivations virales peuvent survenir en présence d'anticorps neutralisants à titre élevé. La présence d'anticorps diminue la sévérité de la symptomatologie clinique, mais le rôle des anticorps neutralisants dans cette protection n'est pas établi.

### **3. 3. Interprétation des sérologies**

L'infection primaire se traduit par une séroconversion avec présence constante d'IgM qui apparaissent deux semaines environ après l'infection et persistent habituellement pendant plusieurs mois.

L'infection secondaire (réinfection ou réactivation) chez les sujets transplantés, se traduit généralement par une augmentation du taux des IgG spécifiques. Les IgM, elles, réapparaissent de façon inconstante et leur persistance est très variable.

La recherche des IgG en ELISA ou agglutination permet de détecter les traces immunologiques d'une infection ancienne, de connaître le statut immunitaire des donneurs de sang ou d'organes et de leurs receveurs en distinguant les sujets séropositifs, des séronégatifs. Elle permet également des études épidémiologiques. Pour le diagnostic d'une infection récente, cette sérologie est peu performante en l'absence d'une paire de sérums permettant de mettre en évidence la séroconversion qui accompagne la primo-infection. Pour le diagnostic d'une infection secondaire, l'élévation du taux des IgG n'est pas toujours significative d'une réinfection ou d'une réactivation : il peut s'agir en effet d'une activation polyclonale.

Les IgM anti-CMV témoignent en général d'une infection virale active, mais ne sont pas toujours un critère fiable de primo-infection.

Elles sont détectées au cours d'infections récurrentes chez 50% des receveurs de greffe de rein (NIELSON, 1988; SAROV, 1984) et sont présentes pendant des mois, voir des années (NIELSON, 1988). Leur apparition est en général tardive mais semble être un facteur de bon pronostic.

Les IgM sont parfois décelables lors des réactivations et des réinfections chez le sujet bien portant. Elles peuvent également manquer chez le sujet immunodéprimé ou être non spécifiques (possibilité de stimulations polyclonales ou de réactions hétérotypiques) (DREW, 1988).

La réponse sérologique est souvent plus tardive que la détection du virus. La virémie ou la virurie, ainsi que l'antigénémie précèdent la réponse anticorps de 10 à 15 jours chez les receveurs d'allogreffe d'organe (MAZERON, 1993).

Le sérodiagnostic est devenu de ce fait essentiellement une méthode d'appoint, par rapport aux techniques virologiques de diagnostic rapide (culture rapide ou antigénémie).

La détection de certains anticorps anti CMV dirigés de façon spécifique contre certaines protéines du virus pourrait avoir un intérêt dans la différenciation des infections primaires et des infections secondaires (réinfection ou réactivation).

Ainsi, l'étude séquentielle de la réponse immune en anticorps sériques dirigés contre diverses protéines du CMV a été réalisée en Western-Blot, mais d'une part la diversité des préparations antigéniques rend difficilement comparables les résultats obtenus dans ces études et d'autre part, les réponses anticorps sont variables selon les individus

## **CHAPITRE 3**

---

### **CMV ET GREFFE RENALE**

L'infection à CMV est un problème préoccupant en transplantation rénale du fait de sa fréquence, mais aussi de son retentissement clinique sur la survie des patients et le devenir fonctionnel du greffon. Elle survient généralement au cours des trois premiers mois suivant l'intervention. Le pic de survenue maximale se situe au deuxième mois c'est à dire lorsque l'immunosuppression est à son maximum.

#### **1. EPIDEMIOLOGIE**

##### **1. 1. Mode de contamination**

Chez les transplantés rénaux, l'infection à CMV peut résulter soit d'une primo-infection, soit d'une réactivation ou d'une surinfection chez un patient anciennement séropositif.

Les chiffres obtenus selon les auteurs sont variables, mais il est sûr que les surinfections par un CMV du greffon ou les réactivations d'un CMV latent sont plus fréquentes que les primo-infections compte-tenu de la diffusion du virus dans une population où plus de 50% des sujets sont porteurs d'anticorps anti-CMV.

##### **1. 1. 1. La primo-infection**

Observée chez les receveurs séronégatifs, la primo-infection est due au virus véhiculé de façon latente par les cellules du donneur séropositif. Dans 80 à 90% des cas, les cellules sont celles du greffon et dans 10 à 20% des cas, il s'agit des leucocytes viables contenus dans les produits sanguins de donneurs séropositifs (RUBIN, 1990). Les produits sanguins ne peuvent être transmetteurs du CMV que s'ils contiennent des leucocytes en quantité suffisante (ANDREU, 1988). Chez les sujets non immunodéprimés, les infections post-transfusionnelles à CMV n'ont qu'une incidence réduite, une morbidité faible et sont toujours résolutives. Il n'en est pas de même chez les sujets immunodéprimés, c'est pourquoi des techniques transfusionnelles précises ont



été élaborées pour les populations à risque (Celles-ci seront détaillées dans le chapitre concernant la prophylaxie de l'infection à CMV).

L'incidence de la maladie et la sévérité des symptômes ne sont pas liées au mode de contamination.

Les primo-infections après transplantation apparaissent chez 90% des receveurs séronégatifs d'un rein prélevé sur cadavre séropositif et chez 70% des receveurs séronégatifs d'un rein de donneur vivant séropositif (RUBIN, 1990).

Tous les donneurs d'organes séropositifs ne sont pas capables de transmettre le CMV au receveur, mais il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueurs capables de distinguer les deux populations (RUBIN, 1990).

### 1. 1. 2. La réactivation

Le virus peut être réactivé chez le receveur. Dans ce cas, c'est l'immunodépression cellulaire générée au moment de la transplantation qui favorise la réactivation des virus persistants dans l'organisme après la primo-infection.

### 1. 1. 3. La surinfection

La surinfection résulte de la contamination par une souche de CMV provenant du donneur qui est différente de celle du receveur. Chez au moins 50% des greffés rénaux séropositifs avant transplantation et recevant un rein de donneur séropositif, le virus activé est celui du donneur (GRUNDY, 1988).

## **1. 2. Fréquence de l'infection**

L'incidence de l'infection en transplantation rénale varie selon les auteurs de 43% à 92%. La diversité des taux d'infections post-transplantation rapportée au cours des dernières années s'explique par l'hétérogénéité des critères diagnostiques et des protocoles d'immunosuppression (LEGENDRE, 1993).

ROCHA, 1991, au cours d'une étude réalisée sur 127 greffés rénaux a observé que la seule population non exposée à un haut risque d'infection à CMV était représentée par les receveurs séronégatifs greffés avec un rein séronégatif et que pour les autres le risque d'infection était le même que le porteur du virus soit le donneur ou le receveur. D'autre part, il juge que les taux d'infection à CMV peuvent être mésestimés si les techniques diagnostiques spécifiques telles que les cultures sanguines ne sont pas effectuées.

Il est essentiel de différencier infection biologique à CMV et infection active ou maladie à CMV: il existe en effet des formes asymptomatiques avec virémie positive chez des patients qui ont une simple réactivation virale.

Selon HO, 1990, 60% des receveurs de greffe de rein font une infection à CMV et 13% d'entre eux développent une maladie symptomatique.

L'incidence de la maladie est différente selon qu'il s'agit d'une primo-infection, d'une réactivation ou d'une surinfection : les 2/3 des sujets ayant une primo-infection présentent des symptômes cliniques, moins de 20% des réactivations sont symptomatiques et plus de 40% de ceux qui présentent une surinfection développent une maladie symptomatique (RUBIN, 1990).

La fréquence des formes sévères et létales de la maladie à CMV analysée selon les critères du Minnesota Health Science Center est de 9% dont 5% de mortalité.

Actuellement, grâce à l'apparition des traitements antiviraux, la mortalité des infections à CMV surtout traitées précocement est faible. Toutefois, selon METSELAAR, 1989, 1 à 3 % des greffés rénaux meurent encore du CMV.

### **1. 3. Facteurs aggravant le risque d'infection**

#### 1. 3. 1. Le type d'immunosuppression

La survenue d'une infection à CMV chez le receveur de greffe d'organe dépend beaucoup du type d'immunosuppression employé, qu'il s'agisse d'une réactivation du CMV chez un receveur séropositif avant la greffe ou d'une primo-infection.

Dans le traitement préventif ou curatif d'un rejet, l'utilisation isolée d'un agent anti-inflammatoire (corticoïde) ou d'un agent cytotoxique (azathioprine) n'entraîne généralement pas une immunodépression suffisante pour permettre le développement d'une infection invasive à CMV. Celle-ci survient quand ils sont associés à de puissants inhibiteurs de la fonction lymphocytaire tels que les anticorps antilymphocytes qu'ils soient polyclonaux (globulines antilymphocytes : ALG, globulines antithymocytes: ATG ou sérum antilymphocytaire : ALS) ou monoclonaux (OKT3 = Orthoclone\*) et à un degré moindre la ciclosporine. La ciclosporine a un effet moindre sur la réactivation de virus latent, mais bloque la réponse de défense de l'hôte contre l'infection (SNYDMAN, 1993).

L'association ALG et ciclosporine est celle qui favorise le plus l'émergence d'infections actives à CMV (RUBIN, 1990).

Les effets des différents agents immunosuppresseurs utilisés en association, sur l'incidence de la pneumonie à CMV après transplantation rénale sont présentés dans le tableau 4 ( HO, 1990).

Localisation du centre médical	Traitement immunosuppresseur	Nombre de patients	N° (%) avec une pneumonie à CMV
Pittsburgh	AZ-P	138	3 (2, 2)
	Cs-P	131	3 (2, 3)
Minnesota	AZ-P-ALG	349	29 (8, 3)
	Cs-P	76	2 (2, 6)

**Tableau 4 :** Effet des différents agents immunosuppresseurs utilisés en association.  
(AZ : Azathioprine; P : Prednisone; Cs : Ciclosporine; ALG : Globulines antilymphocytes)

L'étude menée par HIBBERT, 1992 révèle une multiplication par cinq du risque de maladie à CMV chez les transplantés rénaux séropositifs, ayant reçu une prophylaxie par OKT3 par rapport à ceux pour qui la prophylaxie n'a pas fait appel à l'OKT3.

Une relation dose-effet très nette a pu être mise en évidence dans la symptomatologie de la maladie à CMV en fonction de la dose d'ALG utilisée (METSELAAR, 1989).

Bien que des divergences existent à ce sujet, il semble que les tri-thérapies comprenant de la ciclosporine induisent moins d'infection à CMV que lorsque les globulines antilymphocytes sont utilisées (LEGENDRE, 1993).

### 1. 3. 2. Les antigènes du CMH de classe 2

Il existe une augmentation significative de l'incidence de l'infection à CMV chez les receveurs d'une allogreffe rénale appariés pour l'antigène HLA-DR7. L'étude de BLANCHO, 1992 portant sur 660 greffés rénaux a montré une fréquence plus importante des infections chez les couples donneurs / receveurs appariés pour l'antigène HLA-DR7 sans pour cela que la sévérité de la maladie ne soit augmentée. Les auteurs prouvent aussi que c'est l'association des 2 allèles du donneur et du receveur qui accroît le risque.

Le rôle joué par l'antigène HLA-DR7 sur l'incidence de l'infection à CMV a été constaté par d'autres (KRAAT, 1993), sans que rien à ce jour n'explique les raisons de cette plus forte prévalence.

## **2. LA "MALADIE A CMV" : PRINCIPALES FORMES CLINIQUES**

Les manifestations de l'infection à CMV survenant au cours des trois premiers mois suivant la transplantation vont de l'excrétion asymptomatique à l'infection disséminée multiviscérale. Les formes symptomatiques sont de gravité variable .

La symptomatologie de l'infection à CMV au cours d'une primo-infection est beaucoup plus sévère que celle associée aux réactivations ou aux réinfections. On considère que

80% des infections primaires sont symptomatiques, contre seulement 30% des infections secondaires. Cependant, l'instauration d'un traitement prophylactique chez les patients séronégatifs recevant un organe de donneur séropositif permet actuellement de réduire la sévérité des primo-infections.

## 2. 1. Formes modérées

Il s'agit de la maladie à CMV proprement dite, caractérisée par :

Signes cliniques	Syndrome pseudogrippal : fièvre, myalgie, arthralgie.
Signes biologiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucopénie (89% cas) +/- thrombopénie (23% cas)</li> <li>• Augmentation des transaminases</li> <li>• Présence de lymphocytes activés</li> </ul>

## 2. 2. Formes sévères

Elles sont caractérisées par des manifestations viscérales.

Pneumopathie	Pronostic : 50% de mortalité pouvant atteindre 90% si la ventilation assistée est nécessaire.
Atteinte digestive	L'atteinte est plutôt basse que haute et s'accompagne de diarrhées.
Atteinte rénale (*)	L'atteinte macroscopique est une glomérulonéphrite avec élargissement ou nécrose des cellules endothéliales, accumulation de cellules mononucléées et obturation capillaire par du matériel fibrillaire (RICHARDSON, 1981)
Formes disséminées	Elles sont surtout observées au cours des infections primaires et après traitement par un SAL ou OKT3.
Rétinite	Principale manifestation tardive apparaissant après plus de 6 mois de transplantation.
Hépatite Encéphalite	rare

(\*) Le diagnostic de l'atteinte rénale est souvent difficile à poser car la modification de la thérapeutique immunosuppressive consécutive à l'infection à CMV, peut favoriser la survenue d'un rejet. L'association d'une symptomatologie évocatrice (fièvre et leucopénie par exemple), d'une virémie et de l'élévation de la créatininémie sont les critères retenus par RICHARDSON, 1981 pour poser le diagnostic de néphrite à CMV.

### **3. REJET ET INFECTION A CMV**

Il est classique de dire que le rejet est source d'infections à CMV et vice-versa. L'importance des thérapeutiques immunosuppressives est capitale à ce niveau. En effet, le traitement antirejet (par bolus de prednisolone ou par OKT3) provoque une immunosuppression supplémentaire qui peut faire le lit d'une infection comme le CMV, tandis que la réduction du traitement immunosuppresseur au cours de l'infection à CMV favorise la survenue du rejet.

D'autre part, sans tenir compte des thérapeutiques immunosuppressives, la réaction allogénique de rejet elle même peut avoir un effet activateur sur le CMV (WU, 1975) et il est également possible que l'infection à CMV soit un facteur favorisant le rejet (RICHARDSON, 1981. POUTEIL-NOBLE, 1993). Dans son étude, POUTEIL-NOBLE a étudié l'infection à CMV comme facteur étiologique du rejet au cours d'une étude prospective chez 242 receveurs de greffe rénale et il a pu montrer que le CMV était un facteur de risque de survenue ultérieure d'épisodes de rejets même quand on tenait compte des rejets antérieurs et d'autres facteurs "confondants" potentiels. L'infection à CMV asymptomatique aurait des conséquences minimales sur le greffon, par contre, les patients qui développent une maladie sévère à CMV ont un risque important de perte du greffon et ceci malgré une thérapie par le ganciclovir (DUNN, 1991). Selon Mc CARTHY, 1993, la survie du greffon à 1 an est de 72% chez les patients ayant développé une maladie à CMV contre 86% dans le groupe contrôle.

Toutefois, l'implication du CMV dans le rejet de greffe est controversée par certains (SHERLOCK, 1991).

RICHARDON, 1981 ont également décrit aussi au cours de l'infection à CMV des lésions spécifiques du greffon caractérisées par une atteinte glomérulaire, pouvant aboutir à une maladie chronique du greffon. Ces différentes manifestations peuvent représenter une forme de rejet chronique dans lequel le CMV pourrait jouer un rôle par l'intermédiaire de mécanismes immunopathologiques. Au cours de l'infection à CMV les médiateurs tels que l'IFN alpha et gamma libérés par les lymphocytes T cytotoxiques augmentent l'expression sur les cellules du greffon des Ag de classe 2 du CMH (RUBIN, 1990). Cet accroissement serait responsable de la réaction de rejet (VAN WILLEBRAND, 1986).

### **4. LES SURINFECTIONS OPPORTUNISTES**

Les surinfections opportunistes accompagnent fréquemment l'atteinte à CMV et résultent en partie de son rôle transitoirement immunosuppresseur qui accentue

l'immunodépression liée au traitement. Ces surinfections sont observées principalement avec des bacilles gram négatif, *Listeria monocytogenes*, des champignons (*Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus neoformans*) et *Pneumocystis carinii*.

Les macrophages alvéolaires sont particulièrement sensibles à l'infection par le CMV ce qui pourrait expliquer l'association entre le CMV et les surinfections opportunistes du poumon à *Pneumocystis carinii*.

Le risque de surinfection est corrélé au degré de la leucopénie et aux proportions des différentes fractions de cellules T circulantes : baisse des cellules CD4+ et augmentation des CD8+ (RUBIN, 1990).

Les patients présentant le plus haut risque d'infections opportunistes sont ceux qui sont infectés par le CMV et pour qui une thérapie contre le rejet aigu ou chronique a été instaurée.

## **5. THERAPEUTIQUE ANTIVIRALE CURATIVE EN TRANSPLANTATION RENALE**

Pour revue, BALFOUR, 1990.

En France, le traitement des infections à CMV après transplantation rénale est actuellement dominé par l'utilisation de deux antiviraux actifs in vitro sur ce virus, le Foscarnet\* et surtout le Cymevan\*.

### **5. 1. Le Cymevan \***

#### **5. 1. 1. Mécanisme d'action**

Le dihydroxypropoxyméthyl guanine (DHPG ou ganciclovir ou Cymevan\*) analogue acyclique de la deoxyguanosine a modifié la thérapeutique antivirale. Pour être actif, le ganciclovir doit être phosphorylé en nucléoside triphosphate qui est un puissant inhibiteur de la DNA polymérase virale. La phosphorylation du ganciclovir est dépendante du gène UL 97 du CMV qui code pour une protéine présentant des homologues de séquences avec la famille des protéines kinases . Cette protéine capable de phosphoryler le ganciclovir est responsable de la sélectivité du ganciclovir pour le CMV (LITTLER, 1992).

#### **5. 1. 2. Utilisation du Cymevan\***

Le ganciclovir est très efficace dans le traitement des infections à CMV à condition d'être administré précocement avant l'apparition des formes graves de la maladie.

Le traitement dure en règle générale 14 jours. La tolérance du produit est bonne en dehors d'une leucopénie dose-dépendante qui peut survenir dans 30% des cas. Les prélèvements virologiques se négativent dans 90% des cas sous traitement, mais peuvent redevenir positifs le plus souvent de façon asymptomatique dans les semaines ou les mois qui suivent (RONDEAU, 1991). Moins de 5% des malades nécessitent un deuxième traitement par le ganciclovir.

L'étude de HARBISON, 1988 montre une stabilisation ou une régression de la maladie à CMV chez 67% des sujets transplantés atteints d'une maladie sévère à CMV ayant reçu une thérapie par le ganciclovir.

En présence d'un rejet de greffe, lorsqu'il y a une infection biologique à CMV, le ganciclovir est même utilisé par certains systématiquement en association avec la thérapie antirejet. Dans son étude, DE KONING, 1992, a trouvé en effet une diminution significative des symptômes liés au CMV chez tous les patients ayant reçu le ganciclovir de façon concomitante à la thérapie antirejet, par rapport aux sujets n'ayant eu que la thérapeutique anti-rejet.

Le traitement par le ganciclovir d'une maladie à CMV en même temps que le traitement d'un rejet (Par shoots corticoïdes, ATG ou OKT3 en cas de rejets corticorésistants) est également possible, et s'avère efficace si les deux thérapies sont mises en place précocement (BURNS, 1990; VAN DEN BERG, 1991b).

### 5. 1. 3. Résistance au Cymevan\*

A ce jour, l'apparition de souches de CMV résistantes à l'action du ganciclovir ne semble pas représenter une éventualité fréquente, mais l'utilisation de plus en plus large du produit pourra modifier cet aspect.

La résistance induite par le traitement semble plus rare dans les infections à CMV après transplantation, peut-être en raison de la brièveté du traitement, qu'au cours du SIDA. Dans son étude menée chez des patients sidéens atteints de rétinite à CMV, DREW, 1991 trouve un taux de résistance des souches au ganciclovir de 7, 6% lorsque la durée du traitement a été supérieure à 3 mois.

Les mécanismes de la résistance connus à ce jour, sont de deux types :

- Une inhibition de la phosphorylation

Une délétion de 4 acides aminés du gène UL 97 qui code pour une protéine kinase de 80 Kd assurant la phosphorylation initiale du ganciclovir, perturbe la phosphorylation et est impliquée dans la résistance de certaines souches (SULLIVAN, 1993).

- Une modification de l'ADN polymérase

La présence d'une alanine au lieu d'une glycine, en position 987 dans le gène pol induit une résistance, indépendante de toute phosphorylation, au ganciclovir (PEROL, 1993).

## **5. 2. Le Foscarnet \***

Le phosphonoformate trisodique (PFA ou Foscanet\*), analogue du pyrophosphate a été utilisé dans un nombre limité d'études. Son mécanisme d'action est complètement différent de celui de l'aciclovir et du ganciclovir : il inhibe l'ADN polymérase virale de façon réversible et non compétitive.

Il n'a pas d'effets myélotoxiques significatifs, mais par contre, une nécrose tubulaire aiguë avec dégradation de la fonction rénale peut survenir dans 25% des cas, ce qui limite considérablement son emploi, surtout chez les greffés rénaux.

Il peut toutefois représenter une alternative intéressante en cas de résistance au ganciclovir ou chez les malades ayant une aplasie médullaire.

## **5. 3. Les gammaglobulines**

Dans le traitement curatif, les immunoglobulines anti-CMV sont moyennement efficaces seules, mais peuvent être administrées en complément du ganciclovir. Cette association doit être envisagée devant une forme grave de la maladie à CMV, c'est à dire une forme traitée avec retard (RONDEAU, 1991) . Elle semble peu nécessaire en transplantation rénale, mais a par contre été proposée avec succès chez les receveurs de greffe de moelle, atteints de pneumopathie à CMV (SCHMIDT, 1988).

## **5. 4. L'aciclovir**

Pour être actif, l'aciclovir doit être phosphorylé par une thymidine kinase virale qui apparaît dans les cellules infectées par les herpès virus et les virus varicelle-zona, mais pas dans les cellules infectées par le CMV. Le CMV n'induit pas la production de la thymidine kinase mais la DNA polymérase du CMV est cependant inhibée par l'aciclovir. Il est possible que les très faibles taux d'aciclovir triphosphate générés soient suffisants pour stopper la replication du CMV in vitro.

Les essais cliniques ayant fait appel a ce produit pour le traitement curatif de la maladie à CMV ont donné des résultats décevants. Il n'est donc plus utilisé aujourd'hui.



## **6. PREVENTION DE L'INFECTION A CMV EN TRANSPLANTATION RENALE**

L'ensemble des moyens utilisables dans la prévention des infections à CMV est résumé dans le schéma 4 (D'après LEGENDRE , 1993).

Il est encore aujourd'hui difficile de définir une véritable stratégie de prévention de l'infection à CMV en transplantation rénale et d'en établir le rapport coût / efficacité.

La prévention systématique consiste à appliquer des mesures préventives à tous les patients transplantés susceptibles de développer une infection à CMV.

La prévention ciblée consiste à sélectionner parmi les patients transplantés, une population cible de patients particulièrement à risque de développer une infection ou une maladie à CMV.

### **6. 1. La prévention systématique**

#### **6. 1. 1. La prévention de la transmission du CMV par le rein greffé et les produits sanguins chez les receveurs CMV séronégatifs.**

Cette mesure qui consisterait à n'attribuer à des receveurs CMV négatifs que des reins de donneurs CMV négatifs rendrait encore plus difficile l'appariement donneur / receveur qui est essentiellement basé sur le respect des compatibilités HLA et ABO.

Par contre, dans les techniques transfusionnelles, une véritable stratégie de prévention a été définie concernant les receveurs d'organes CMV négatifs. Elle consiste à sélectionner des produits sanguins provenant de donneurs CMV négatifs. Toutefois, cette sélection se heurte à certaines difficultés comme la possibilité d'échec de la détection par sérologie de donneurs séropositifs (sujets en phase pré-sérologique en cours de primo-infection ou faux négatifs dus à la technique de dépistage employée) mais surtout la difficulté d'assurer en permanence une disponibilité en produits CMV négatifs.

Il existe d'autre part différentes techniques d'élimination des leucocytes des produits sanguins transmetteurs telles que la congélation-décongélation des concentrés érythrocytaires (le taux de leucocytes résiduels est de  $1.10^6$  à  $20.10^6$  par unité) ou la filtration. Cette dernière permet de descendre au-dessous du seuil de  $1.10^6$  leucocytes par unité, seuil qui assure la sécurité des produits.

L'utilisation de produits sanguins déleucocytés permet ainsi de faire face aux défauts de disponibilité en produits CMV négatifs.

### 6. 1. 2. Le choix du traitement immunosuppresseur

Les globulines anti-lymphocytaires mono ou polyclonales utilisées comme traitement prophylactique ou curatif d'un rejet augmentent l'incidence de l'infection à CMV par rapport à une immunosuppression conventionnelle.

### 6. 1. 3. La vaccination anti-CMV

Plusieurs équipes ont tenté de vacciner les receveurs séronégatifs de reins séropositifs. Les souches vaccinales utilisées sont des souches vivantes et atténuées (Souches Towne et AD 169). La vaccination anti-CMV ne diminue ni la fréquence de l'infection, ni celle de la maladie à CMV après transplantation rénale. Toutefois, la sévérité des maladies à CMV est significativement réduite chez les patients vaccinés (PLOTKIN, 1991). Le problème qui se pose est celui de l'utilisation d'un vaccin vivant chez des patients immunodéprimés qui expose toujours au risque d'infection par la souche vaccinale, même si aucun cas d'infection n'a été rapporté à ce jour. Les recherches s'orientent donc soit vers un vaccin tué, soit vers un vaccin biosynthétique (SPAETE, 1991).

### 6. 1. 4. Les gammaglobulines standards ou spécifiques anti-CMV

Bien que le mécanisme d'action des gammaglobulines reste encore inconnu, l'immunisation passive par les gammaglobulines spécifiques anti-CMV serait efficace dans la prévention des infections à CMV en transplantation rénale.

L'incidence de l'infection à CMV chez les receveurs CMV négatifs du rein d'un donneur CMV positif n'est pas diminuée par les immunoglobulines anti-CMV mais l'incidence de la maladie à CMV et en particulier celle des formes graves l'est de façon significative (SNYDMAN, 1993).

L'emploi des globulines anti-CMV permet une diminution de 65% des signes cliniques attribués au CMV, une diminution du nombre d'infections opportunistes, de pertes du greffon et de décès. Toutefois, l'effet préventif des globulines anti CMV est modeste chez les patients recevant une forte immunosuppression comportant notamment des globulines antithymocytaires ou de l'OKT3 (SNYDMAN, 1990).

Le rôle joué par les gamma-globulines est différemment évalué par d'autres. Dans son étude, PAKKALA, 1992b montre que la prévention par les gamma-globulines anti-CMV ne diminue pas l'incidence de la maladie à CMV chez des receveurs séronégatifs et que les immunoglobulines spécifiques ne sont pas plus efficaces que les immunoglobulines standards (PAKKALA, 1992a).

### 6. 1. 5. La chimioprophylaxie

#### **L'acyclovir**

BALFOUR, 1989, l'a utilisé par voie orale à fortes doses (3, 2 g/j) pendant les 12 premières semaines de transplantation. Il a montré que l'acyclovir permettait de diminuer à la fois l'incidence de l'infection et de la maladie à CMV quel que soit le statut du couple donneur / receveur.

Il semble que l'association de globulines anti-CMV hyperimmunes à de faibles doses d'acyclovir soit plus efficace dans la prévention de la primo-infection à CMV que l'utilisation isolée d'un de ces composés (NICOL, 1993).

Toutefois, l'effet bénéfique de hautes doses d'acyclovir en prophylaxie est controversé par certains auteurs, notamment chez les sujets séronégatifs recevant le rein d'un donneur séropositif (BAILEY, 1993).

#### **Le ganciclovir**

Actuellement, l'acyclovir en prophylaxie tend à être remplacé par le ganciclovir (Cymevan\*). RONDEAU, 1992, ont montré que le ganciclovir utilisé à titre prophylactique pendant 14 jours par voie intraveineuse (10 mg/kg/j) diminue sensiblement l'incidence de l'infection et celle de la maladie à CMV mais surtout retarde significativement leurs survenues et diminue la sévérité de celle-ci. Il est probable qu'un effet plus important aurait été observé si un traitement prolongé par le ganciclovir avait été choisi.

L'étude de BOIVIN, 1993, révèle que la prophylaxie par le ganciclovir chez les patients ayant reçu une transplantation d'organe ne semble pas sélectionner de souches de CMV résistantes au ganciclovir ce qui permet son utilisation dans le traitement de l'infection quelle que soit la nature de la prophylaxie. Toutefois, au cours de cette étude, la durée de la prophylaxie par le ganciclovir n'a été que de sept jours, le relais étant pris ensuite par les globulines anti-CMV.

### **6. 2. La prévention ciblée**

Il importe de définir d'une part les patients présentant un haut risque de développer une infection ou une maladie à CMV et d'autre part les situations à risque tels que les renforcements de l'immunodépression à l'occasion du traitement d'un rejet ou le risque d'une rechute après traitement curatif d'une infection à cytomégalovirus.

### 6. 2. 1. Les malades à risques

Il s'agit notamment des sujets qui excrètent du virus de façon asymptomatique. Il est indispensable pour cela de déterminer quels sont les marqueurs virologiques prédictifs d'une infection ou d'une maladie à CMV pour mieux préciser la sous-catégorie de patients qui bénéficieront réellement d'une prévention.

Cette approche qualifiée par les auteurs anglo-saxons de "preemptive therapy" a été initialement décrite par SCHMIDT, 1991 sur une population de greffés médullaires. Elle consisterait à traiter précocement certains patients présentant une infection biologique prouvée, identifiée à l'aide d'un test de positivité précoce présentant une grande valeur prédictive positive de maladie à CMV. Dans cette nouvelle attitude, il est donc nécessaire de disposer d'un marqueur fiable. Celui-ci n'est actuellement pas encore déterminé, mais les nouvelles méthodes de détection du génome et des antigènes viraux dans le sang devraient permettre de quantifier la "charge virale" et d'identifier plus aisément les malades à risque.

### 6. 2. 2. Les situations à risques

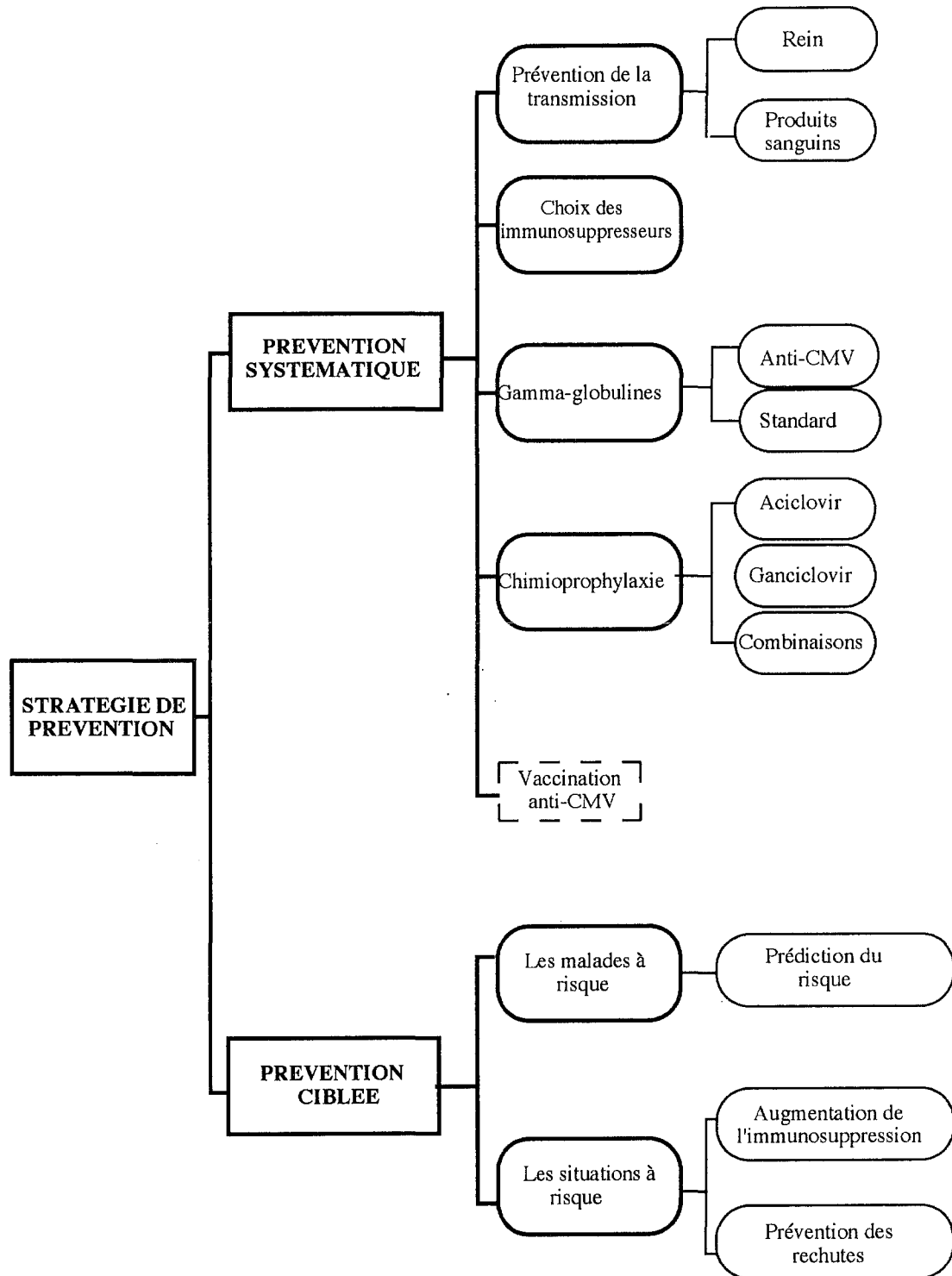
La prévention ciblée peut ensuite être appliquée à des patients qui sont dans une ou des situations à risques telles que les augmentations de l'immunosuppression pour traitement de rejet ou la période qui suit l'interruption d'un traitement antiviral pour une infection symptomatique à CMV.

Ainsi, l'utilisation systématique du ganciclovir chez les patients recevant de l'OKT3 a permis de diminuer de façon significative l'incidence des infections symptomatiques à CMV (HIBBERT, 1992). Il est actuellement nécessaire d'étudier si un traitement préventif par le ganciclovir s'avère utile chaque fois qu'il y a un renforcement de l'immunosuppression.

## **7. RETENTISSEMENT ECONOMIQUE DE LA MALADIE A CMV**

La maladie à CMV a un impact économique significatif sur la transplantation rénale qui résulte d'une prolongation de la durée d'hospitalisation.

Elle prolonge l'hospitalisation des sujets ayant bénéficié d'une transplantation rénale de 37 jours en moyenne et multiplie par 2, 5 le coût de l'intervention (Mc CARTHY, 1993).



**Schéma 4:** Stratégie et moyens de prévention en transplantation rénale (LEGENBRE, 1993)

PARTIE EXPERIMENTALE

## **INTRODUCTION**

Chez le sujet immunodéprimé, le diagnostic biologique de l'infection à CMV doit faire appel à des techniques sensibles qui se positivent précocement afin de détecter l'infection le plus tôt possible. Ces dernières doivent par ailleurs avoir une bonne valeur prédictive positive ou être facilement quantifiables pour permettre de cerner parmi les patients présentant une infection à CMV, ceux qui présentent un haut risque de développer une maladie à CMV.

L'Antigénémie et la PCR CMV sont deux nouvelles techniques qui font leur apparition en semi-routine dans les laboratoires de virologie.

Les performances de ces tests pour la détection d'une virémie à CMV chez les sujets transplantés ont été évaluées par de nombreux auteurs (VAN DEN BERG, 1989; THE, 1990; JIWA, 1989; OLIVE, 1989).

Néanmoins, la place de l'Antigénémie et de la PCR CMV dans la stratégie diagnostique et thérapeutique d'une infection à CMV en transplantation rénale n'est toujours pas déterminée précisément.

Le but de notre travail, a été au cours d'une étude prospective réalisée chez 25 transplantés rénaux, d'évaluer d'une part les performances de ces deux tests (Valeur prédictive positive, valeur prédictive négative, délai de positivité ) en les comparant aux techniques de diagnostic classiquement employées (Culture courte et sérologie) et d'apprécier d'autre part le service rendu au clinicien lors du rendu d'un résultat positif par l'une ou l'autre de ces techniques.

# **CHAPITRE 1**

## **PATIENTS ET PROTOCOLE**

### **1. DESCRIPTION DE LA POPULATION :**

Entre le 12 mars 1993 et le 7 juillet 1993, 25 patients ont bénéficié d'une transplantation rénale au CHU de Grenoble. Trois de ces patients ont été exclus de l'étude : deux pour n'avoir pu être suivis en post-greffe comme le prévoyait le protocole, et un pour des problèmes techniques. L'étude a donc porté sur 22 patients.

Ces patients peuvent être répartis en trois groupes selon le statut sérologique du donneur et du receveur :

-groupe A (16 patients) : Receveur CMV positif et donneur CMV positif ou négatif.

-groupe B (2 patient) : Receveur CMV négatif et donneur CMV négatif.

-groupe C (4 patients) : Receveur CMV négatif et donneur CMV positif.

### **2. SUIVI DES SUJETS :**

Chaque patient est suivi pendant 3 mois dans les semaines (S) suivant la greffe selon le schéma suivant (Le prélèvement So étant réalisé le jour de la greffe et les autres selon le jour de consultation du patient au CHU).

Semaine après greffe	So	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S10	S12
Population											
Greffés CMV séronégatifs	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Greffés CMV séropositifs	•	•	•	•	•				•		•



A chaque prélèvement, seront effectuées une recherche du CMV par PCR, Antigénémie, Culture et une détermination de la sérologie.

Dans certains cas, à la demande du clinicien, des prélèvements supplémentaires ont été effectués en cas de suspicion d'infection.

Par contre, l'indisponibilité de certains malades, nous a conduit parfois à annuler des prélèvements par rapport au protocole initialement décrit.

Lors de chaque prélèvement, il est prélevé :

- 2 tubes héparinés de 7 ml, pour effectuer la culture, l'antigénémie et la PCR.
- 1 tube sec de 7 ml pour les dosages sérologiques.

### **3. TRAITEMENT IMMUNOSUPPRESSEUR PROPHYLACTIQUE**

#### **3. 1. Immunosuppression classique**

L'immunosuppression débutée dès les premiers instants de la greffe, associe classiquement :

- Methylprednisolone (SOLUMEDROL) I.V en perfusion d' une heure.

J0 : 10 mg / kg sans dépasser 500 mg

J1 : 6 mg / kg

J2 : 4 mg / kg

J3 : 2 mg / kg

J4 : 1 mg / kg

puis relais par Prednisolone (CORTANCYL)

J5 : 0, 5 mg / kg

J6 : 0, 4 mg / kg

J7 : 0, 3 mg / kg

A partir de J8 : 0, 15 à 0, 20 mg / kg

- Azathioprine I.V (IMURAN) en perfusion d'une heure, puis ensuite per os (IMUREL).

3 mg / kg / jour adapté aux dosages sériques et à la tolérance hématologique.

- Thymoglobulines de Lapins ( ATG Mérieux)

3 mg / kg / jour au pousse-seringue / 24 H sur voie veineuse profonde (V.V.P.)

Début : au bloc dès la V.V.P. en place

Arrêt : à J9

La posologie des ATG est adaptée ensuite aux taux de lymphocytes. Elle demeure à 3 mg / kg / jour si les lymphocytes sont entre 100 et 300 / litre et est diminuée lorsqu'ils sont inférieurs à 100.

Plus rarement maintenant, ALG (Sérum antilymphocytaire de cheval) : 1 ampoule / 15 kg I.V / j pendant 10 jours.

- Ciclosporine (SANDIMUM) per os :

J7 : 2 mg / kg / j en 2 prises

J8 : 4 mg / kg J

puis : 6 mg / kg / j à ajuster selon la cinétique.

### **3. 2. Protocole RS 61.443**

6 patients ont fait partie du protocole RS 61.443 Code : Myc 23.

Le RS 61. 443 : Micophenolate (MPA) est un médicament anti-prolifératif. Comme l'azathioprine, il inhibe la synthèse de novo des purines, étape essentielle à la prolifération des lymphocytes, mais contrairement à elle n'est pas incorporé au niveau de l'ADN ou de l'ARN.

Pour les patients entrant dans ce protocole, l'immunosuppression après transplantation associe :

- Methylprednisolone : 10 mg / kg sans dépasser 500 mg I.V à J1 puis, Prednisolone per os ( 30 mg / j de J2 à J14 ; 20 mg / j de J15 à J30 ; 10 mg / j à partir de J31).

- Ciclosporine

3 mg / kg / j I. V. à ajuster selon le taux circulant.

Dès la reprise du transit, 8 mg / kg / j per os à ajuster selon le taux circulant.

- RS 61. 443 : dès la reprise du transit :

6 gélules bleues matin et soir

+

2 gélules rouges le soir si le patient pèse moins de 75 kg

3 gélules rouges le soir si le patient pèse plus de 75 kg

Les gélules contiennent en fait, soit le RS 61. 443, soit l'Azathioprine.

#### **4. TRAITEMENT DES REJETS**

Le traitement des rejets aigus fait appel à des bolus de Méthylprednisolone, selon le protocole suivant :

de J1 à J3 : 15 mg / kg / j sans dépasser 1 gramme

à J4 : 6 mg / kg

à J5 : 4 mg / kg

à J6 : 2 mg / kg

puis reprise de la Prednisolone.

En cas de résistance du rejet aux stéroïdes, le patient peut bénéficier d'un traitement par ALG ou par OKT3.

#### **5. PROPHYLAXIE ANTI -CMV**

Elle concerne les patients CMV négatifs avant la greffe qui reçoivent le rein d'un donneur CMV positif c'est à dire le groupe C.

##### **5. 1. Les gammaglobulines**

Les deux premiers patients appartenant à ce groupe ont reçu une prévention par gammaglobulines. Il s'agit de gamma-globulines humaines, enrichies en immunoglobulines anti-CMV. Chaque flacon de 50 ml contient 2, 5 g d'immunoglobulines, soit 5000 U.

Le protocole employé à Grenoble est le suivant :

- 300 U / kg, soit 150 mg / kg 12 heures après la greffe, puis

- 200 U / kg, soit 100 mg / kg tous les 10 jours pendant 30 jours, puis

- 100 U / kg soit 50 mg / kg tous les mois pendant 3 mois

Le traitement se fait par perfusion I. V lente, à raison d'un flacon par heure.

##### **5. 2. Le Ganciclovir**

Les deux autres patients ont bénéficié d'une prophylaxie par le ganciclovir.

- De J 1 à J 14 : 1, 25 mg / kg / j en 1 perfusion I. V pendant une heure

- De J 15 à J 28 : Perfusion sur 1 heure d'une demi-dose, 5 jours sur 7 (sauf samedi et dimanche).

La posologie est cependant toujours à adapter à la fonction rénale.

## **CHAPITRE 2**

---

### **MATERIELS ET METHODES**

#### **1. CULTURE RAPIDE**

Il s'agit d'une technique de détection des antigènes très précoces du CMV après 48 heures de culture cellulaire.

Le tube de sang hépariné de 7 ml est placé au moins 1 heure verticalement afin d'obtenir une décantation ou centrifugé à 1000 t/mn pendant 5 mn.

La couche leucocytaire est ensuite recueillie à l'interphase hématies-plasma, puis inoculée dans une culture de cellules MRC 5. Après un temps de contact de 3 heures, le surnageant est éliminé, les cellules sont rincées en milieu BME, mises en présence de 3 ml d'un mélange BME+SVF (serum de veau foetal) à 10%, puis placées 48 heures à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (10%).

Le surnageant est alors à nouveau éliminé et la couche leucocytaire rincée par du PBS puis fixée par du méthanol.

La révélation se fait par une technique d'immunofluorescence anticomplémentaire (ACIF) qui comprend 3 étapes : incubation de la couche leucocytaire pendant 3 heures avec un anticorps polyclonal humain ayant un haut titre en IgM CMV, mise en contact 30 mn avec du complément humain, puis incubation 30 mn à 37°C avec un conjugué marqué à la fluorescéine.

La recherche de cellules infectées par le CMV, se fait par lecture de la totalité du puits sous un microscope à fluorescence inversée.

#### **2. RECUEIL DES POLYNUCLEAIRES**

Le recueil des polynucléaires nécessaire à la fois pour l'antigénémie et la PCR, se fera par sédimentation en présence de Dextran. Pour réaliser cette technique, 5 ml de sang hépariné sont mélangés à 1 ml de Dextran à 6% dans un tube de 10 ml à fond conique. Après sédimentation 20 mn à 37°, la suspension cellulaire est décantée, lavée dans du tampon PBS stérile, puis centrifugée à 1000 t/mn, 10 mn à 20°C. Le surnageant étant éliminé, on procède à une étape de lyse en cas de contamination par les hématies, en reprenant le culot par 3 ml de NH<sub>4</sub>CL 0,8% pendant 5 mn à 4°C, puis à 2 étapes de

lavage successives dans du tampon PBS stérile, suivies chacune d'une centrifugation à 1000 t/mn, 10 mn à 20°C.

Le culot cellulaire obtenu est alors repris par 2 ml de PBS stérile :

- 0,5 ml pour l'antigénémie.

- 1,5 ml pour la PCR que l'on répartit en 3 tubes de 0,5 ml qui seront centrifugés et congelés à -80°C après élimination du PBS.

Une numération cellulaire est effectuée sur la suspension cellulaire obtenue.

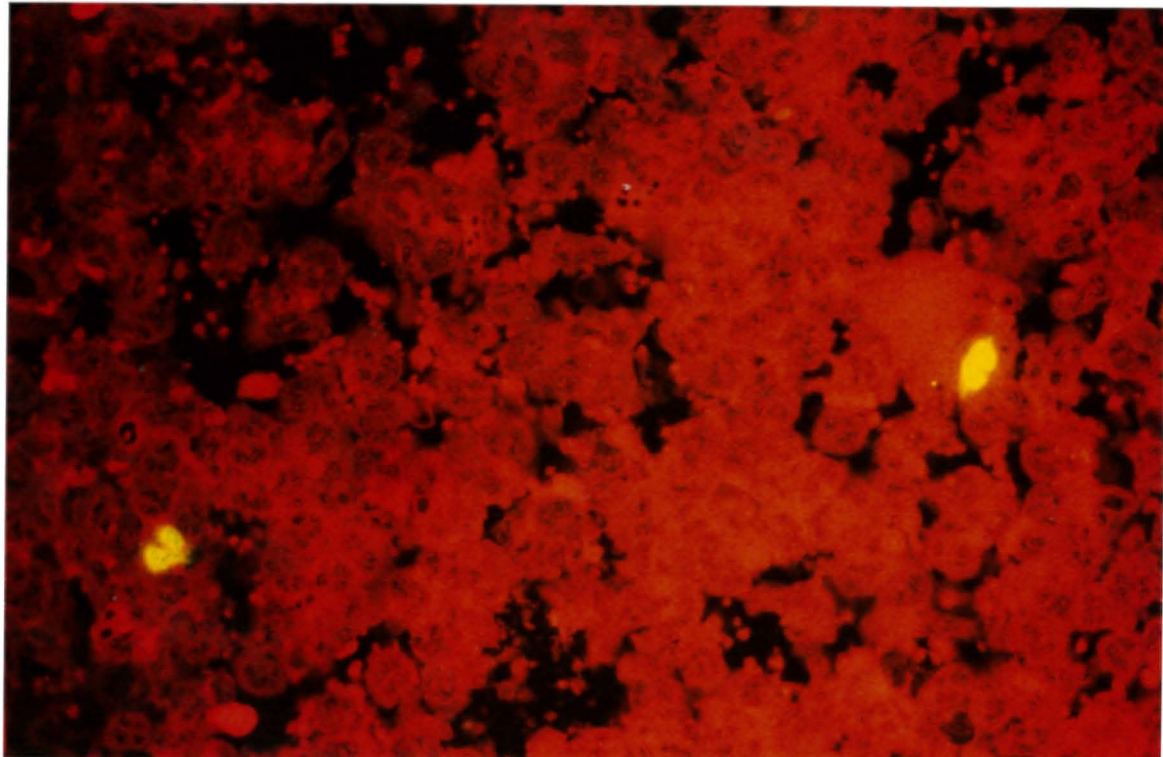
### **3. ANTIGENEMIE LEUCOCYTAIRE**

La quantité de la suspension cellulaire à déposer est calculée de façon à obtenir 200000 cellules par lame. Deux lames sont préparées par prélèvement et sont soumises à une cyto-centrifugation 5 mn à 500 t/mn (Cytospin Shandon). Les lames sont ensuite séchées 5 mn sous hotte puis fixées avec un mélange méthanol (1/3)-acétone (2/3) pendant 10 mn à température ambiante. A ce stade, les lames peuvent être congelées à -80°C.

On dépose sur chaque spot 25  $\mu$ l d'anticorps monoclonal anti-CMV dilué au 1/2 (Anticorps monoclonal anti CMV : Clonab CMV C10-C11 Biotest). Après incubation 30 mn à 37°C en atmosphère humide et 2 lavages successifs en tampon PBS stérile, on dépose 25  $\mu$ l de conjugué antisérum de souris (conjugué Tago) dilué au 1/50 en PBS (+ bleu de Evans à la dilution finale de 1/10000).

Après une nouvelle incubation 30 mn à 37°C, 2 étapes de lavages en PBS et 1 rinçage à l'eau distillée, les lames sont montées sous glycérine et examinées au microscope à fluorescence.

Une antigénémie positive se manifeste par une image fluorescente dans les noyaux polylobés des polynucléaires infectés.



## **4. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) :**

Le principe général consiste à amplifier par PCR toute copie du gène IE1 éventuellement présente dans le prélèvement. La révélation se fera ensuite par Southern-blott puis par hybridation.

### **4. 1. Traitement des échantillons**

Le culot cellulaire sec est repris par 100  $\mu$ l de PBS stérile pour 1 million de cellules. La suspension cellulaire obtenue est ensuite chauffée 12 mn à 96° puis centrifugée 15 mn à 11000 t/mn. Les réactions suivantes se font donc sur l'ADN libéré par l'étape de lyse cellulaire obtenue par chauffage. La technique choisie ne fait pas appel au principe d'extraction de l'ADN, plus classiquement utilisé en biologie moléculaire.

### **4. 2. Réaction d'amplification génique**

#### **4. 2. 1. Caractéristiques des amorces choisies .**

Les amorces (MG1 et MG2) ont été choisies dans l'exon 4 du gène IE1 du CMVH souche AD 169 (AKRIGG, 1985). Le gène IE1 est bien conservé parmi les différentes souches du CMV et sans homologie avec le génome cellulaire ou celui des autres Herpès virus (STINSKI, 1990).

La localisation et la séquence des 2 amorces sont :

- Amorce sens MG1 : 2333-2352 (5'-AGAGTCTGCTCTCCTAGTGT-3')
- Amorce antisens MG2 : 2602-2621 (5'-CTATCTCAGACACTGGCTCA-3')

La taille du fragment amplifié est de 289 paires de bases.

#### **4. 2. 2. Conditions de la réaction.**

Le mélange réactionnel de volume final égal à 100  $\mu$ l pour un tube est :

- |  |               |
|--|---------------|
| • Tampon 1 Taq Polymérase 10x  | 10 $\mu$ l    |
| • dNTPs 10mM   | 2 $\mu$ l     |
| • Amorce MG1 10 $\mu$ M  | 5 $\mu$ l     |
| • Amorce MG2 10 $\mu$ M  | 5 $\mu$ l     |
| • Enzyme Taq Boehringer 5 U/ml   | 0, 25 $\mu$ l |
| • Eau distillée stérile qsp  | 85 $\mu$ l    |
| • 15 $\mu$ l d'échantillon : ceci correspond à environ 150 000 cellules, soit 1 $\mu$ g d'ADN. |               |

Pour chaque réaction, les échantillons suivants sont introduits :

- Prélèvements
- Témoins négatifs de PCR. Il s'agit d'ADN cellulaire déjà testé comme négatif en PCR (cellules non infectées par le CMV).
- Témoins Positifs

On dispose comme témoins positifs, d'échantillons contenant un nombre connu de copies du gène IE1 préparés dans un bruit de fond de 1  $\mu$ g d'ADN cellulaire. Cette gamme a été obtenue à partir de la lignée cellulaire référence A2 (donnée par *Susan Michelson*, Institut Pasteur) transformée stablement avec le plasmide pRL103, contenant le gène IE1. Ainsi chaque cellule A2 contient une copie du gène IE1 par cellule. Ces cellules sont numérotées, puis diluées de façon à obtenir des échantillons témoins contenant respectivement 5, 50 et 500 copies de cellules A2.

La réaction d'amplification génique comprend 40 cycles constitués chacun de 3 étapes : dénaturation 1mn à 94°C, hybridation des amorces 1mn à 55°C, élongation 2mn à 72°C. L'amplification est précédée d'une première dénaturation de 10mn à 94°C et suivie d'une synthèse complémentaire finale de 8mn à 72°C.

### 4. 3. Révélation

#### 4. 3. 1. Southern blott

20  $\mu$ l de produit amplifié (mélangé à 3  $\mu$ l de bleu de bromophénol), sont déposés sur gel d'agarose à 2% et soumis 2 heures à une électrophorèse (80 V) dans du tampon TBE. A la fin de l'électrophorèse, la coloration du gel par le bromure d'ethidium et l'observation sous UV, permet de visualiser l'ADN et de contrôler ainsi la qualité de l'amplification et de la migration. Les fragments d'ADN présents sur le gel sont transférés par capillarité sur membrane de nylon selon la technique du southern en milieu alcalin (NaOH 0,4M) pendant 4 heures. Après transfert, la membrane est neutralisée dans du 2SSC pendant quelques secondes et le gel contrôlé sous UV (pas de bandes restantes sur le gel si le transfert a été correct). La membrane est ensuite conservée à 4°C jusqu'à l'hybridation.

#### 4. 3. 2. Hybridation avec une sonde chaude marquée au $^{32}$ P

L'analyse des échantillons amplifiés a été faite par hybridation avec la sonde spécifique IE3 marquée au  $^{32}$ P (SHIBATA, 1988).

### *Préparation de la sonde*

La solution de réaction pour le marquage de la sonde est constituée de :

•Oligonucléotide IE3 (1 $\mu$ M)	10 $\mu$ l
•Tampon PNK 10x	2 $\mu$ l
•Polynucléotide kinase (9U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
•H <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l
•( <sup>32</sup> P)ATP (2 $\mu$ M)	1 $\mu$ l

Cette solution est incubée à 37°C pendant 30mn. L'activité de la kinase est arrêtée en chauffant 1mn à 100°C. La purification de la sonde est faite sur colonnes de gel séphadex G-25.

### *Hybridation*

Pour l'hybridation, la membrane de nylon est placée dans 15 ml de tampon de préhybridation (préchauffé à 40°C) et incubée au moins 30mn à 40°C. La sonde marquée est ajoutée au milieu et l'hybridation se fait pendant 2 heures à 40°C. 2 lavages sont ensuite réalisés à température ambiante pendant 5mn, l'un en SSC 2x et l'autre en SSC 2x-SDS 1%. La membrane est alors mise en autoradiographie dans une cassette à -80°C et révélée après 4 heures ou une nuit d'exposition.

Tout prélèvement positif donnera un spot bien visible sur le film après révélation.

**6, 7** : témoin 5 copies - **8** : témoin 50 copies - **9** : témoin 500 copies - **10** : No DNA  
**2, 3, 4** : échantillons négatifs - **5, 11, 12** : échantillons positifs



## **5. SEROLOGIE**

### **5. 1. Technique de dosage des IgG**

Utilisation d'un kit ELISA commercialisé (BIO-WHITTAKER)

### **5. 2. Technique de dosage des IgM**

Utilisation d'un kit ELISA commercialisé basé sur le principe de l'immunocapture (Wellcozyme anti-CMV IgM des laboratoires MUREX).

## CHAPITRE 3




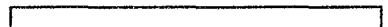






---

### RESULTATS

#### 1. RESULTATS INDIVIDUELS

Pour chaque patient, les résultats obtenus au cours du suivi sont résumés dans les tableaux et schémas suivants. Ces derniers précisent par ailleurs le type d'immunosuppression dont a bénéficié chaque malade ainsi que la clinique et l'utilisation éventuelle d'une thérapeutique antivirale préventive ou curative.

#### Légende

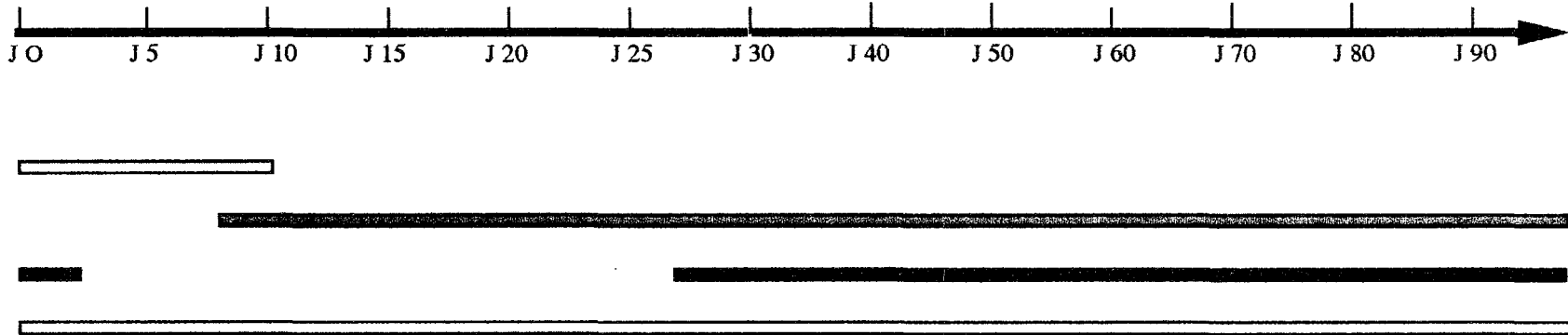
	Anti-thymoglobulines de Lapin
	Ciclosporine
	Azathioprine : Imurel*
	R.S
	Corticoides
	Ganciclovir: Cymevan*
	Antibiotiques
	Culture positive
	Antigénémie positive
	PCR positive
R	Réactivation sérologique
R, M	Réactivation sérologique associée à la présence d'IgM
S	Séroconversion

## SUJET N°1

Receveur : CMV négatif  
Donneur : CMV négatif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J0	-	-	-	IgM - IgG -
J5	-	-	-	IgM - IgG -
J11	-	+ faible	-	IgM - IgG -
J18	-	-	-	IgM - IgG -
J25	-	-	-	IgM - IgG -
J32	-	-	-	IgM - IgG -
J41	-	+ faible	-	IgM - IgG -
J70	-	-	-	IgM - IgG -

THERAPEUTIQUES



Peflacine



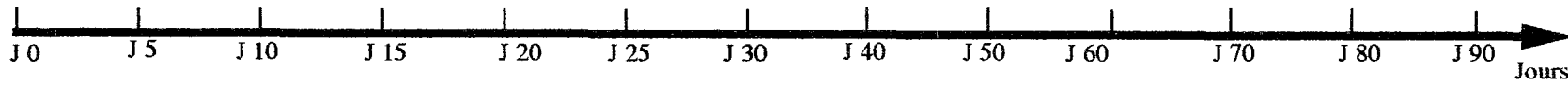
Leucopénie



J 3  
Serratia  
sur KT péritonéal

CLINIQUE

BIOLOGIE



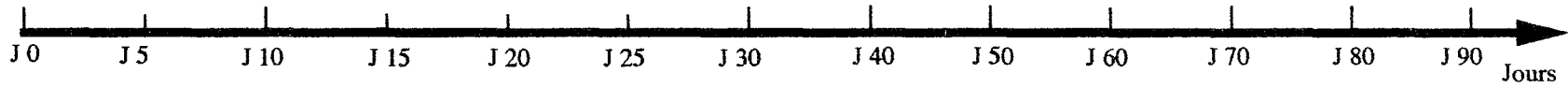
Sujet n° 1

## SUJET N°2

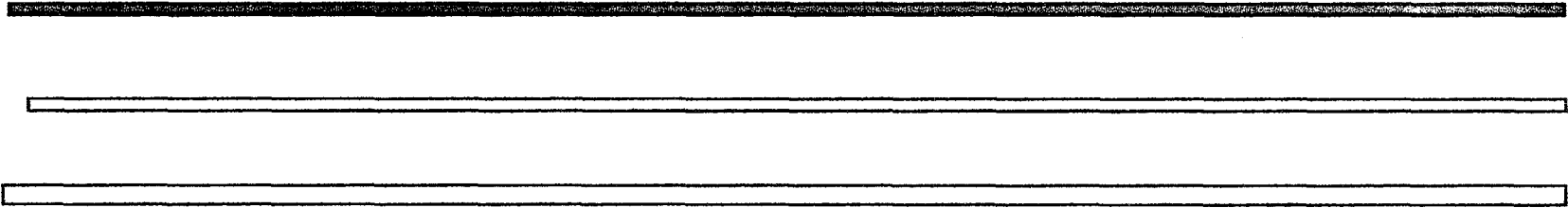
Receveur : CMV négatif

Donneur : CMV négatif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J0	Non effectuée	-	-	IgM - IgG -
J2	-	-	-	IgM - IgG -
J9	-	-	-	IgM - IgG -
J15	-	-	-	IgM - IgG -
J23	-	-	-	IgM - IgG -
J29	-	-	-	IgM - IgG -
J44	-	-	-	IgM - IgG -
J58	-	-	-	IgM - IgG -
J85	-	-	-	IgM - IgG -

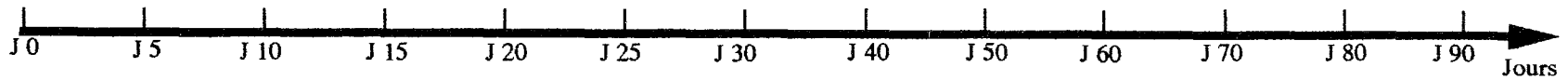


T  
H  
E  
R  
A  
P  
E  
U  
T  
I  
Q  
U  
E  
S



C  
L  
I  
N  
I  
Q  
U  
E

B  
I  
O  
L  
O  
G  
I  
E



### SUJET N°3

Receveur : CMV négatif  
Donneur : CMV positif

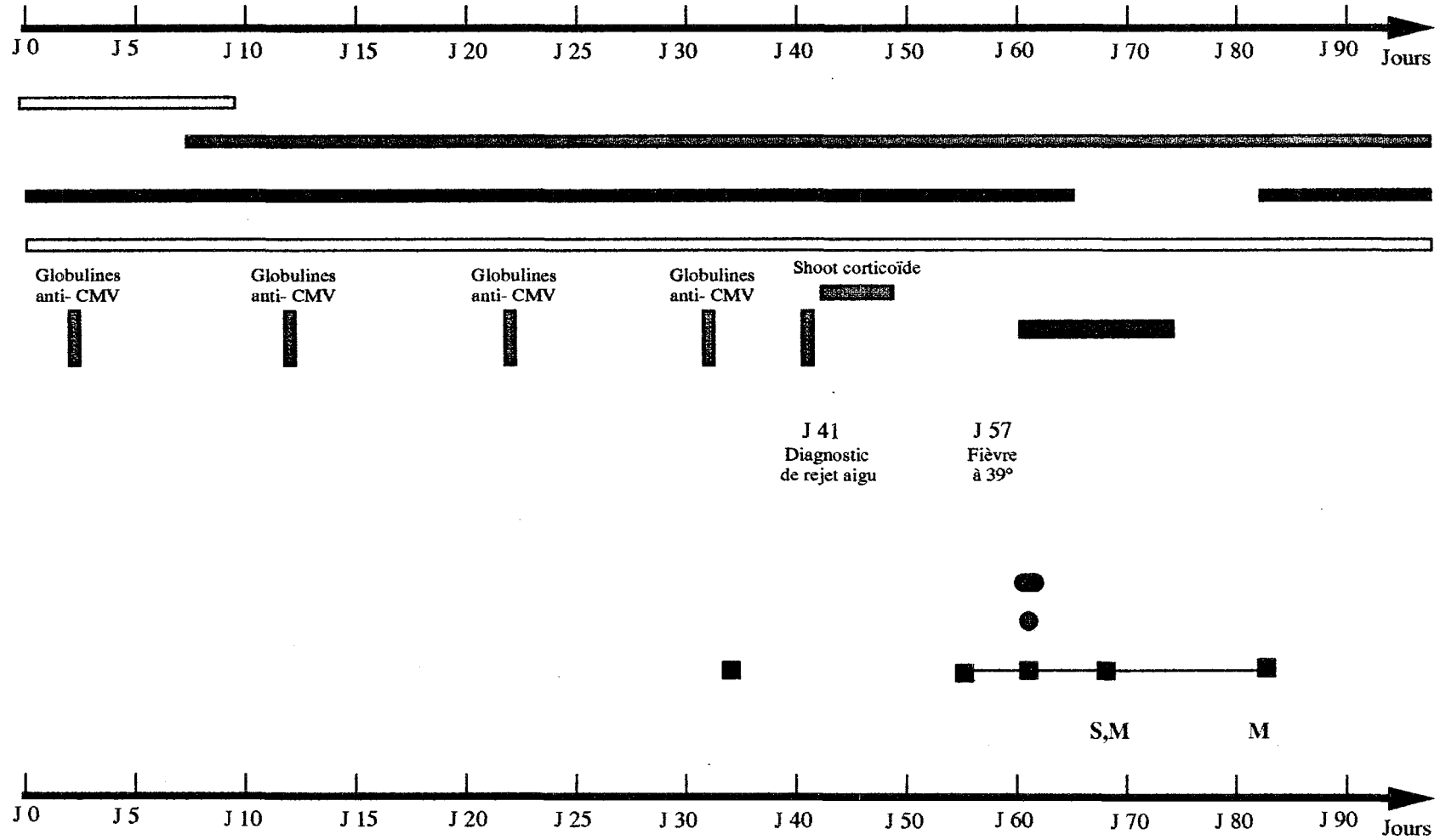
	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J 0	-	-	-	IgM - IgG -
J 5	-	-	-	IgM - IgG = 0,7
J 13	-	-	-	IgM - IgG = 0,8
J 20	-	-	-	IgM - IgG = 1
J 27	-	-	-	IgM - IgG = 1
J 34	-	+ faible	-	IgM - IgG = 0,5
J 41	-	-	-	IgM - IgG = 0,6
J 55	-	++	-	IgM - IgG = 0,4
J 61	+ (4 cellules)	+++	+	IgM - IgG = 0,3
J 68	-	+ faible	-	IgM + IgG = 1,1
J 83	-	+	-	IgM + IgG = 1,6

La positivité des IgG au départ est due à l'injection de gamma-globulines anti CMV utilisées pour le traitement préventif.

THERAPEUTIQUES

CLINIQUE

BIOLOGIE



Sujet n° 3

Résultats



## SUJET N° 4

Receveur : CMV négatif  
Donneur : CMV positif

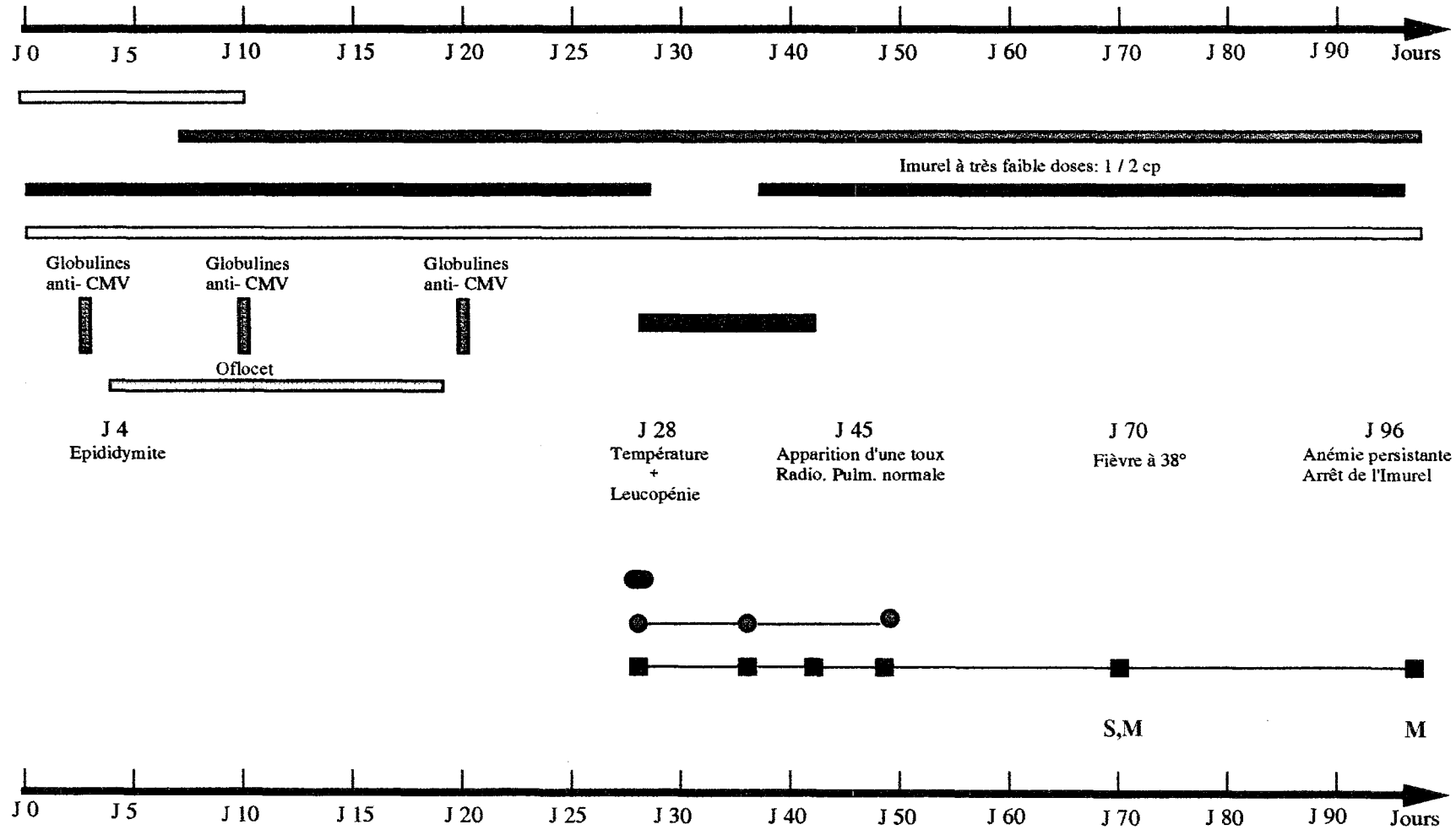
	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J 7	-	-	-	IgM - IgG = 0,6
J 15	-	-	-	IgM - IgG = 0,7
J 21	-	-	-	IgM - IgG = 0,7
J 28	+ (1 cellule)	++	+	IgM - IgG = 1
J 36	+ (6 cellules)	+++	-	IgM - IgG = 0,6
J 42	-	+ faible	-	IgM - IgG = 0,4
J 49	+ (1 cellule)	+++	-	IgM - IgG = 0,6
J 70	-	+++	-	IgM + IgG = 1,3
J 97	-	+++	-	IgM + IgG = 1,3

La positivité des IgG au départ est due à l'injection de gamma-globulines anti CMV.

THERAPEUTIQUES

CLINIQUE

BIOLOGIE



Sujet n° 4

Résultats

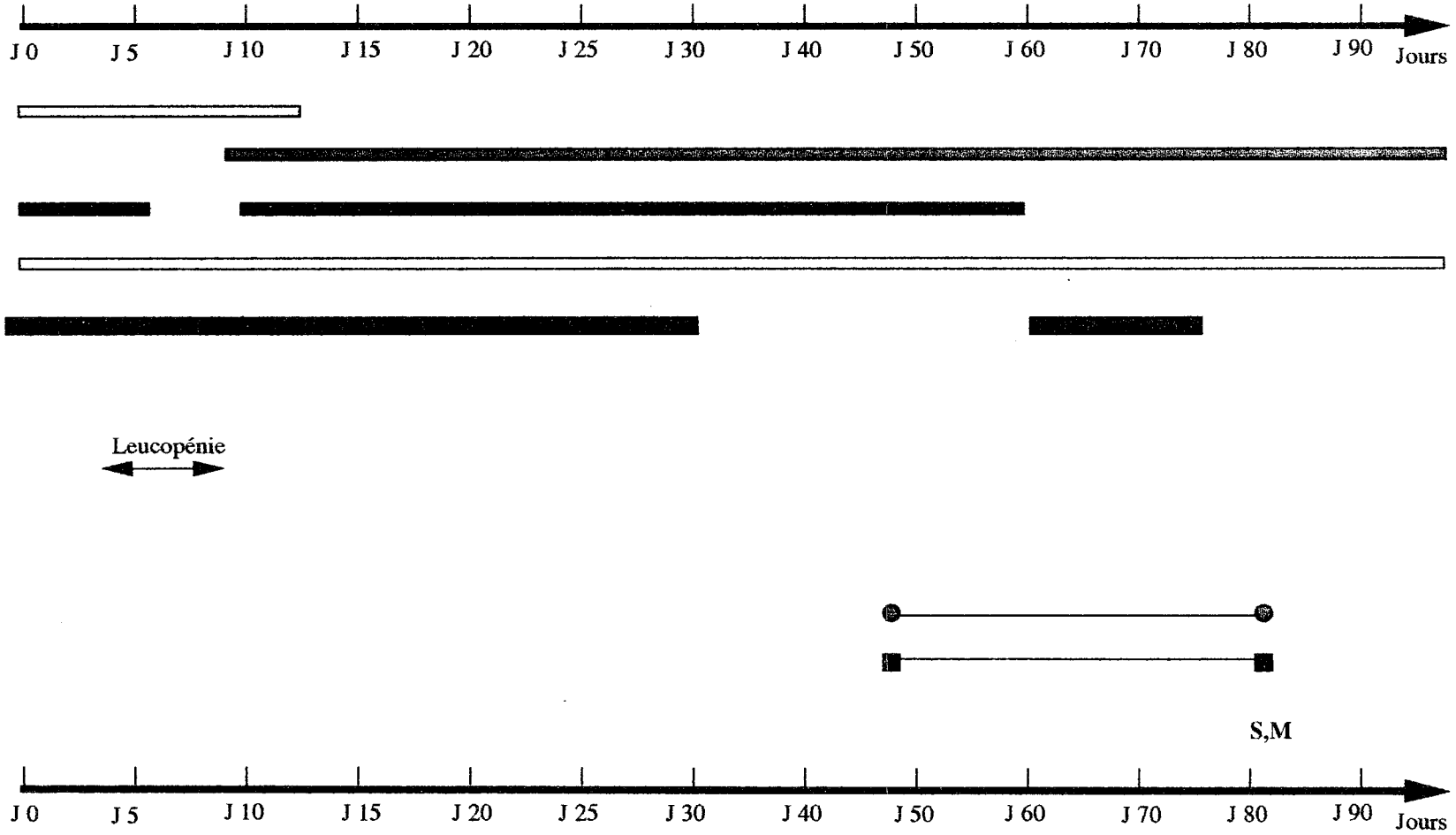
## SUJET N°5

Receveur : CMV négatif

Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J0	-	-	-	IgM - IgG -
J6	-	-	-	IgM - IgG -
J15	-	-	-	IgM - IgG -
J22	-	-	-	IgM - IgG -
J27	-	-	-	IgM - IgG -
J48	+ (3 cellules)	+++	-	IgM - IgG -
J82	+ (10 cellules)	++	-	IgM + IgG = 0,9

T  
H  
E  
R  
A  
P  
E  
U  
T  
I  
Q  
U  
E  
  
C  
L  
I  
N  
I  
Q  
U  
E  
  
B  
I  
O  
L  
O  
G  
I  
E



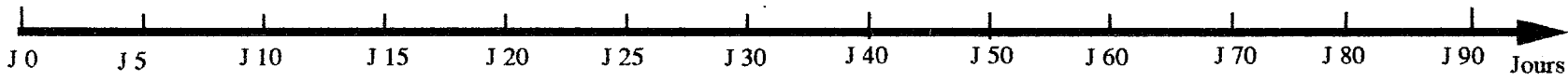
Sujet n° 5

## SUJET N°6

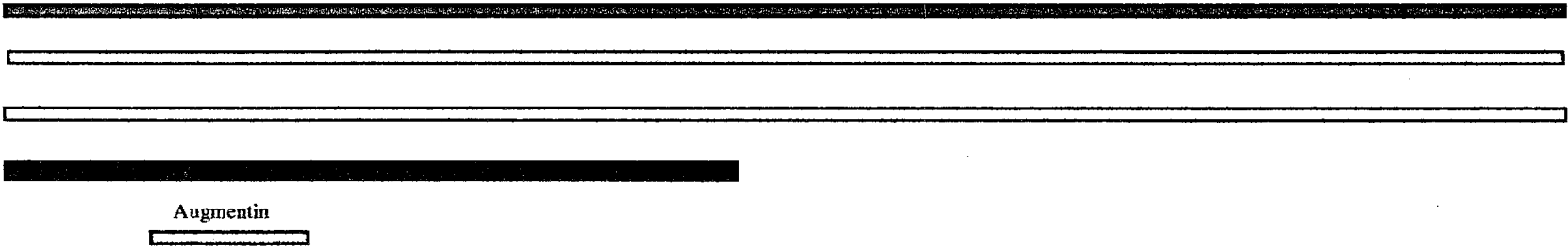
Receveur : CMV négatif

Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J 0	-	-	-	IgM - IgG -
J 9	-	-	-	IgM - IgG -
J 15	-	-	-	IgM - IgG -
J 21	-	-	-	IgM - IgG -
J 29	-	-	-	IgM - IgG -
J 36	-	-	-	IgM - IgG -
J 52	-	-	-	IgM - IgG -
J 70	-	-	-	IgM - IgG -
J 101	-	-	-	IgM - IgG -



T  
H  
E  
R  
A  
P  
E  
U  
T  
I  
Q  
U  
E  
S

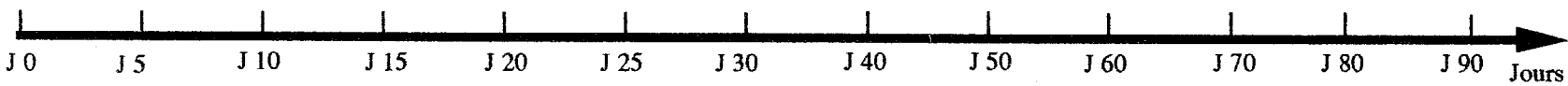


Augmentin

J 6  
Bronchite  
productive

C  
L  
I  
N  
I  
Q  
U  
E

B  
I  
O  
L  
O  
G  
I  
E



Sujet n° 6

Résultats

## SUJET N° 7

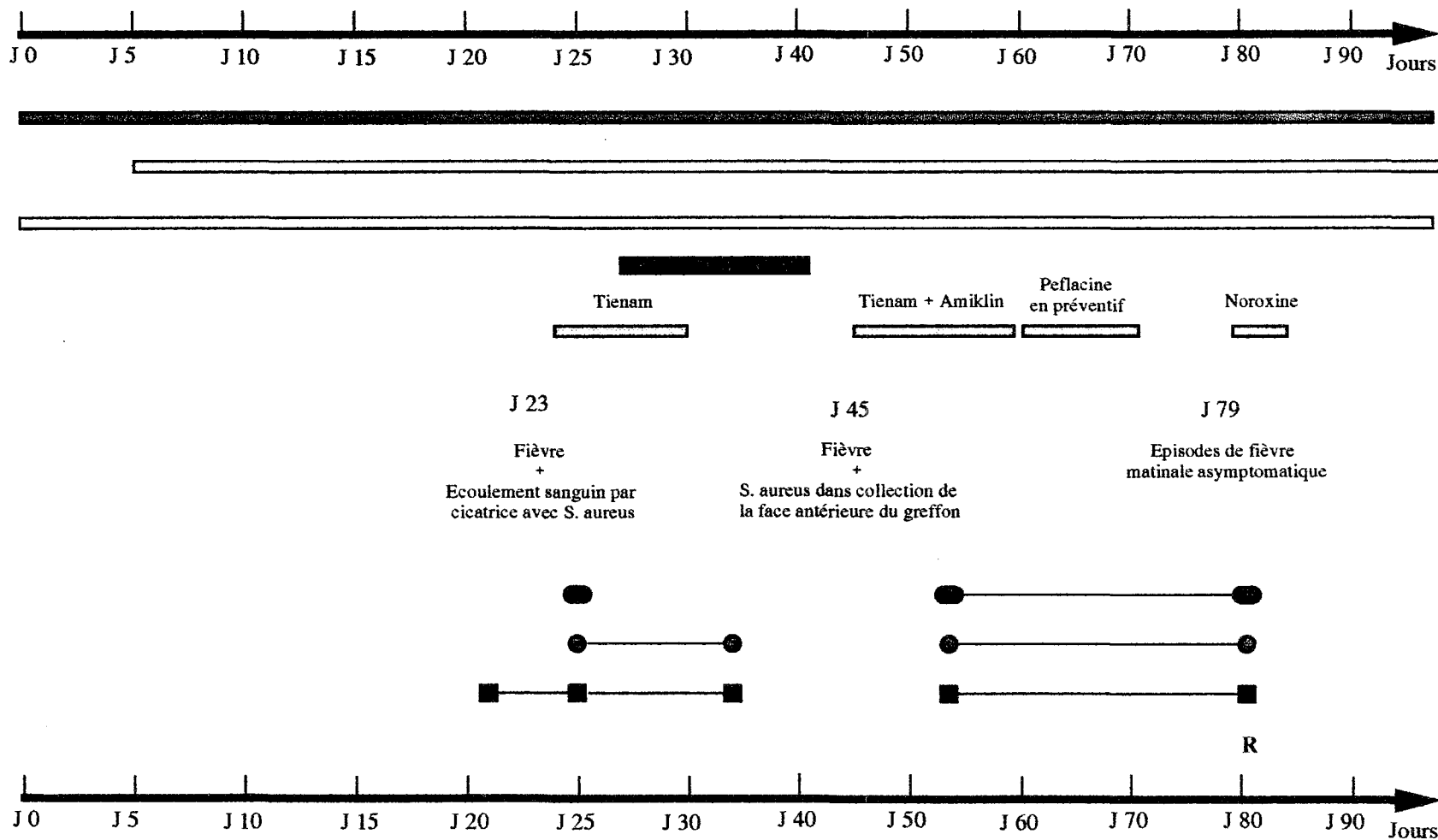
Receveur : CMV positif  
Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J 0	Non effectuée	-	-	Non effectuée
J 5	-	-	-	IgM - IgG = 0,8
J 12	-	-	-	IgM - IgG = 0,8
J 19	-	-	-	IgM - IgG = 0,8
J 22	-	++	-	IgM - IgG = 0,8
J 26	+ (2 cellules)	++	+	Non effectuée
J 33	+ (1 cellule)	+	-	IgM - IgG = 0,8
J 43	-	-	-	IgM - IgG = 1,2
J 54	+ (14 cellules)	++	+	IgM - IgG = 1,2
J 81	+ (15 cel / champ)	++	+	IgM - IgG = 1,4

THERAPEUTIQUES

CLINIQUE

BIOLOGIE



Sujet n° 7

Résultats



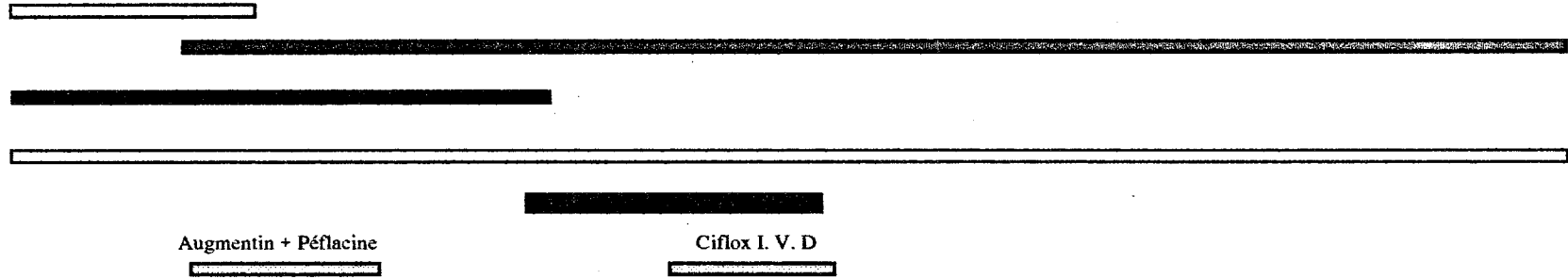
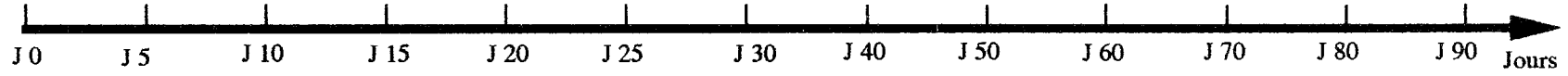
## SUJET N°8

Receveur : CMV positif

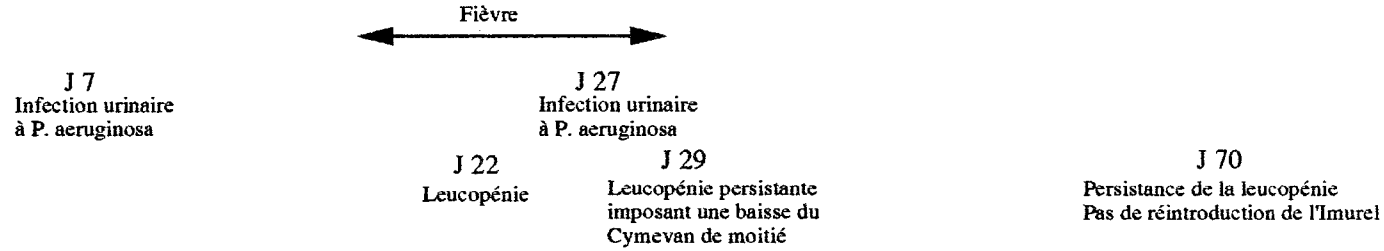
Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J1	-	-	-	IgM - IgG = 1,9
J7	-	-	-	Non effectuée
J9	-	-	-	IgM - IgG = 1,5
J16	-	+ faible	-	Non effectuée
J17	-	+	-	IgM - IgG = 1,5
J35	-	-	-	IgM - IgG = 2
J76	-	-	-	IgM - IgG = 2

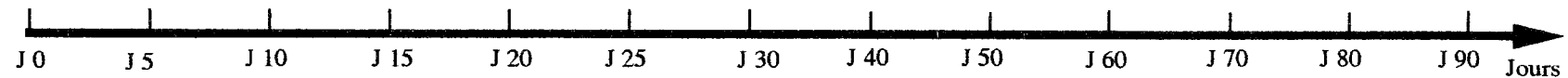
THERAPEUTIQUES



CLINIQUE



BIOLOGIE



Sujet n° 8

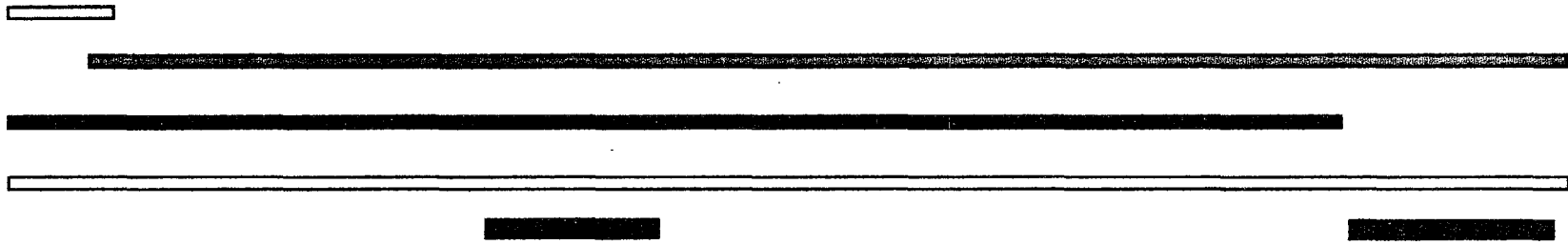
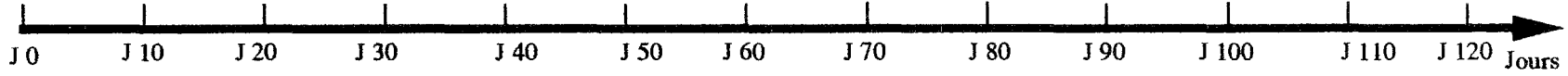
Résultats

## SUJET N°9

Receveur : CMV positif  
Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J0	-	-	-	IgM - IgG = 1,4
J6	-	-	-	IgM - IgG = 1,1
J13	-	-	-	IgM - IgG = 1,1
J18	-	-	-	IgM - IgG = 1,1
J24	+ (2 cellules)	++	+	IgM - IgG = 1,1
J31	+ (15 cellules)	+++	+	IgM - IgG = 1,1
J38	+ (35 cellules)	+++	-	IgM - IgG = 1,4
J46	+ (8 cellules)	+++	-	IgM - IgG = 1,4
J52	+ (5 cellules)	+++	-	Non effectuée
J75	+ (5 cellules)	++	+	IgM - IgG = 1,4
J97	+ (40 cellules)	++	+	IgM - IgG = 1,4

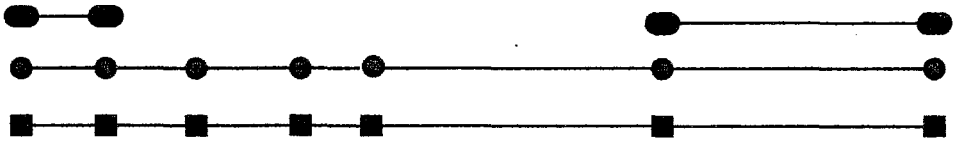
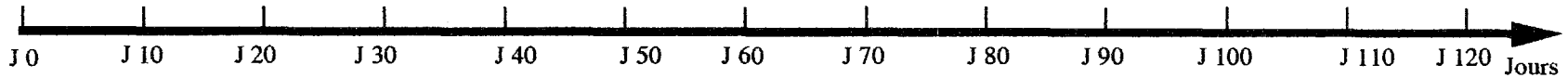
THERAPEUTIQUES



CLINIQUE

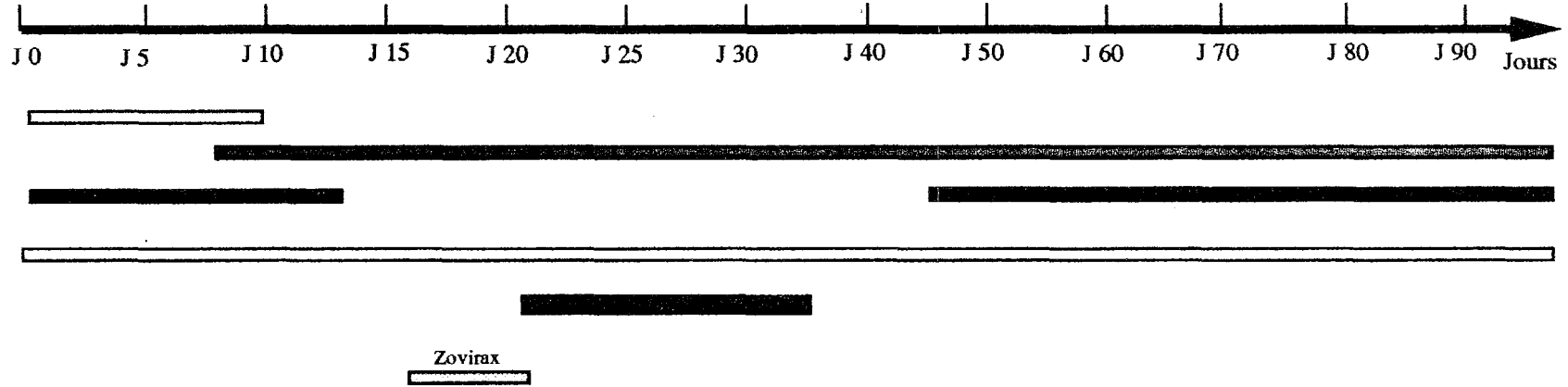


BIOLOGIE

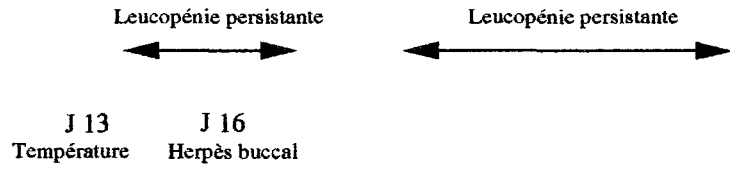


Sujet n° 9

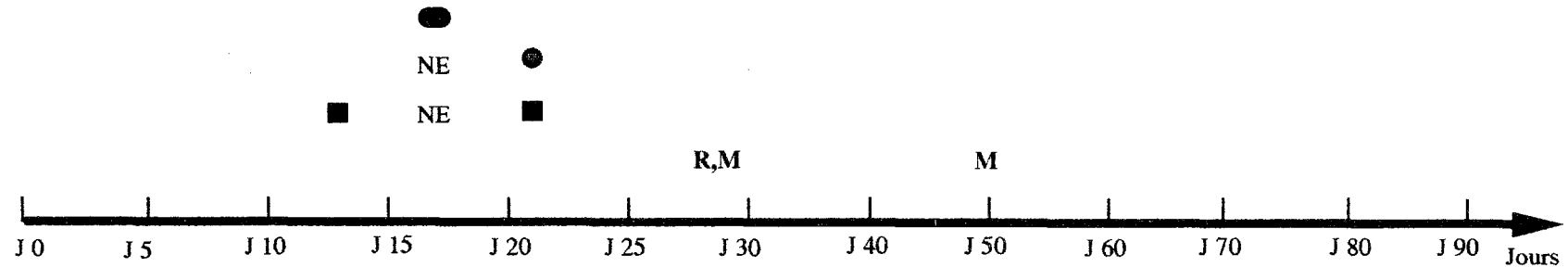
THERAPEUTIQUES



CLINIQUE



BIOLOGIE



Sujet n° 10

Résultats

## SUJET N°10

Receveur : CMV positif

Donneur : CMV positif

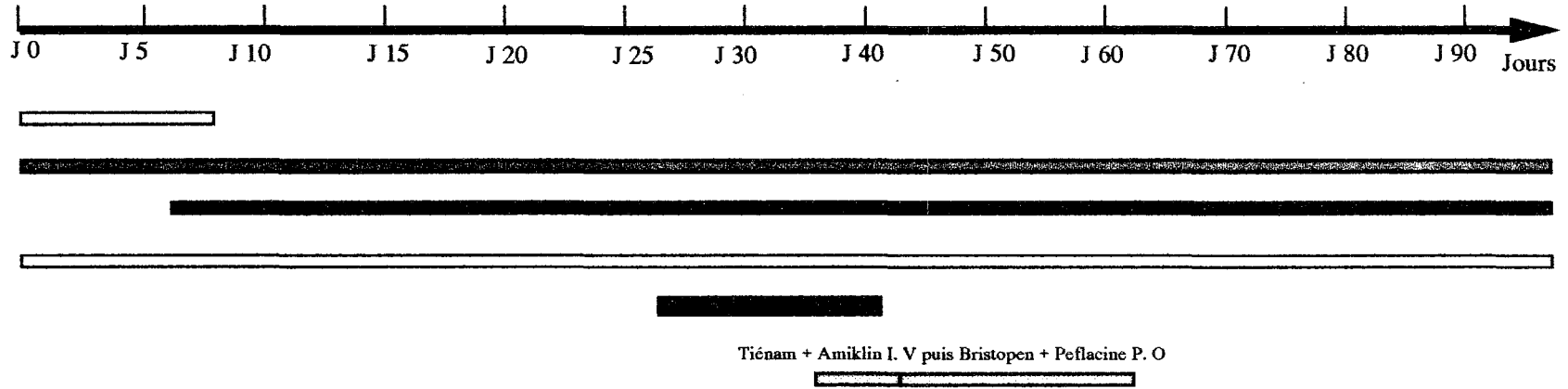
	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J 0	-	-	-	IgM - IgG = 1,0
J 7	-	-	-	IgM - IgG = 1,0
J 12	-	+	-	IgM - IgG = 1,0
J 16	Non effectuée	Non effectuée	+	Non effectuée
J 20	+ (2 cellules)	++	-	IgM - IgG = 1,4
J 27	Ininterprétable	-	-	IgM + IgG = 1,7
J 49	-	-	-	IgM + IgG = 1,7
J 87	-	-	-	IgM - IgG = 1,5

## SUJET N°11

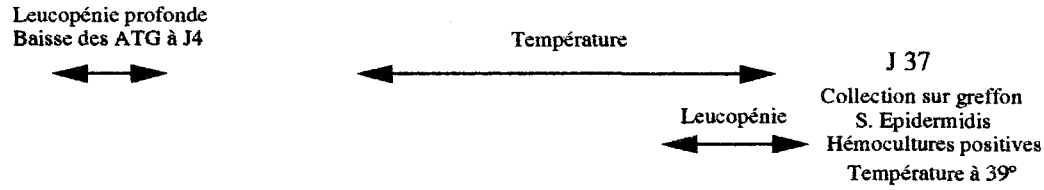
Receveur : CMV positif  
Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J 5	-	-	-	IgM - IgG = 1,1
J 14	-	+ faible	-	IgM - IgG = 1,1
J 22	+ (4 cellules)	+++	-	IgM - IgG = 1,1
J 26	+ (10 cellules)	+++	-	IgM - IgG = 1,1
J 36	+ (10 cellules)	+++	-	IgM + IgG = 1,3
J 55	-	+++	-	IgM + IgG = 1,3
J 64	-	++	-	IgM + IgG = 1,3

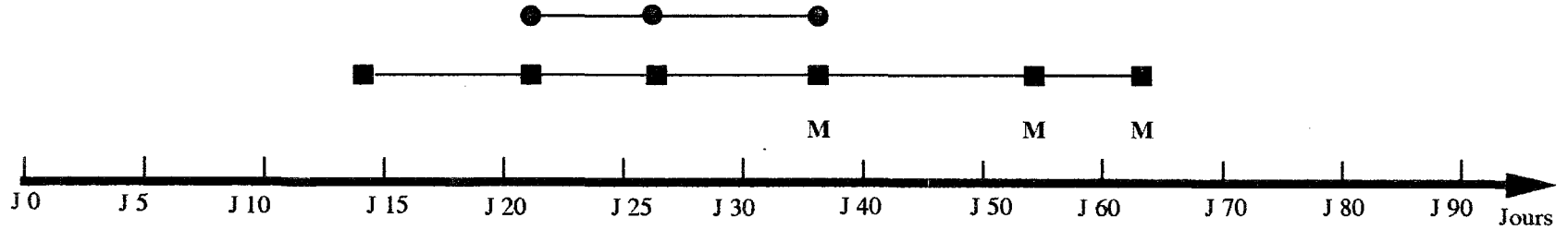
THERAPEUTIQUES



CLINIQUE



BIOLOGIE



Sujet n° 11

Résultats



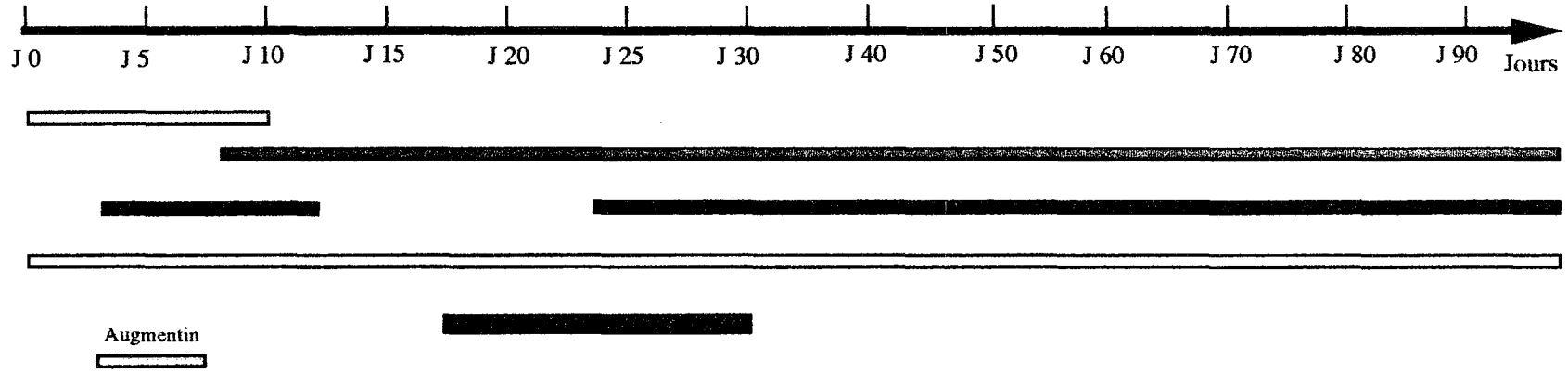
## SUJET N°12

Receveur : CMV positif

Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J0	-	-	-	IgM + IgG = 2,3
J5	-	++	-	IgM + IgG = 2,2
J12	+ (1 cellule)	++	-	IgM - IgG = 2,2
J17	+ (3 cellules)	++	-	IgM - IgG = 2,2
J24	+ (3 cellules)	++	-	IgM - IgG = 2,2
J27	-	++	-	IgM - IgG = 2,2
J31	-	++	-	IgM - IgG = 2,2
J38	-	+	-	IgM - IgG = 2,2
J51	-	-	-	IgM + IgG = 2,2
J67	-	-	-	Non effectuée
J83	+ (7 cellules)	++	-	IgM + IgG = 2,2

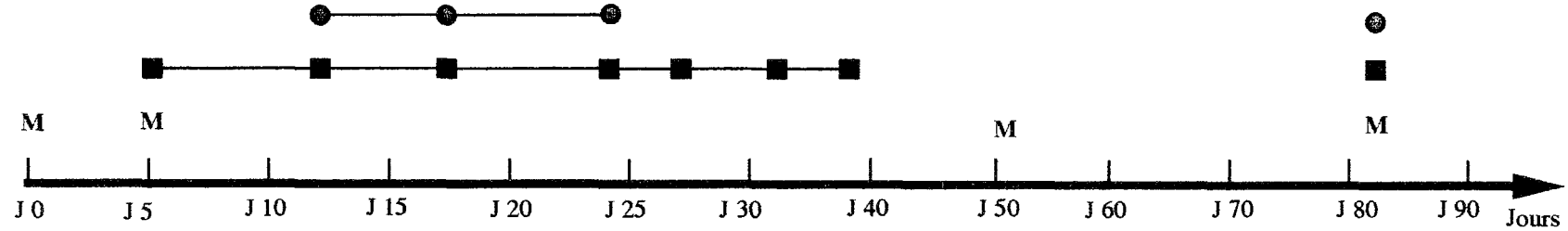
THERAPEUTIQUES



CLINIQUE

Leucopénie  
↔  
J 17  
Fièvre

BIOLOGIE



Sujet n° 12

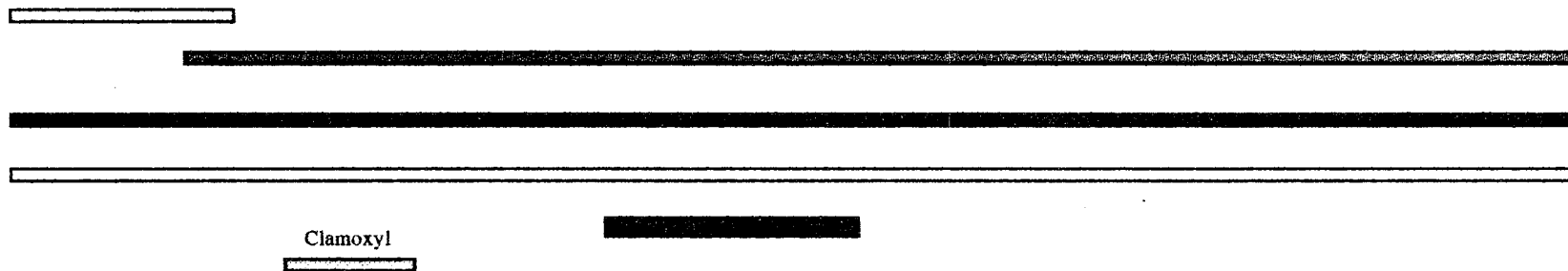
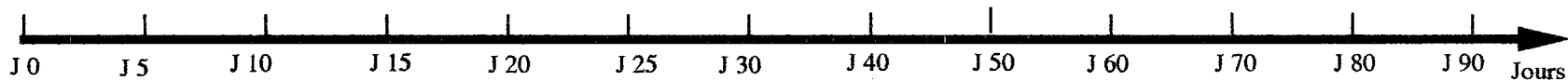
Résultats

## SUJET N°13

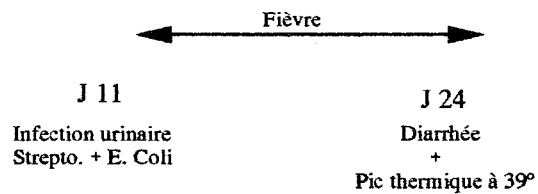
Receveur : CMV positif  
Donneur : CMV négatif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J 0	-	-	-	IgM - IgG = 1,7
J 5	-	-	-	IgM - IgG = 1,6
J 12	-	-	-	IgM - IgG = 1,4
J 19	-	++	-	IgM - IgG = 1,4
J 26	+ (10 cellules)	++	-	IgM - IgG = 1,4
J 33	-	-	-	IgM - IgG = 1,4
J 40	-	-	-	IgM - IgG = 1,4
J 61	+ (4 cellules)	++	-	IgM - IgG = 1,4
J 70	+ (16 cellules)	+++	-	IgM - IgG = 1,4
J 75	+ (2 cel, 8 cel)	+faible	-	Non effectuée
J 82	+ (1 cellule)	+	-	IgM - IgG = 1,4

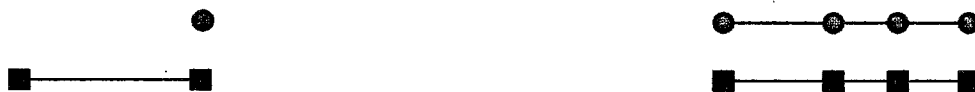
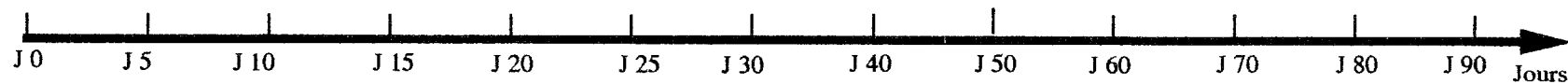
THERAPEUTIQUES



CLINIQUE



BIOLOGIE



Sujet n° 13

Résultats

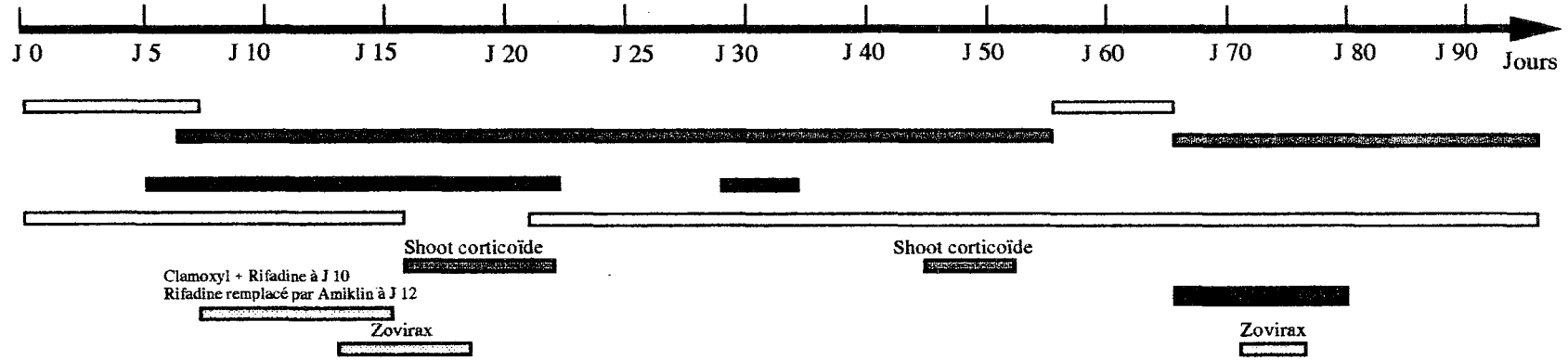
## SUJET N°14

Receveur : CMV positif

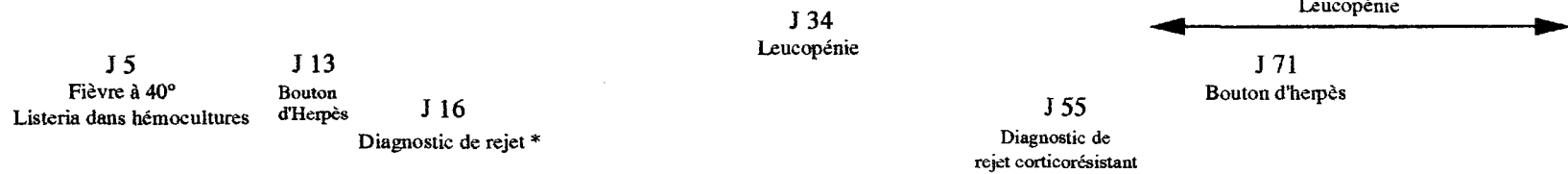
Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J0	Non effectuée	-	-	IgM - IgG = 1,5
J3	-	-	-	IgM - IgG = 1
J10	-	-	-	IgM - IgG = 1
J16	-	+faible	-	IgM - IgG = 1,1
J24	-	+faible	-	IgM - IgG = 1,2
J53	+ (1 cellule)	++	-	IgM - IgG = 1,5
J60	+ (1 cellule)	++	-	IgM - IgG = 1,5
J73	-	++	-	IgM - IgG = 1,5
J86	-	+faible	-	IgM - IgG = 1,5
J89	-	-	-	Non effectuée

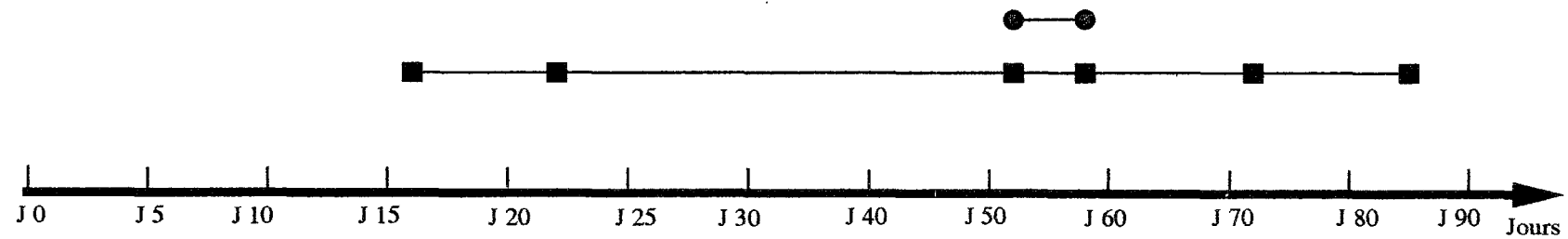
THERAPEUTIQUES



CLINIQUE



BIOLOGIE



\* Il s'agit d'un rejet corticosensible favorisé par la levée de l'immunosuppression induite par les interactions Rifadine-Ciclosporine.

Sujet n° 14

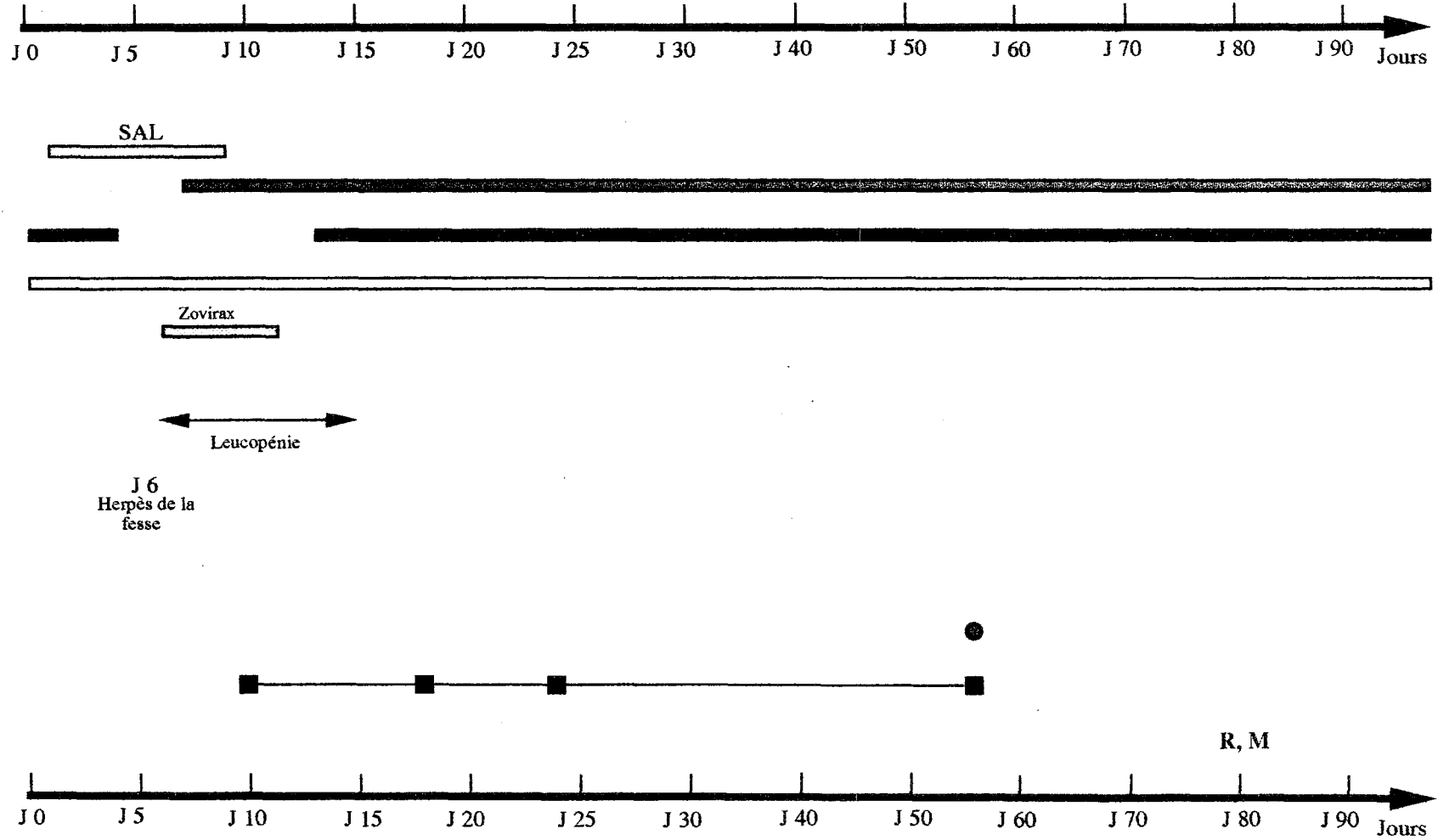
Résultats

## SUJET N°15

Receveur : CMV positif  
Donneur : CMV négatif

	Antigénémié	PCR	Culture	Sérologie
J 3	-	-	-	IgM - IgG = 1,3
J 10	-	+ faible	-	IgM - IgG = 0,9
J 18	-	+	-	IgM - IgG = 0,9
J 24	-	++	-	IgM - IgG = 0,9
J 52	+ (2 cellules)	+++	-	IgM - IgG = 1,3
J 80	-	-	-	IgM + IgG = 1,9

T  
H  
E  
R  
A  
P  
E  
U  
T  
I  
Q  
U  
E  
  
C  
L  
I  
N  
I  
Q  
U  
E  
  
B  
I  
O  
L  
O  
G  
I  
E



R, M

Sujet n° 15

Résultats



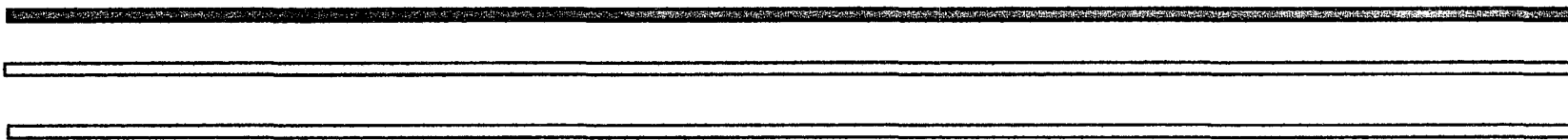
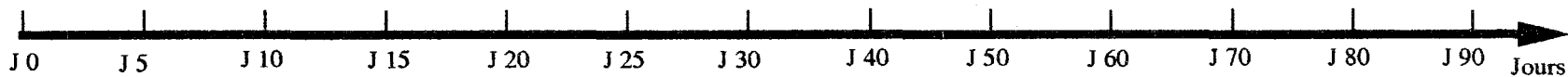
## SUJET N°16

Receveur : CMV positif

Donneur : CMV positif

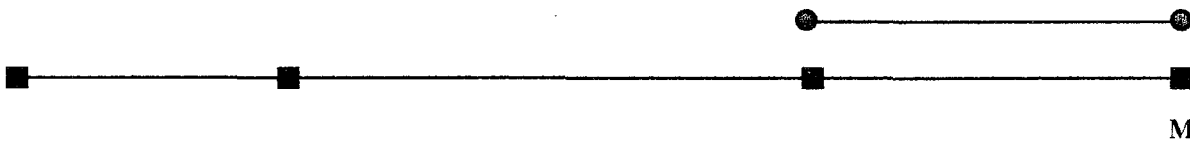
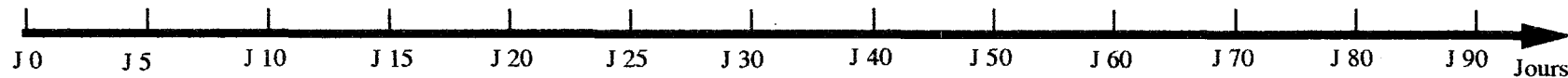
	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J0	Non effectuée	-	-	IgM - IgG = 1
J10	-	-	-	IgM - IgG = 0,9
J17	-	+	-	IgM - IgG = 0,7
J27	-	+	-	IgM - IgG = 0,5
J62	+ (4 cellules)	+++	-	IgM - IgG = 0,5
J90	+ (5 cellules)	+++	-	IgM - IgG = 0,8

THERAPEUTIQUES



CLINIQUE

BIOLOGIE



M

Sujet n° 16

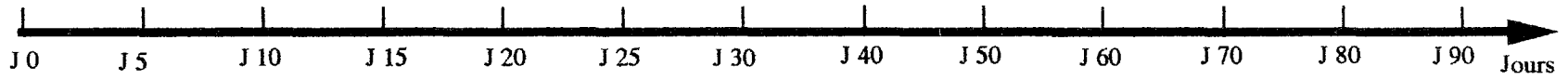
Résultats

## SUJET N°17

Receveur : CMV positif  
Donneur : CMV positif

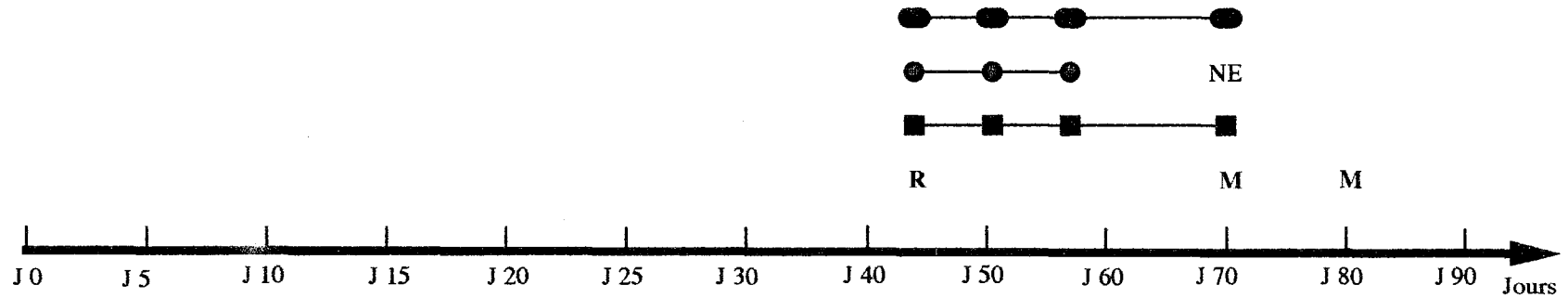
	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J 0	-	-	-	IgM - IgG = 0,5
J 8	-	-	-	IgM - IgG = 0,4
J 11	-	-	-	Non effectuée
J 14	-	-	Non effectuée	IgM - IgG = 0,4
J 17	-	-	-	Non effectuée
J 21	-	-	Non effectuée	IgM - IgG = 0,4
J 28	-	-	-	IgM - IgG = 0,4
J 45	+	+++	+	IgM - IgG = 0,8
J 50	+ (26 cellules)	+++	+	IgM - IgG = 1,0
J 57	+ (70 cellules)	+++	+	IgM - IgG = 1,3
J 70	Non effectuée	+++	+	IgM + IgG = 1,9
J 80	-	-	Non effectuée	IgM + IgG = 1,9

THERAPEUTIQUES



CLINIQUE

BIOLOGIE



Sujet n° 17

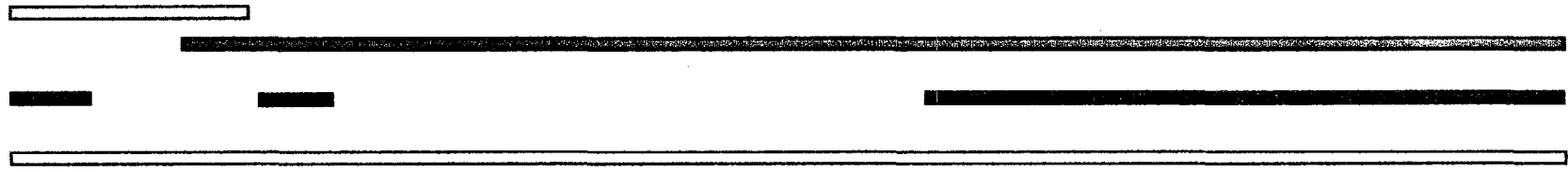
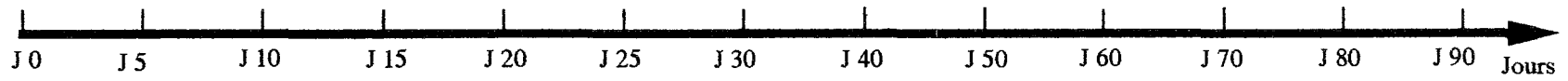
Resultats

## SUJET N°18

Receveur : CMV positif  
Donneur : CMV négatif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J 0	-	-	-	IgM - IgG = 0,6
J 6	-	-	-	IgM - IgG = 0,4
J 13	-	-	-	IgM - IgG = 0,4
J 20	-	++	-	Non effectuée
J 28	+ (1 cellule)	++	-	IgM - IgG = 0,6
J 35	+ (4 cellules)	++	-	IgM - IgG = 1
J 41	+ (6 cellules)	++	-	IgM - IgG = 1
J 56	-	-	-	IgM - IgG = 1,2
J 70	-	-	-	IgM - IgG = 1,3
J 82	-	-	-	IgM - IgG = 1,8

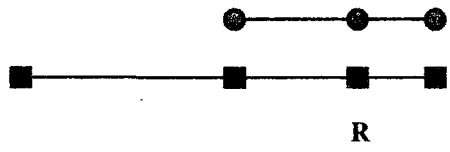
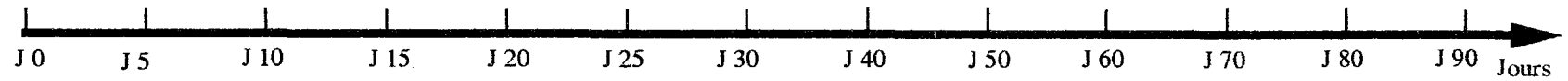
T  
H  
E  
R  
A  
P  
E  
U  
T  
I  
Q  
U  
E  
S



C  
L  
I  
N  
I  
Q  
U  
E

Leucopénie  
↔  
Baisse des ATG à J5.  
J 13  
Récidive de la leucopénie: arrêt de l'Imurel

B  
I  
O  
L  
O  
G  
I  
E



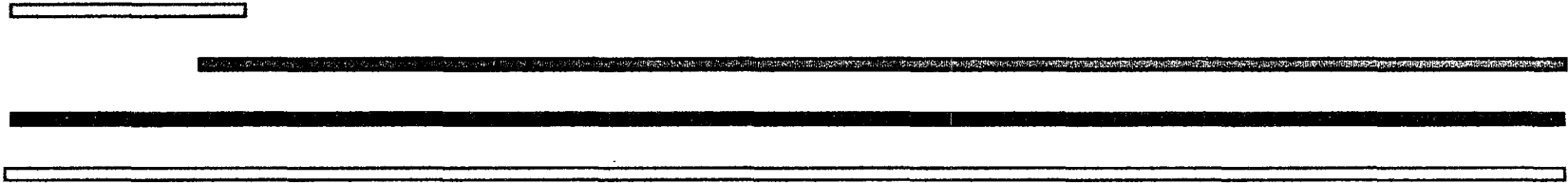
Sujet n° 18

## SUJET N°19

Receveur : CMV positif  
Donneur : CMV négatif

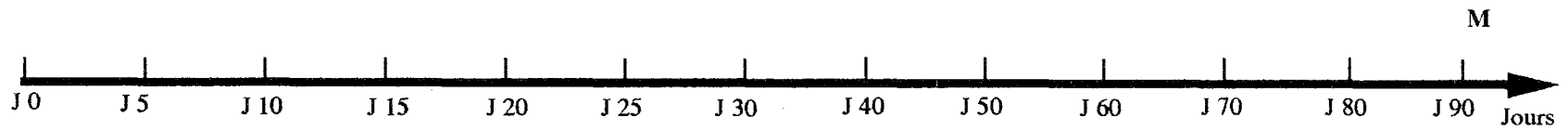
	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J0	-	Non effectuée	-	IgM - IgG = 1,4
J6	-	Non effectuée	-	IgM - IgG = 1,4
J16	-	-	-	IgM - IgG = 1,7
J23	-	-	-	IgM - IgG = 1,7
J29	-	-	-	IgM - IgG = 1,7
J57	+ (1 cellule)	++	-	IgM - IgG = 1,7
J93	-	-	-	IgM - IgG = 1,9

THERAPEUTIQUES



CLINIQUE

BIOLOGIE



Sujet n° 19

Résultats

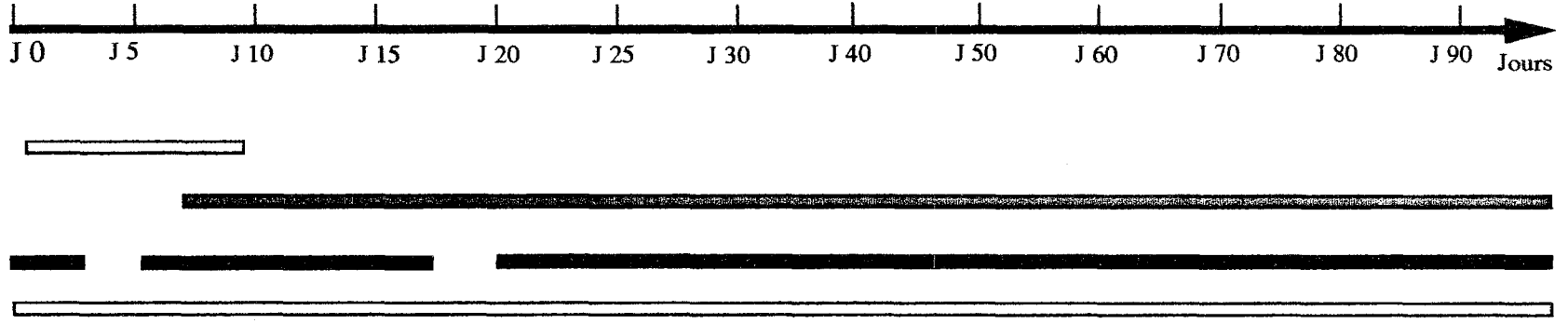


## SUJET N°20

Receveur : CMV positif  
Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J 0	Non effectuée	-	-	IgM - IgG = 2,1
J 7	-	-	-	IgM - IgG = 2,1
J 14	-	-	-	IgM - IgG = 2,1
J 19	+ (1 cellule)	+	-	IgM - IgG = 2
J 56	+ (2 cellules)	++	-	IgM + IgG > 2,5

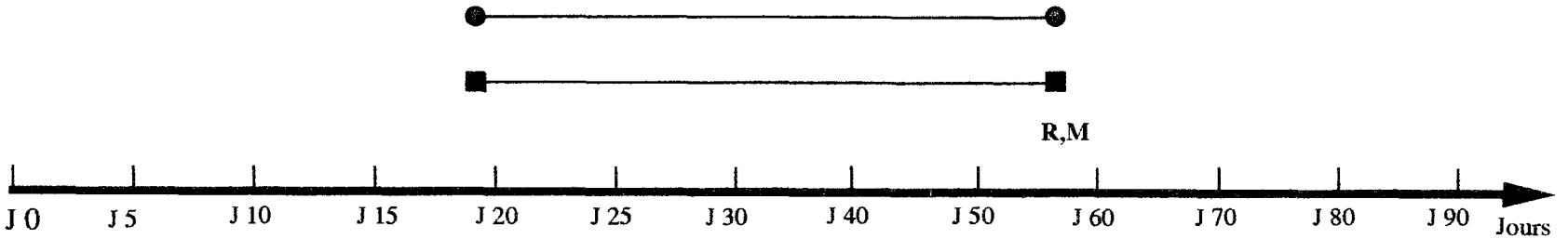
THERAPEUTIQUES



CLINIQUE



BIOLOGIE



Sujet n° 20

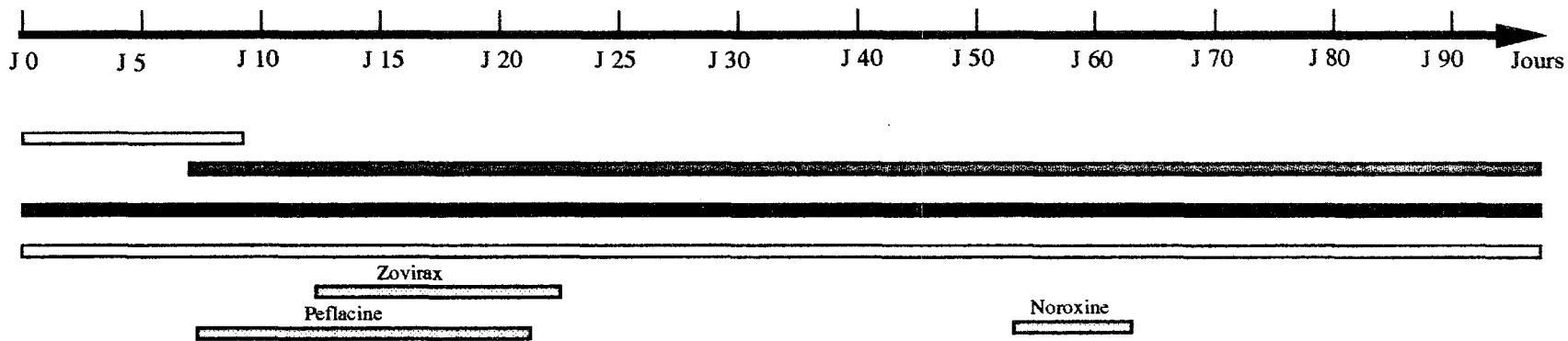
Résultats

## SUJET N°21

Receveur : CMV positif  
Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J0	-	-	-	IgM - IgG = 1,6
J6	-	-	-	IgM - IgG = 1,5
J13	-	-	-	IgM - IgG = 1
J21	-	+	-	IgM - IgG = 1,6
J28	-	+	-	IgM - IgG = 1,6
J55	-	+++	-	IgM - IgG = 1,9
J84	-	++	-	IgM - IgG = 1,9

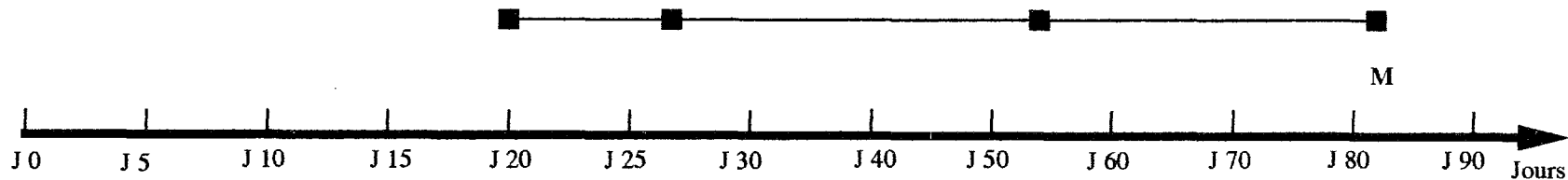
THERAPEUTIQUES



CLINIQUE

J 7 Infection urinaire à E. Coli  
J 12 Herpès sur verge et fesse  
J 53 Infection urinaire

BIOLOGIE



Sujet n° 21

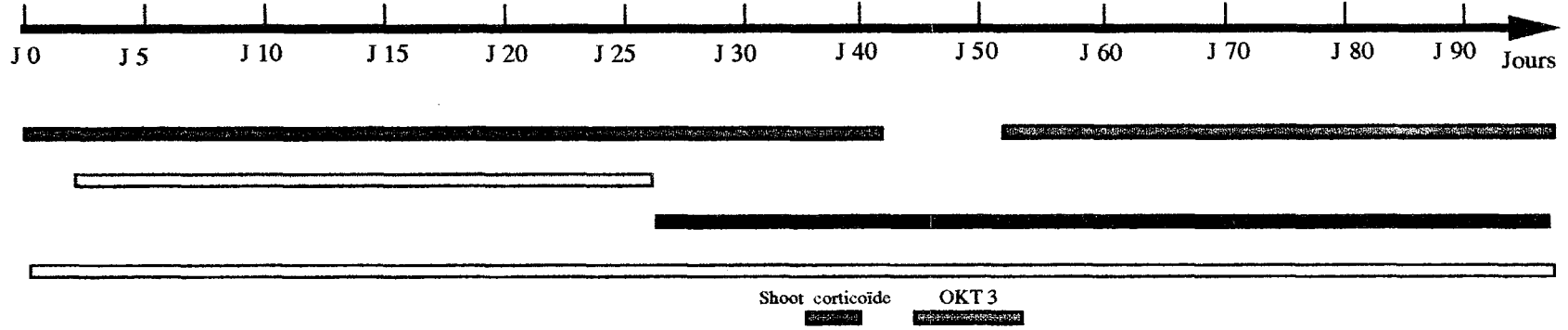
## SUJET N°22

Receveur : CMV positif

Donneur : CMV positif

	Antigénémie	PCR	Culture	Sérologie
J0	-	-	-	IgM - IgG = 1,5
J9	-	-	-	IgM - IgG = 1,0
J14	-	-	-	IgM - IgG = 1,4
J20	-	-	-	IgM - IgG = 1,4
J28	-	-	-	IgM - IgG = 1
J35	-	-	-	IgM - IgG = 1
J54	-	-	-	Non effectuée
J70	Non effectuée	Non effectuée	Non effectuée	IgM - IgG = 1,8

THERAPEUTIQUES



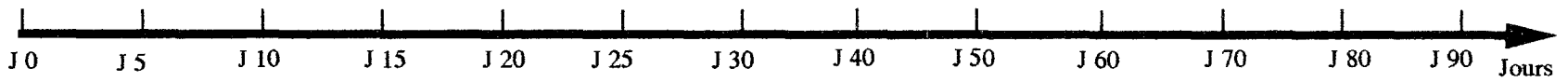
CLINIQUE

J 26  
Intolérance digestive au R. S  
Remplacement par Imurel

J 40  
Diagnostic de rejet  
corticorésistant

J 35  
Pic fébrile à 39,5°  
Diagnostic de rejet aigu

BIOLOGIE



Sujet n°22

Résultats

## 2. RESULTATS GLOBAUX

### 2. 1. Analyse globale des prélèvements

Lors du suivi en post-greffe des 22 transplantés rénaux inclus dans notre protocole, 185 prélèvements sanguins ont pu être analysés par les 3 méthodes (Culture, Antigénémie et PCR). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 5.

PCR	Antigénémie	Culture	Nombre de prélèvements
+	+	+	11
+	+	-	34
+	-	-	35
-	-	-	105
80 prélèvements positifs en PCR (43%)	45 prélèvements positifs en Antigénémie (24%)	11 prélèvements positifs en culture (6%)	<b>Total : 185</b>

**Tableau 5 :** Résultats obtenus sur l'ensemble des prélèvements

80 prélèvements ont été trouvés positifs en PCR soit 43%, 45 en Antigénémie soit 24% et 11 en culture soit 6%.

Tout prélèvement positif en culture a toujours été positif par les deux autres techniques et tout prélèvement positif en Antigénémie a toujours été positif en PCR.

Les résultats globaux de cette étude figurent dans le tableau

### 2. 2. Analyse des résultats selon le statut sérologique du couple donneur / receveur

Les 22 patients de notre étude peuvent être classés en 3 catégories A, B, C selon le statut sérologique du donneur et du receveur.

Pour chaque groupe de sujets, les résultats de l'analyse des différents prélèvements sanguins par les 3 méthodes sont résumés dans le tableau 6.

18 patients sur 22 ont présenté une infection biologique prouvée, soit 82 %.

11 patients sur 22 ont présenté une infection symptomatique, soit 50 %.

15 patients sur les 16 séropositifs avant la greffe ont eu une infection biologique qui a été symptomatique chez 8 d'entre eux.

3 patients sur les 4 séronégatifs avant la greffe recevant un rein séropositif ont fait une primo-infection. Celle-ci a toujours été symptomatique.

### 2. 3. Valeurs prédictives positives et négatives des différents tests

11 sujets parmi les 22 inclus dans le protocole ont présenté des signes cliniques évocateurs d'une maladie à CMV et ont reçu un traitement par le Cymevan.

Les résultats biologiques obtenus chez les 11 sujets traités et chez les 11 sujets non traités, ainsi que les valeurs prédictives et négatives correspondantes sont résumés dans le tableau 7.

	Infection clinique malades traités	Pas d'infection clinique Malades non traités	VPP	VPN
PCR	11 / 11	8 / 11	<b>58%</b> (11/19)	<b>100%</b> (3/3)
Antigénémie	10 / 11	6 / 11	<b>62, 5%</b> (10/16)	<b>83%</b> (5/6)
Culture	5 / 11	1 / 11	<b>83%</b> (5/6)	<b>37%</b> (6/16)

**Tableau 7 :** Valeurs prédictives positives et négatives de la PCR, de l'antigénémie et de la culture.

Valeur prédictive positive (VPP) : Probabilité d'être malade si le test est positif

Valeur prédictive négative (VPN) : Probabilité de ne pas être malade si le test est négatif.



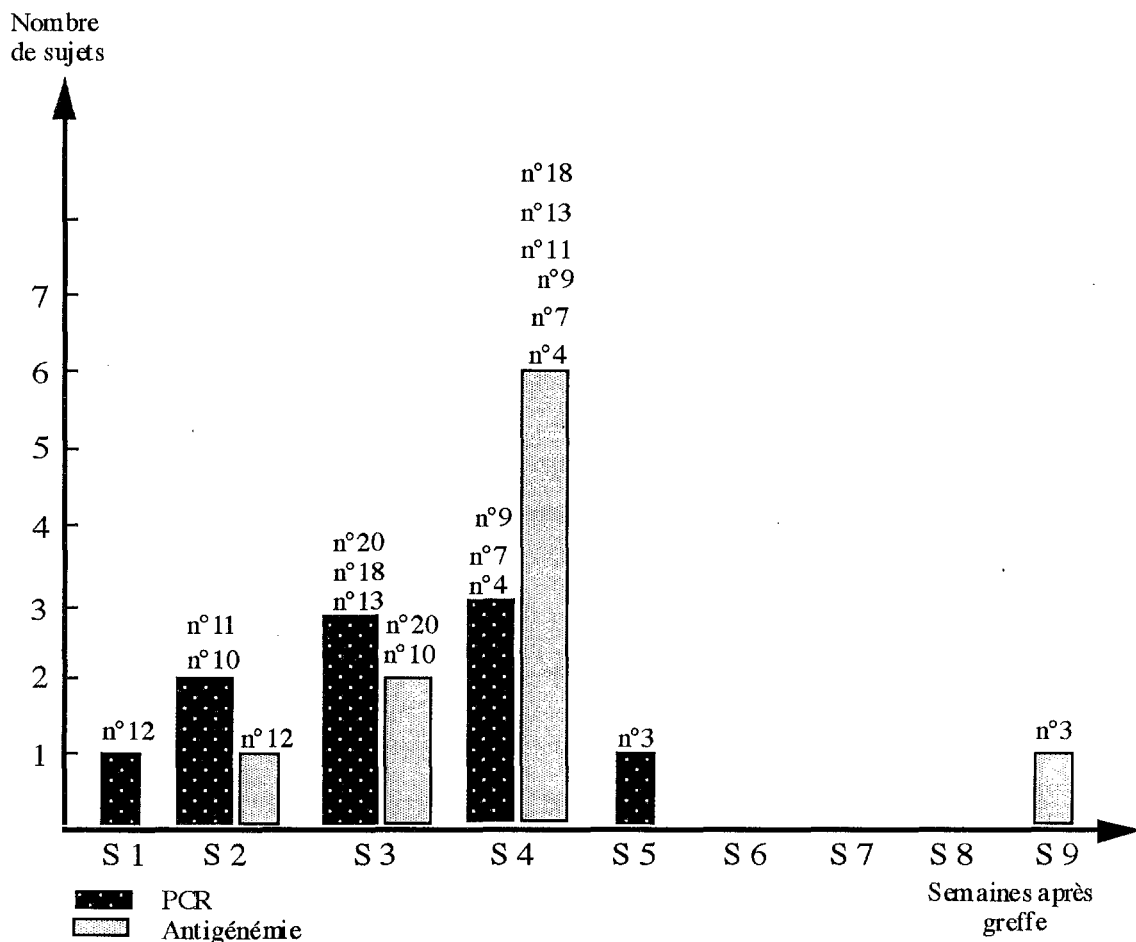
Statut sérologique receveur / donneur	Nombre total de sujets	PCR + Ag - Culture-	PCR + Ag + Culture-	PCR + Ag + Culture+	Total d'infections biologiques	Patients symptomatiques
groupe A + / + + / -	16	2	9	4	15	8
groupe B - / -	2	0	0	0	0	0
groupe C - / +	4	0	1	2	3	3

**Tableau 6** : Résultats obtenus en fonction du statut sérologique du couple donneur / receveur.

## 2. 4. Comparaison : Antigénémie / PCR

### 2. 4. 1. Délai de positivité de la PCR et de l'antigénémie après transplantation

L'infection biologique est détectée à un moment différent selon la technique mise en oeuvre pour rechercher le CMV. Les résultats de cette étude figurent dans le schéma 5.



**Schéma 5:** Délai de positivité de la PCR et de l'antigénémie après transplantation

Cette étude comparative a été faite sur 10 sujets parmi les 16 positifs à la fois en Antigénémie et en PCR (les autres : n°19, 17, 16, 15, 14, 5 n'ayant pas fait l'objet d'un suivi hebdomadaire).

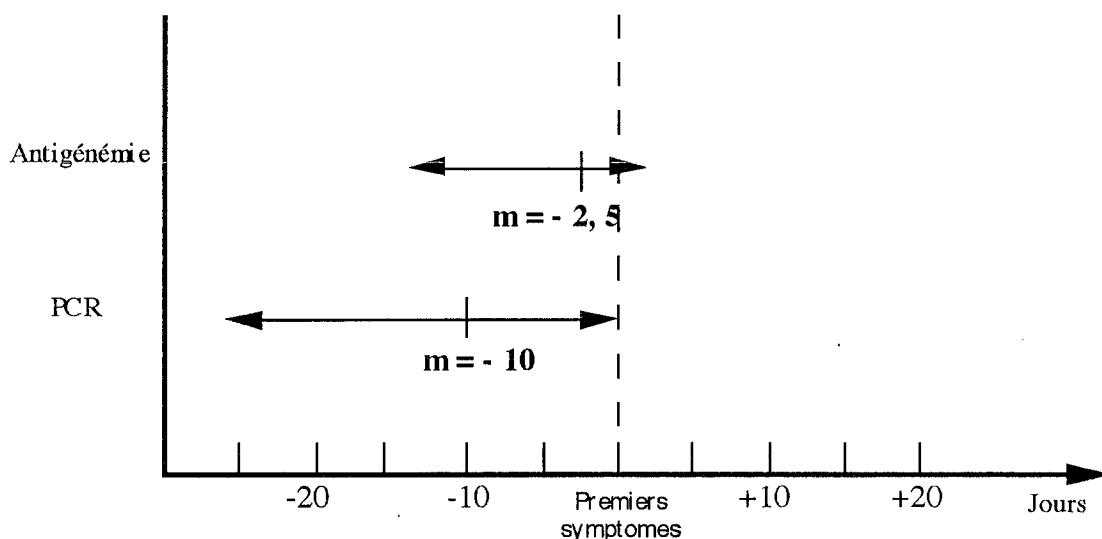
9 sujets ont donc fait une infection biologique dans le premier mois (n°4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 18, 20) dont 3 dans les 15 premiers jours (10, 11, 12).

La positivation tardive (S5 en PCR et S9 en antigénémie), correspond à une primo-infection.

2. 4. 2. Délai de positivité de la PCR et de l'Antigénémie par rapport à la clinique

Sur les 10 patients traités positifs à la fois en antigénémie et en PCR, 8 seulement ont pu être retenus pour calculer une moyenne du délai de positivité de l'antigénémie et de la PCR (les autres : n°5 et n°15 n'ayant pas fait l'objet d'un suivi suffisamment régulier). La moyenne des premiers signes cliniques pour les 8 patients se situe à **29, 2 jours** après la transplantation.

La comparaison de ces moyennes permet de montrer que l'antigénémie et la PCR détectent l'infection avant les premiers signes cliniques et que la PCR est plus précoce que l'antigénémie (Schéma 6).

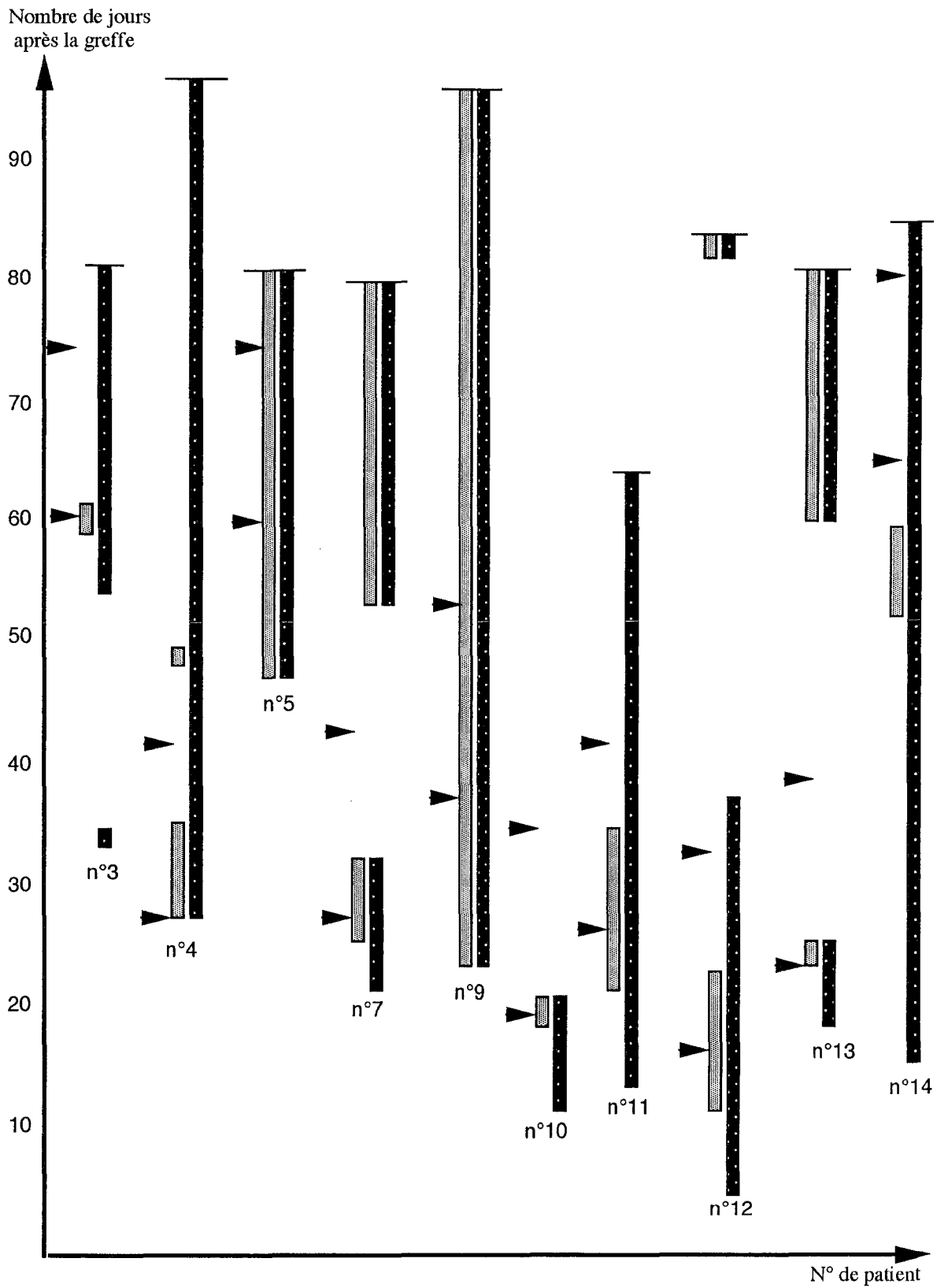


**Schéma 6** : Délai de positivité de la PCR et de l'antigénémie par rapport à la clinique. (Les flèches représentent les valeurs extrêmes)




2. 4. 3. Evolution de l'antigénémie et de la PCR chez les patients traités

Il nous a paru intéressant d'étudier l'impact du traitement sur le devenir de l'antigénémie et de la PCR.

Pour les 10 patients traités positifs à la fois en antigénémie et en PCR, les durées de positivité des 2 techniques, ainsi que le début et la fin de la thérapeutique par le Cymevean sont représentés sur le schéma 7.



**Schéma 7** : Persistenceence de l'antigénémie et de la PCR chez les patients traités

-  Antigénémie
-  PCR
-  Traitement par le Cymevean : début et fin

N. B. : Les traits horizontaux indiquent que la recherche de l'antigénémie ou de la PCR n'a pas été poursuivie

### **Evolution de l'Antigénémie sous traitement**

Parmi les 11 patients traités, 10 sont positifs en Antigénémie. Après l'instauration d'une thérapeutique spécifique par le Cymevan, l'évolution de l'antigénémie est variable selon les sujets . Il existe :

- 2 persistances d'une antigénémie positive (à 3 mois) : Sujets n°5 et n°9 (Ce dernier ayant d'ailleurs bénéficié d'une deuxième cure de Cymevan)

- 4 négativations de l'antigénémie sous traitement : Sujets n°3, n°10, n°11, n°14.

- 4 repositivations après l'arrêt du traitement : Sujets n°4, n°7, n°12, n°13.

### **Persistance de la PCR par rapport à l'antigénémie chez les patients traités**

Chez les 10 patients traités, positifs à la fois en Antigénémie et en PCR, l'étude de la persistance de la PCR par rapport à l'antigénémie après traitement donne les résultats suivants :

- Persistance de 2 semaines par rapport à l'antigénémie : Sujet n°12

- Persistance de 3 semaines par rapport à l'antigénémie : Sujet n°14

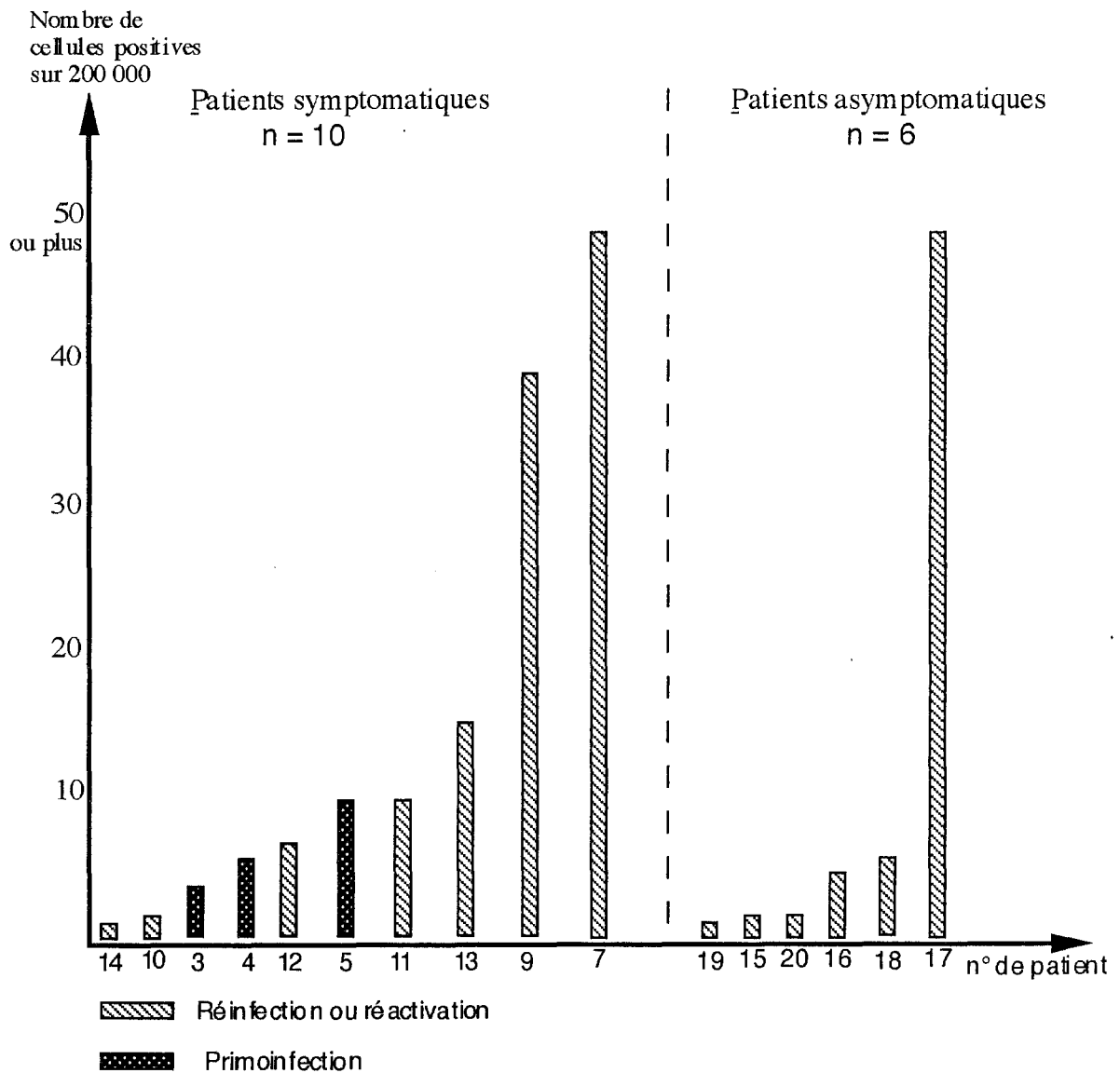
- Persistance de plus de 3 semaines par rapport à l'antigénémie : Sujets n°3, n°4, n°11 (Pour eux, la négativation de la PCR n'a jamais été obtenue pendant la durée du suivi)

- Négativations de la PCR en même temps que l'antigénémie : Sujets n°7, n°10 et n°13.

Les sujets n°5 et 9 ne peuvent être pris en compte dans cette étude car la négativation biologique n'a jamais été obtenue pendant la durée du suivi qu'il s'agisse de l'antigénémie ou de la PCR.

## 2. 5. Quantification de l'antigénémie : Relation avec la clinique

Sur les 16 patients positifs en antigénémie, nous avons voulu voir s'il existait une relation entre le nombre de cellules positives en antigénémie et la symptomatologie. Pour chaque patient, c'est la valeur de l'antigénémie maximale qui a été retenue. Les résultats sont représentés sur le schéma 8)



**Schéma 8** : Valeur maximale de l'antigénémie obtenue pour chaque patient

## **2. 6. Place de la culture dans le diagnostic biologique de l'infection à CMV chez les 22 greffés rénaux**

Durant le suivi des patients en post-greffe, une culture positive a été obtenue chez 6 d'entre eux :

- 5 sujets parmi les 6 ont présenté des signes cliniques évocateurs d'une maladie à CMV et ont été traités : Sujets n°3, n°4, n°7, n°9 et n°10.

- 1 sujet parmi les 6 est demeuré asymptomatique : Sujet n°17.

Dans tous les cas, la culture se positive en même temps que la première antigénémie. Par contre, la durée pendant laquelle le CMV peut être mis en évidence sur culture cellulaire est inférieure à l'antigénémie.

- Sujet n°3 : Culture positive sur 1 seul prélèvement à J61 en même temps que l'antigénémie.

- Sujet n°4 : Culture positive sur 1 seul prélèvement à J28 en même temps que l'antigénémie.

- Sujet n°10 : Culture positive sur 1 seul prélèvement à J16 en même temps que l'antigénémie.

- Sujet n°7 : Culture positive sur 1 seul prélèvement à J26 en même temps que l'antigénémie, puis à nouveau à J54 en même temps que l'antigénémie avec cette fois-ci persistance de la positivité.

- Sujet n°9 : Culture positive sur 2 prélèvements à partir de J24 en même temps que l'antigénémie, puis repositivation à J75 alors que l'antigénémie est restée positive tout le temps.

- Sujet n°17 : Culture positive à J45 en même temps que l'antigénémie et persistance de la positivité pendant toute la durée du suivi.

Les sujets n°7, n°9 et n°17 chez qui le CMV a pu être isolé en culture de façon plus prolongée sont ceux pour qui le plus grand nombre de cellules a été mis en évidence lors des essais de quantification de l'antigénémie.

## 2. 7. Place de la sérologie dans le diagnostic biologique de l' infection à CMV chez les 22 greffés rénaux.

Les 3 patients ayant fait une primo-infection (sujets n°3, n°4, n°5) ont eu une réponse sérologique classique avec positivation successive des IgM puis des IgG. Dans les 3 cas la réponse sérologique est apparue après l'antigénémie.

- Sujet n°3 : Réponse sérologique 1 semaine après l'antigénémie.
- Sujet n°4 : Réponse sérologique au moins 3 semaines après l'antigénémie.
- Sujet n°5 : Réponse sérologique de 1 semaine à 1 mois après l'antigénémie.

Parmi les 16 patients séropositifs avant la greffe, une réactivation sérologique a été obtenue chez 11 d'entre eux (69%) avec présence d'IgM 9 fois sur 11 (82%).

On considère qu'il y a réactivation sérologique si l'on se trouve dans l'un des cas suivants :

- soit élévation significative des IgG (variation de D. O > 0, 4) avec ou sans IgM
- soit IgG stables avec apparition des IgM

Si l'on étudie la présence ou non d'une sérologie évocatrice d'une infection à CMV chez les 16 patients séropositifs avant la greffe, ces derniers se répartissent de la façon suivante (Tableau 8).

	Patients symptomatiques	Patients asymptomatiques
Réactivation sérologique	4	7
Absence de réactivation sérologique	4	1
Total	8	8

**Tableau 8:** La sérologie chez les patients séropositifs avant la greffe.

Il est difficile pour la sérologie de calculer un délai de positivité par rapport à la clinique car le suivi des patients n'a pas toujours été très régulier au moment où la réponse sérologique est apparue. Toutefois il apparaît que la réactivation sérologique a toujours été obtenue après la première antigénémie positive. Ce délai variant de 1 semaine à plus de 1 mois selon les sujets.



- Délai de 1 à 2 semaines : Sujets n°10, n°11, n°18
  
- Délai de 2 à 3 semaines : Sujets n°17
  
- Délai de plus de 1 mois : Sujets n°7 et n°12
  
- Délai de 1 semaine à 1 mois : Sujets n°15, n°16, n°19, n°20

Le sujet n°21 ne figure pas car pour lui, l'antigénémie n'a jamais été retrouvée positive.

## **CHAPITRE 4**

---

### **DISCUSSION**

#### **1. LES GRANDS CARACTERES DE L'INFECTION A CMV DANS NOTRE ETUDE PAR RAPPORT A LA LITTERATURE**

##### **1. 1. Fréquence**

###### 1. 1. 1. Fréquence de l'infection

Parmi les 22 transplantés rénaux que nous avons suivis pendant les trois premiers mois suivant la greffe, 18 ont présenté des signes biologiques révélateurs d'une infection à CMV soit 82 %. Une réactivation biologique chez les sujets séropositifs a été observée dans 94% des cas (15/16), une primo-infection dans 75% des cas (3/4). Les 2 patients séronégatifs greffés avec un rein de séronégatif sont restés négatifs ce qui semble normal car ces derniers ont toujours été transfusés avec du sang provenant de donneurs CMV séronégatifs.

Dans la littérature, les chiffres obtenus sont voisins. L'incidence de l'infection en transplantation rénale varie selon les auteurs de 43 à 92% : cette diversité s'expliquant par l'hétérogénéité des critères diagnostiques et des protocoles d'immunosuppression. Le taux des primo-infections chez les CMV séronégatifs greffés par un rein CMV positif oscille entre 61% pour SMILEY, 1985 et 89% pour METSELAAR, 1989. Quant aux réactivations, RUBIN, 1990 estime que tout séropositif avant la greffe exprimera tôt ou tard après celle-ci des signes biologiques d'infections à CMV quel que soit le statut du donneur.

###### 1. 1. 2. Fréquence de la maladie

L'infection biologique s'est accompagnée de signes cliniques chez 8 patients parmi les 16 séropositifs (50%) et chez tous les sujets ayant fait une primo-infection (3/3). Au total, 50% (11/22) des sujets de notre étude ont donc été symptomatiques; tous ont reçu un traitement par le ganciclovir. La littérature cite fréquemment un pourcentage

d'infections symptomatiques plus faible de l'ordre de 20% : ceci est probablement dû au fait que les critères retenus pour parler de "maladie" à CMV sont plus sévères. Dans notre cas, tous les patients symptomatiques ayant été traités, nous avons considéré que tous avaient développé une maladie à CMV même si celle-ci a toujours présenté les caractéristiques des formes modérées (fièvre inexplicable associée à une leucopénie). En effet, aucune forme grave de la maladie n'a été observée, peut-être du fait de la mise en place d'une thérapeutique précoce. Très souvent, la présence des premiers signes cliniques évocateurs de la maladie à CMV associée à un résultat biologique concordant (antigénémie en général) a entraîné l'instauration immédiate d'une thérapeutique curative antivirale évitant ainsi l'évolution de la maladie. De plus, en transplantation rénale, les formes graves sont rares (9% selon les critères de la Minnesota Health Science Center) car l'immunosuppression est moins profonde que dans les autres types de greffe.

#### 1. 1. 3. Evolution sous traitement

Dans tous les cas, la mise en place d'une thérapeutique curative par le ganciclovir pendant 15 jours a permis une évolution favorable avec disparition des signes cliniques. Aucun échec clinique n'a été observé, ce qui confirme bien qu'en transplantation rénale l'émergence de souches de CMV résistantes au ganciclovir représente une éventualité peu fréquente, certainement du fait de la brièveté de la thérapeutique. Un seul patient (n°9) a reçu une deuxième cure de ganciclovir deux mois après la première du fait d'un retour des signes cliniques : ceux ci ne peuvent être attribués à un phénomène de résistance au traitement du fait du délai qui s'est écoulé mais plutôt à une récurrence de la maladie, d'autant plus que le malade a bien répondu au deuxième traitement. La réapparition d'une maladie à CMV chez les greffés rénaux est estimée dans la littérature à 20 ou 30% (VAN DEN BERG, 1992).

#### 1. 1. 4. Délai d'apparition de l'infection après transplantation

L'étude du délai d'apparition de l'infection biologique par rapport à la transplantation révèle une plus grande précocité de l'infection par rapport à ce qui est classiquement décrit dans la littérature (4 à 6 semaines). Les 10 sujets de notre étude qui sont exploitables pour l'analyse de ce paramètre se positivent tous dans le premier mois à l'exception du sujet n°3 (schéma 5). Cette positivité plus tardive correspond à une primo-infection et peut s'expliquer par le fait que la thérapeutique préventive par les gamma globulines pendant le premier mois a retardé l'infection.

Toutefois, les 6 sujets exclus de cette analyse sont ceux pour qui le suivi a été interrompu quelques semaines à partir de S4. Pour 3 d'entre eux, la PCR qui s'est

positivée de façon beaucoup plus précoce que l'antigénémie a révélé une infection biologique 1 fois à S2 (sujet n°15) et 2 fois à S3 (sujets n°14 et 16) donc dans le premier mois. Pour les 3 autres, l'infection, même si elle ne peut pas être datée précisément, est apparue au cours du deuxième mois (sujets n°5, 17 et 19).

Cette constatation permet de formuler une critique sur les dates retenues au niveau du protocole pour le suivi des patients séropositifs : celui-ci prévoyait une interruption entre S4 et S8, période pendant laquelle les techniques utilisées pour diagnostiquer l'infection à CMV se sont positivées chez ces trois malades. Cette interruption se justifiait au départ par le fait qu'en l'absence de signes cliniques, ces patients n'étaient pas revus en consultation au CHU et qu'il n'était donc pas possible de poursuivre les prélèvements de façon hebdomadaire.

## **1. 2. Facteurs favorisants**

### 1. 2. 1. Le type d'immunosuppression

L'immunosuppression est le facteur majeur connu pour favoriser la survenue des infections à CMV chez les transplantés. Dans notre étude, tous les sujets ont reçu en prévention du rejet, une tri-thérapie mais celle-ci faisant appel à deux protocoles différents :

-Pour 16 sujets, l'immunosuppression a associé : Corticoïdes, Azathioprine et ATG 10 jours avec la Ciclosporine en relais.

-Les 6 autres patients ont participé à des essais cliniques visant à évaluer une nouvelle molécule qui pourrait remplacer l'Azathioprine. L'immunosuppression associait pour eux : Corticoïdes, RS 61.443 et Ciclosporine dès le début de la greffe. Cet essai clinique étant effectué en double aveugle, les gélules de RS contenaient soit de l'Azathioprine, soit la nouvelle molécule.

Il n'est pas possible d'évaluer le degré d'immunosuppression engendré par la nouvelle molécule par rapport à l'azathioprine. Par contre, les patients rentrant dans le premier schéma de prévention ont reçu une cure d'ATG que n'ont pas eue les autres et nous avons voulu voir s'ils avaient plus souvent développé une maladie symptomatique.

Les 16 patients ayant reçu de l'ATG se répartissent de la façon suivante :

-10 infections symptomatiques dont 3 primo-infections (Sujets n°3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 et 14)

-5 infections biologiques asymptomatiques (Sujets n°15, 18, 19, 20 et 21)

-1 R-/D- (Sujet n°1) qui n'a pas développé d'infection

Les 6 patients sans ATG se répartissent comme suit :

-1 infection symptomatique (Sujet n°7)

-2 infections biologiques asymptomatiques (Sujets n°16 et 17)

-3 sujets avec absence d'infection : 1 R-/D+ (Sujet n°6), 1 R+/D+ (Sujet n°22), 1 R-/D- (Sujet n°2).

En excluant dans chaque groupe le sujet R-/D- qui n'a à priori aucun risque de développer une maladie à CMV, le pourcentage d'infections symptomatiques est de 66% sous ATG et de 20% sans ATG. Deux particularités sont à noter pour ce dernier groupe : on y retrouve le seul patient séronégatif greffé par un rein de séropositif qui n'a pas fait de primo-infection et le seul patient séropositif de notre étude qui n'a pas fait de réactivation.

Le rôle joué par l'ATG comme facteur favorisant la maladie à CMV a été largement décrit dans la littérature (SNYDMAN, 1993; RUBIN, 1990; BOLAND, 1990) et notre étude semble le confirmer. L'ATG, dont le mécanisme d'action est d'induire une lymphopénie T, est un facteur favorisant d'une part la réactivation du virus latent et d'autre part l'inhibition des mécanismes immunologiques permettant de contrôler la multiplication virale. Une relation très nette a pu être établie entre l'activité cytotoxique des cellules T contre le CMV et la protection contre l'infection en transplantation rénale (BOLAND, 1990). L'ATG augmente de ce fait l'incidence de l'infection et de la maladie, ainsi que la gravité de cette dernière.

Chez les patients ayant reçu de l'ATG, nous avons voulu voir si ceux qui avaient une lymphopénie majeure (inférieure à 100/l) ayant nécessité une diminution de la dose d'ATG avaient plus souvent développé une maladie que les autres. Au cours de cette analyse, nous n'avons pu mettre en évidence aucune corrélation.

### 1. 2. 2. Le rejet de greffe

Un diagnostic de rejet aigu a été formulé pour 3 sujets (n°3, 14 et 22): deux d'entre eux ont développé ensuite une maladie à CMV, l'autre n'ayant déclaré aucun signes d'infection. Il est probable que le renforcement de l'immunosuppression engendré par la thérapeutique anti-rejet, ait favorisé la survenue des signes cliniques : ceci conduit certains auteurs à instaurer systématiquement en parallèle aux corticoïdes une thérapie par le ganciclovir (DE KONING, 1992).

### **1. 3. Apport de la prévention**

Dans notre étude, les 4 sujets séronégatifs greffés par un rein de séropositif ont bénéficié d'une prévention :

- Pour deux d'entre eux (sujets n°3 et n°4), celle-ci a fait appel aux gammaglobulines humaines enrichies en immunoglobulines anti-CMV. Chez ces deux sujets, une primo-infection apparue pendant la durée de la prévention a nécessité

l'interruption prématurée de la prévention des gammaglobulines et la mise en place d'une thérapeutique curative par le ganciclovir, ces deux infections étant toutes deux symptomatiques.

- Pour les deux autres sujets (sujets n°5 et n°6), celle-ci a fait appel au ganciclovir à dose prophylactique pendant 28 jours). Le sujet n°6 n'a présenté aucun signe d'infection. Le sujet n°5 a présenté une infection biologique après la fin de la prévention et il s'est écoulé au moins deux semaines avant l'apparition des premiers signes cliniques qui ont conduit à la mise en place d'une thérapeutique curative.

Il ne nous est pas possible de préjuger de la plus ou moins grande efficacité de ces deux types de prévention, étant donné le peu de sujets concernés. Dans la littérature, l'effet protecteur des gammaglobulines n'est pas démontré. Pour certains, elles diminuent l'incidence de la maladie et en particulier celle des formes graves (SNYDMAN, 1993) alors que pour d'autres elles n'ont aucun effet (PAKKALA, 1992b). Les études visant à évaluer l'effet préventif du ganciclovir sont actuellement peu nombreuses. Il semble que celui-ci diminue sensiblement l'incidence de l'infection et celle de la maladie mais l'effet majeur serait un retard de leurs survenues et une diminution de la sévérité de la maladie (RONDEAU, 1992).

## **2. APPORT DE L'ANTIGENEMIE**

### **2. 1. Discussion des méthodes**

Nous avons utilisé pour l'antigénémie :

- la technique classique de préparation des polynucléaires par Dextran
- la fixation des cellules par un mélange méthanol-acétone
- la révélation par un Acmc anti pp65 C10 C11 CLONAB
- une technique de marquage par immunofluorescence (IF)

Certaines équipes ont effectué des essais d'optimisation de l'antigénémie en comparant la technique classique à des techniques qui diffèrent par le mode de fixation, le marquage et le choix des Acmc.

#### **2. 1. 1. Technique de fixation**

GERNA, 1992 a montré que la fixation par le formaldéhyde, accompagnée d'une étape de perméabilisation des cellules par un détergent non ionique, permettait d'obtenir plus de cellules positives et une image plus intense de la fluorescence nucléaire, que la fixation par le mélange méthanol-acétone.

LANDRY, 1993 confirme l'observation d'une meilleure morphologie cellulaire lors de l'utilisation du formaldéhyde mais ne note pas une différence significative de la sensibilité.

### 2. 1. 2. Comparaison : immunofluorescence et immunoperoxydase

Les deux équipes ont également comparé IF et IP et s'accordent à dire que la technique IF permet d'obtenir une meilleure sensibilité que les différentes méthodes d'IP (Technique Avidine/Biotine; Technique par phosphatase alcaline), la différence du nombre de cellules positives détectées étant statistiquement significative

### 2. 1. 3. Choix des Acmc

GERNA, 1992 a comparé différents Acmc (produits dans son laboratoire) dirigés contre la pp65 et le réactif commercialisé par BIOTEST CLONAB C10 C11. Il a montré qu'un pool d'Acmc donnait de meilleurs résultats pour les antigénémies faibles mais qu'il n'y avait pas de différences significatives pour les antigénémies élevées. Il préconise tout de même l'utilisation d'un pool d'Acmc.

## **2. 2. Discussion des résultats**

Nos résultats montrent que chez les 8 patients symptomatiques suivis régulièrement, l'antigénémie se positive plusieurs jours avant l'apparition des premiers signes cliniques (en moyenne 2, 5 jours avant) ce qui est retrouvé dans la littérature (VAN DEN BERG , 1989). Ce dernier détecte une antigénémie entre quelques jours à 1 semaine avant le début de la maladie. Dans notre étude, le suivi des patients n'étant qu'hebdomadaire, on peut estimer qu'une recherche plus fréquente (bihebdomadaire) permettrait d'obtenir encore, une plus grande précocité de l'antigénémie par rapport à la clinique.

La sensibilité et la spécificité de l'antigénémie ont été évaluées par de nombreuses équipes. Dans notre étude, l'absence de techniques de références (culture longue) ne nous a pas permis de les calculer. Toutefois, la comparaison de cette méthode à la recherche en culture courte montre qu'elle est plus sensible pour déceler une infection à CMV puisqu'elle nous a permis d'obtenir 24% de résultats positifs (45 prélèvements sur 185) contre 6 % (11 prélèvements sur 185) en culture. En ce qui concerne la spécificité, nous n'avons jamais obtenu d'antigénémie positive sans PCR positive, ce qui nous fait conclure à une bonne spécificité.

La sensibilité a été estimée dans la littérature entre 80 à 90% et la spécificité entre 89 et 92% (ERICE, 1992; LANDRY, 1993; THE, 1992; MAZZULI, 1993).

Nous obtenons avec cette technique une valeur prédictive positive (VPP) de 62, 5% (10/16) et une valeur prédictive négative (VPN) de 83% (5/6). Dans la littérature, ERICE, 1992 obtient respectivement une VPP à 65% et une VPN à 98%. La VPP de l'antigénémie plus faible que celle de la culture (83%) est due aux antigénémies positives retrouvées chez des sujets ayant une infection biologique à CMV asymptomatique. La VPN de l'antigénémie quoique très bonne est inférieure à celle de la littérature. Ceci est dû au sujet n°8 qui a été considéré comme ayant développé une maladie à CMV traitée comme telle, et pour qui aucune antigénémie n'a jamais été observée. A posteriori, il existe une incertitude sur la réalité clinique de la maladie à CMV : l'argument en défaveur de celle-ci étant la persistance de la leucopénie sous traitement antiviral.

De nombreux auteurs ont cherché à quantifier l'antigénémie en déterminant le nombre de cellules par lame et ont tenté de le corrélér à la gravité de la maladie. Certains ont même défini la notion de charge virale en rapportant le nombre de cellules positives à celui des leucocytes définissant ainsi le nombre de cellules CMV positives / ml de sang (VAN DER BIJ, 1989). Cette analyse prouve le plus souvent que les forts taux d'antigénémie sont accompagnés de signes cliniques alors que les taux inférieurs à 10 cellules pour 200000 sont retrouvés chez des patients asymptomatiques ou sous traitement (LANDRY, 1993; HALWACHS, 1993) : le seuil retenu pour les différents auteurs est en fait variable, et cette variation s'explique par les différences techniques qui modifient les sensibilités. Quoiqu'il en soit, tous observent des exceptions fréquentes, avec des taux élevés d'antigénémie chez des sujets restant asymptomatiques et des maladies à CMV en dépit de faibles taux d'antigénémie (THE, 1992).

Il nous a également été difficile d'établir une corrélation individuelle entre le niveau d'antigénémie et les manifestations de la maladie à CMV. En effet, le sujet n°17 est resté asymptomatique malgré un niveau d'antigénémie important alors que le sujet n°14 n'a eu qu'une cellule (le traitement dans ce cas ayant été instauré tardivement n'a pas pu influencer ce chiffre)

La quantification ne nous a pas permis de cerner parmi les sujets présentant une antigénémie positive ceux qui présentaient un haut risque de développer une maladie à CMV. Il semble donc que l'expression clinique de la maladie fasse intervenir d'autres phénomènes que la charge virale et notamment le degré d'immunosuppression des sujets qui conditionne la capacité de ces derniers à se défendre contre le CMV. Les résultats de l'antigénémie doivent donc toujours être resitués dans leurs contextes cliniques pour aboutir à une décision thérapeutique.

Si le nombre de cellules positives en antigénémie ne semble pas être corrélé à la gravité de la maladie, la quantification de l'antigénémie présente toutefois un intérêt pour le suivi des patients sous traitement.



Comme il a été décrit (VAN DEN BERG, 1992) nous avons pu observer que chez la plupart des patients, l'amélioration clinique apparaissait dans les premiers jours suivant la mise en place de la thérapeutique curative par le ganciclovir et s'accompagnait d'une diminution progressive du nombre de cellules positives.

L'antigénémie s'est négativée complètement (sujets n°3, 10, 11, 14), est restée positive pendant toute la durée du suivi (sujets n°5 et 9) ou s'est repositivée après arrêt du traitement (sujets n°4, 7, 12, 13). La persistance de l'antigénémie a été accompagnée pour le sujet n°9 d'une réapparition des signes cliniques associée à une remontée des taux d'antigénémie. Le sujet a reçu une deuxième cure de ganciclovir. Nous pouvons donc parler de rechute qui aurait peut-être pu être prévenue par un traitement initial plus prolongé jusqu'à négativation de l'antigénémie. Cependant, l'autre sujet (n°5) qui comme lui avait encore une forte antigénémie à l'arrêt du traitement n'a pas rechuté. Chez les 4 malades qui se sont repositivés après arrêt du traitement, la rechute ne peut-être envisagée puisque tous sont restés asymptomatiques.

L'intérêt majeur de l'antigénémie réside dans sa très forte VPN liée à sa très grande sensibilité permettant pour certains (THE, 1992) d'exclure le diagnostic d'infections à CMV devant une clinique suspecte, si le résultat de l'antigénémie est négatif et de faciliter le diagnostic différentiel avec d'autres pathologies comme le rejet de greffe qui peut présenter des signes cliniques similaires. Toutefois ceci est controversé par d'autres (LANDRY, 1993). Un résultat positif en antigénémie permet au clinicien d'être plus vigilant et de mettre en place une thérapeutique très rapidement dès que les premiers signes cliniques apparaissent. L'antigénémie permet de suivre l'efficacité du traitement en observant la diminution graduelle de la positivité, mais ni la réponse initiale (nombre de cellules positives en antigénémie avant traitement), ni la persistance de l'antigénémie après interruption de la thérapeutique, ne semblent suffisants pour prédire du risque de rechute. Ceci est particulier à la transplantation rénale et ces notions sont à redéfinir dans les autres types de greffe: il semble en effet que pour une greffe de moelle osseuse, les niveaux élevés d'antigénémie initiaux ainsi que les persistances sous traitement soient corrélés à un grand risque de rechute (THE, 1992). D'autres facteurs seraient cependant plus prédictifs d'une rechute, notamment des taux faibles de lymphocytes CD8+ activés (VAN DEN BERG, 1993).

Une des perspectives pour le laboratoire, pourrait être une recherche de l'antigénémie sur d'autres cellules sanguines en particulier sur les cellules mononucléées. Cette détection permettrait peut-être d'augmenter la prédictivité de la maladie par rapport à la technique classique effectuée sur les polynucléaires.

### **3. APPORT DE LA PCR**

#### **3. 1. Discussion des méthodes**

##### **3. 1. 1. Choix d'une technique de lyse**

Nous avons choisi de travailler sur le surnageant de centrifugation obtenu après chauffage 10 mn à 94°C de la suspension cellulaire récoltée après que les polynucléaires aient été repris par du PBS à raison de 100 ul pour 1 million de cellules. Cette technique de lyse présente de nombreux avantages par rapport à l'extraction de l'ADN plus classiquement utilisée en biologie moléculaire. Elle a été recommandée par de nombreux auteurs pour la détection du CMV (ROWLEY, 1991; LANDINI, 1991) car l'amplification directe du produit de lyse permet d'une part de réduire le risque de contamination en limitant le nombre de manipulations et d'autre part, de réduire le temps nécessaire aux étapes de la PCR rendant ainsi cette technique éventuellement compatible avec un diagnostic d'urgence.

##### **3. 1. 2. Choix des amorces**

Les amorces utilisées dans la réaction se situent dans le 4ème exon du gène IE1 du CMV. Ce choix a été guidé par un travail antérieur effectué au laboratoire de Virologie de Grenoble (GEORGESCU, 1992). Le gène IE1 est bien conservé parmi les différentes souches de CMV et sans homologie avec le génome cellulaire ou celui des autres Herpes virus ce qui garantit la sensibilité et la spécificité de la détection.

Le fait que la PCR n'ait omis aucun patient virémique prouve que les séquences amplifiées correspondent à un fragment d'ADN bien conservé selon les souches.

#### **3. 2. Discussion des résultats**

L'étude de nos résultats prouve que la PCR permet de détecter l'infection à CMV avec une grande précocité par rapport aux signes cliniques (en moyenne 10 jours avant, soit 1 semaine avant l'antigénémie ce qui est classiquement retrouvé chez tous les auteurs (VAN DORP, 1992; KIDD, 1993). Au niveau individuel, la PCR s'est positivée 10 fois avant l'antigénémie et 6 fois en même temps que l'antigénémie si le suivi de ces sujets avait été plus régulier, il est probable qu'une ADNémie CMV aurait été mise en évidence de façon antérieure à l'antigénémie.

La PCR se révèle être très sensible puisqu'elle nous donne 43% de prélèvements positifs (80/185) contre 24% en antigénémie et tout prélèvement positif en antigénémie a toujours été positif en PCR. Sa sensibilité est estimée dans la littérature entre 90 et 100% (THE, 1992) : elle est donc supérieure à celle de l'antigénémie.

Chez certains patients, une PCR a été retrouvée positive sur plusieurs échantillons alors que la recherche de l'antigénémie est constamment restée négative (Sujets n°1, 8 et 21).

- Pour le sujet n°21, il est fort probable que si le suivi avait été plus régulier, une antigénémie positive aurait pu être retrouvée entre S4 et S8. L'existence d'une réactivation sérologique prouve bien qu'il ne s'agit pas d'un faux positif.

- Si le sujet n°8 qui a été traité, mais pour qui il existe une incertitude quant à la réalité de la maladie, a réellement fait une maladie à CMV, l'antigénémie est alors en défaut par rapport à la PCR. Si la clinique observée était sans lien avec le CMV, il s'agit alors probablement de la détection d'un CMV latent qui se réactive à bas bruit et que notre PCR détecte.

- Pour le sujet n°1, la positivité de la PCR est beaucoup plus délicate à expliquer. L'hypothèse d'une contamination est peu probable du fait que cette positivité est observée sur deux prélèvements différents, traités au cours de manipulations distinctes. L'hypothèse d'un faux séronégatif qui se réactive à bas bruit est la plus probable. En effet, BEVAN, 1991 en détectant l'ADN CMV dans les cellules mononucléées du sang de donneurs bien portants a révélé que 10 à 30% des individus séronégatifs étaient des infectés latents porteurs de génomes CMV.

L'analyse des valeurs prédictives positives et négatives montre que cette dernière présente la plus forte VPN : 100% (3/3) mais que par contre du fait de sa grande sensibilité sa VPP qui est de 58% est inférieure à celle des autres techniques. Elles sont estimées par KIDD, 1993 respectivement à 94% et 62%. La PCR apparait donc comme un nouvel outil puissant pour la détection des infections à CMV chez les sujets immunodéprimés, mais sa signification clinique est réduite. La détection d'une ADNémie seule, semble ne jamais être associée à la présence de signes cliniques (ZIPETO, 1992). Ainsi, la PCR permet de formuler presque sans risque, un diagnostic d'exclusion de l'infection à CMV quand elle est négative, mais par contre sa positivité ne permet pas de prédire du risque de maladie.

Bien que de nombreux auteurs aient cherché à mettre au point une technique de dosage semi-quantitative, sans qu'aujourd'hui aucun d'eux n'y soit réellement parvenu, nous avons essayé dans cette étude de comparer pour chaque prélèvement l'intensité du signal à celle de témoins inclus dans chaque série correspondant à 5, 50 et 500 copies

de l'ADN. Il apparaît qu'au sein d'une même série, il est possible d'estimer l'intensité par rapport à celle de la gamme et de rendre un résultat semi-quantitatif: +, ++, +++. Cependant, l'intensité d'un même échantillon passé dans des séries différentes est variable : la reproductibilité inter-essai est donc mauvaise ce qui ne permet pas par exemple chez un sujet traité de suivre la décroissance du signal pour juger de l'efficacité de la thérapeutique . Dans notre travail, une semi-quantification a été possible du fait que les échantillons d'un même patient ont été passés le plus souvent au sein d'une même série de façon rétrospective, mais ceci ne peut se concevoir si l'on veut appliquer la technique au suivi des sujets transplantés.

La recherche d'une ADNémie CMV par PCR pour le suivi des patients traités ne présente pas d'intérêt: contrairement à l'antigénémie, l'absence de quantification de l'ADN CMV par PCR ne nous permet pas de suivre la diminution graduelle de la charge virale et d'autre part, chez bon nombre de sujets (sujets n°4, n°9 et n°11), on peut observer la persistance prolongée de l'ADN et ceci en dépit d'une thérapie menée avec succès.

La PCR n'apporte pas d'avantages par rapport à l'antigénémie si ce n'est qu'elle permet de diagnostiquer l'infection de façon encore plus précoce. Quoi qu'il en soit, cette détection précoce ne justifie pas en l'absence de signes cliniques, l'instauration d'une thérapeutique antivirale curative car celle-ci présente encore aujourd'hui une toxicité trop importante. Il est possible que les nouvelles méthodologies PCR actuellement évaluées puissent cerner parmi les patients présentant une infection biologique à CMV, ceux qui présentent un haut risque de développer une maladie symptomatique et dans ce cas, le traitement de ces derniers de façon très précoce avant l'apparition des signes cliniques pourra présenter un intérêt. Cette approche thérapeutique est désignée par les anglo-saxons sous le terme de "preemptive therapy".

Les objectifs de recherche s'orientent pour la PCR dans trois directions différentes :

- La quantification du signal PCR pourrait aider au diagnostic d'une infection à CMV et à l'évaluation du risque de développer une maladie. Ainsi, DROUET, 1993 a décrit récemment une technique de PCR semi-quantitative qui consiste à ajouter à chaque échantillon avant amplification un étalon interne (gène de la  $\beta$  globine humaine). Il en déduit des degrés de positivité différents qui lui permettent de faire une estimation de la charge virale et de mieux cerner les patients présentant un haut risque de développer une maladie à CMV.

- La détection des ARNm par PCR réverse

Cette méthode consiste à mettre en évidence dans les cellules infectées des ARNm viraux tardifs. La grande sensibilité de la technique PCR classique rend parfois difficile la distinction entre une infection latente et une infection active. L'intérêt de cette nouvelle technique est de pouvoir différencier les deux, lorsque les transcrits mis en évidence sont de nature tardive puisqu'ils ne sont alors produits qu'au cours d'un cycle lytique complet. GOZLAN, 1992 a appliqué cette technique à la détection des ARNm viraux issus du gène tardif MCP qui code pour une protéine majeure de la capsid. Elle est capable de déceler une cellule infectée sur  $5 \cdot 10^5$ . Appliquée à la détection des ARNm leucocytaires, elle confirme l'existence d'une infection productive dans les leucocytes du sang périphérique lors des infections disséminées et semble être le marqueur le plus spécifique de la maladie viscérale (GOZLAN, 1992).

La sensibilité de la technique demande à être améliorée, mais cette dernière pourrait permettre d'identifier les patients présentant un haut risque de développer une infection symptomatique (BITSCH, 1993).

- Mise en évidence d'ADN CMV plasmatique (WOLF, 1993; BRYTTING, 1992). Cette technique est intéressante pour apporter la preuve d'une infection active puisqu'elle détecte des virions dans le sang. En effet, au cours de l'infection, le CMV se réplique dans les cellules endothéliales. Celles-ci sont retrouvées dans le sang périphérique lors des cas cliniques sévères. Elles expriment des antigènes tardifs et sont donc productives. Des ADN génomiques libérés dans le plasma peuvent ainsi être détectés. Les potentialités de cette technique restent encore à déterminer.

Pour WOLF, 1993 l'ADN viral sérique serait un marqueur précoce de la maladie à CMV et pourrait apporter une aide précieuse dans le suivi des patients transplantés

#### **4. COMPARAISON DES DEUX TECHNIQUES PAR RAPPORT A LA CULTURE COURTE**

La comparaison de l'antigénémie et de la PCR par rapport à la culture courte, révèle donc :

- une plus grande précocité si l'on regarde le délai de positivité par rapport aux premiers signes cliniques. Cela est irréfutable pour la PCR; par contre, pour l'antigénémie nous n'avons pas pu le mettre en évidence. La littérature décrit une précocité de l'antigénémie par rapport à la culture de 3 à 9 jours (THE, 1992; VAN DEN BERG, 1990; VAN DER BIG, 1989). Au cours de notre étude, la première culture positive a été obtenue en même temps que la première antigénémie. Cette

discordance nécessiterait une confirmation sur un plus grand nombre de sujets (dans notre étude, 6 sujets seulement ont eu des cultures positives).

- une plus grande sensibilité : les pourcentages de positivité étant respectivement de 43%, 24% et 6% pour la PCR, l'antigénémie et la culture. La spécificité reste excellente pour l'antigénémie : l'utilisation des différentes techniques en parallèle permet de confirmer que les prélèvements positifs en antigénémie mais négatifs en culture ne sont pas de faux positifs mais qu'ils correspondent bien à de véritables infections biologiques. Par contre, la spécificité pourrait être plus faible pour la PCR. Il existe en effet chez certains sujets des prélèvements retrouvés positifs en PCR sans être accompagnés ni d'antigénémie ni de culture positives à aucun moment du suivi : la signification de ces PCR positives isolément reste à déterminer.

- une meilleure VPN par rapport à celle de la culture (37%) qui a par contre une VPP supérieure (83%). Toutefois, il apparaît que par rapport à la littérature, la VPN de notre culture est faible : ERICE, 1992, obtenait pour une culture rapide utilisant l'inoculation de la fraction de polynucléaires suivie d'une centrifugation et d'un marquage par un Acmc anti IEA une VPP de 73% et une VPN de 93%. La mauvaise VPN de notre culture est liée à son manque de précocité. Chez bon nombre de sujets, la mise en place précoce d'une thérapeutique a pu empêcher l'obtention de cultures positives. Ceci nous pose le problème de l'optimisation de notre technique de culture notamment par centrifugation et révélation par un Acmc, nous permettant éventuellement d'obtenir des résultats similaires à ceux de ERICE.

- une plus grande persistance de la positivité sous traitement. Grâce à la quantification de l'antigénémie, le suivi des sujets traités est possible. La culture au contraire se négative très rapidement : elle n'a jamais été positive sous traitement. Contrairement à l'antigénémie, elle ne permet donc pas d'assurer le suivi des patients traités.

## **5. PLACE DE LA SEROLOGIE**

La sérologie prise isolément, semble n'avoir plus aujourd'hui qu'un rôle mineur pour le diagnostic d'une infection à CMV.

- Son délai de positivité est long : la réponse sérologique, quand elle a eu lieu, a suivi la première antigénémie dans un délai de 1 semaine à 1 mois (1 à 2 semaines pour 4 sujets, 2 à 3 semaines pour 1 sujet, plus de 1 mois pour 3 sujets et dans un intervalle incertain de 1 semaine à 1 mois pour 5 sujets du fait de l'absence de suivi des sujets séropositifs entre S4 et S8 et entre S8 et S12). Elle a lieu classiquement pour les différents auteurs 1 à 2 semaines après la première antigénémie (THE, 1990; THE, 1992 ; VAN DER BIJ, 1989; ).

- La réactivation des patients séropositifs avant la greffe apparaît de façon inconstante et cela plus particulièrement chez les sujets malades . En effet, parmi les sujets symptomatiques, 50% (4/8) ont développé une réactivation sérologique, alors que celle-ci est apparue chez 100% (7/7) des infections biologiques asymptomatiques (tableau 8). Ceci confirme les hypothèses de VAN DER BIJ, 1989 qui montre une corrélation entre la charge virale, la réponse sérologique et la gravité de la maladie. Les patients ayant une réponse sérologique rapide et importante ont une charge virale plus faible et des manifestations cliniques moindres que ceux qui ont une réponse sérologique faible ou absente et une forte charge virale.

Si la sérologie n'a plus aujourd'hui d'intérêt pour le diagnostic d'une infection à CMV chez les sujets transplantés face aux nouvelles techniques diagnostiques, il semble qu'elle pourrait fournir des informations sur le pronostic des patients au cours du suivi. En effet chez les patients présentant une maladie à CMV, l'absence de réponse anticorps semble être de mauvais pronostic et devrait peut-être inciter le clinicien à une surveillance accrue de ces sujets, pour prévenir les formes sévères (VAN DEN BERG, 1990).

## **6. CONCLUSION**

L'analyse de nos résultats nous a conduit :

- à valider notre technique d'antigénémie et à l'utiliser depuis en semi-routine chez les sujets transplantés quel que soit le type de greffe. Son intérêt semble encore accru notamment pour les greffes médullaires où l'immunodépression plus profonde que pour les greffes rénales justifie encore plus le recours à des techniques précoces et quantifiables.

- à abandonner aujourd'hui la technique PCR qui n'est pas adaptée pour le diagnostic et le suivi de l'infection à CMV en transplantation rénale. Cet aspect pourra peut-être un jour être modifié avec l'apparition des nouvelles méthodologies PCR. Au cours de notre étude, la PCR nous a permis de valider les résultats d'antigénémie positifs et de s'assurer qu'il ne s'agissait pas de faux positifs.

CONCLUSION



## CONCLUSION

Aujourd'hui, l'infection à CMV demeure un problème préoccupant en transplantation rénale. Dans ce travail, nous avons voulu, au cours d'une étude prospective réalisée sur 25 greffés rénaux, évaluer l'apport de l'antigénémie et de la PCR dans le diagnostic de l'infection en les comparant à la culture et à la sérologie plus classiquement utilisées. Nous avons pu montrer que l'antigénémie et la PCR étaient des techniques plus sensibles et plus précoces que les techniques habituelles.

En pratique :

-l'antigénémie est une méthode rapide, utilisable en diagnostic d'urgence. Elle a l'avantage d'être quantifiable, permettant ainsi d'évaluer l'efficacité d'une thérapeutique antivirale, ce qui nous conduit à la recommander pour le diagnostic et la surveillance des sujets transplantés.

-la PCR par contre, longue, coûteuse est actuellement peu envisageable pour un diagnostic en routine. De ce fait, malgré sa grande sensibilité, elle n'a pas encore sa place en systématique dans le suivi d'un transplanté rénal.

Il est possible cependant que les nouvelles méthodologies PCR qui sont actuellement en cours de développement puissent modifier cet aspect.

Au niveau diagnostic clinique, aucune de ces deux techniques ne nous a permis de cerner parmi les patients présentant une infection biologique, ceux qui deviendraient symptomatiques. D'autres études devraient pouvoir déterminer le marqueur virologique le plus prédictif de la survenue d'une maladie à CMV et permettre ainsi de traiter les patients de façon très précoce avant les premiers signes cliniques.

L'antigénémie appliquée à la fraction des cellules mononucléées, ainsi que les nouvelles méthodologies PCR (PCR plasmatique, PCR sur les ARNm, quantification de la PCR) sont des perspectives d'études qui pourraient apporter prochainement une réponse.

BIBLIOGRAPHIE

## BIBLIOGRAPHIE

**Akrigg A., Wilkinson G., Oram J.** : The structure of the major immediate early gene of HCMV strain AD169. *Virus research.*, 1985, 2, 107-121.

**Alpert G., Mazon M. C., Colimon R., Plotkin S.** : Rapid detection of human cytomegalovirus in the urine of humans. *J. Inf. Dis.*, 1985, 152, 631-633.

**Andreu G.** : Dépistage sérologique des donneurs de sang séronégatifs pour le cytomegalovirus. *Med. Mal. Inf.*, 1988, n°special, 27-32.

**Bailey T. C., Ettinger N. A., Storch G. A., Trulock E. P., Hanto D. W., Dunagan W. C., Jendrisak M. D., Mc Cullough C. S., Kenzora J. L., Powderly W. G.** : Failure of high-dose oral Acyclovir with or without immune globulin to prevent primary cytomegalovirus disease in recipients of solid organ transplants. *Am. J. Med.*, 1993, 95, 273-278 .

**Balfour H. H., Chace B. A., Stalpleton J. T., Simmons R. L., Fryd D. S.** : A randomized placebo-controlled trial of oral acyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in recipients of renal allograft. *N. Engl. J. Med.*, 1989, 320, 1381-1387.

**Balfour H. H.** : Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. *Rev. Inf. Dis.*, 1990, 12, S849-S860.

**Beck S., Barel B. G.** : Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-1 antigens. *Nature.*, 1988, 331, 269-272.

**Bevan I. S., Daw R. A., Day P. J. R., Ala F. A., Walker M. R.** : Polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus infection in a blood donor population. *Br. J. Haematol.*, 1991, 78, 94-99.

**Bitsch A., Kirchner H., Reinhard D., Hoyer J., Fricke L., Steinhoff J., Sack K., Bein G.** : The long persistence of CMV DNA in the blood of renal transplant patients after recovery from CMV infection. *Transplantation*, 1993 a , 56, 108-113.

**Bitsch A., Kirchner H., Dupke R., Bein G.** : Cytomegalovirus transcripts in peripheral blood leukocytes of actively infected transplant patients detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Inf. Dis.*, 1993 b, 167, 740-743.

**Blanco G., Josien R., Douillard D., Bignon J. D., Cesbron A., Souillou J. P.** : The influence of HLA A-B-DR matching on cytomegalovirus disease after renal transplantation. Evidence that HLA-DR7-matched recipients are more susceptible to cytomegalovirus disease. *Transpl.*, 1992, 54, 871-874.

**Boivin G., Erice A., Crane D. D., Dunn D. L., Balfour H. H.** : Ganciclovir susceptibilities of cytomegalovirus (CMV) isolates from solid organ transplant recipients with CMV viremia after antiviral prophylaxis. *J. Inf. Dis.*, 1993, 168, 332-335.

**Boland G. J., De Gast G. C., Hené R. J., Jambroes G., Donckerwolcke R., The T. H., Mudde G. C.** : Early detection of active cytomegalovirus (CMV) infection after heart and kidney transplantation by testing for immediate early antigenemia and influence of cellular immunity on the occurrence of CMV infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 2069-2075.

**Boland G. J., De Weger R. A., Tilanus M. G. J., Ververs C., Bosboom-Kalsbeek K., De Gast G. C.** : Detection of cytomegalovirus in granulocytes by polymerase chain reaction compared with CMV antigen test. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 1763-1767.

**Brytting M., Xu W., Wahren B., Sundqvist V. A.** : Cytomegalovirus DNA detection in sera from patients with active cytomegalovirus infections. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 1937-1941.

**Burns K.D., Johnson-Whittaker L., Couture R. A., Eidus L., Garber G.** Successful treatment of renal allograft rejection in the presence of cytomegalovirus disease. *Am. J. Nephrol.*, 1990, 10, 162-166.

**Caro V., Pérol Y.** : La détection immunocytochimique de la phosphoprotéine 65 kDA du cytomegalovirus humain dans les noyaux des polynucléaires du sang périphérique : un marqueur de réactivation et de dissémination. *Médecine/Science.*, 1993, 9, 781-787.

**Chou S., Scott K. M.** : Latex agglutination and enzyme-linked immunosorbent assays for cytomegalovirus serologic screening of transplant donors and recipients. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26, 2116-2119.

**Chou S.** : Effect of interstrain variation on diagnostic DNA amplification of the cytomegalovirus major immediate-early gene region. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 2307-2310.

**Colimon R., Somogyi T., Bertrand C., Michelson S.** : Demonstration of the colinearity of Human Cytomegalovirus genomes and construction of restriction maps of unknown isolates using cloned susgenomic fragments. *J. Gen. Virol.*, 1985, 66, 2183-2198.

**Dankner W. M., Mc Cutchan J. A., Richman D. D., Hirata K., Spector S. A.** : Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by in situ hybridization. *J. Inf. Dis.*, 1990, 161, 31-36.

**Degirolami P. C., Dakos J., Eichelberger K.** : Rapid detection of Cytomegalovirus in clinical specimens by immunofluorescent staining of shell vial cultures. *A. J. C. P.*, 1988, 89, 528-532.

**De Koning J., Van Dorp W. T., Van Es L. A., Van't Wout J. W., Van der Woude F. J.** : Ganciclovir effectively treats cytomegalovirus disease after solid organ transplantation, even during rejection treatment. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1992, 7, 350-356.

**Drew W. L.** : Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis.*, 1988, 13, S468-S476.

**Drew W. L., Miner R. C., Busch D. F., Follansbee S. E., Gullett J., Mehalko S. G., Gordon S. M., Owen W. F., Matthews T. R., Buhles W. C., De Armond B.** : Prevalence of resistance in patients receiving ganciclovir for serious cytomegalovirus infection. *J. Inf. Dis.*, 1991, 163, 716-719.

**Drouet E., Michelson S., Denoyel G., Colimon R.** : Polymerase chain reaction detection of human cytomegalovirus in over 2000 blood specimens correlated with virus isolation and related to urinary virus excretion. *J. Virol. Meth.*, 1993, 45, 259-276.

**Dunn D. L., Mayoral J. L., Gillingham K. J., Loeffler C. M., Brayman K. L., Kramer M. A., Erice A., Balfour H. H., Fletcher C. V., Bolman III R. M., Matas A. J., Payne W. D., Sutherland D. E. R., Najarian J. S.** : Treatment of invasive cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients with ganciclovir. *Transplantation.*, 1991, 51, 98-106.

**Erice A., Holm M. A., Gill P. C., Henry S., Dirksen C. L., Dunn D. L., Hillam R.P., Balfour H. H.** : Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay is more sensitive than shell vial cultures for rapid detection of CMV in polymorphonuclear blood leukocytes. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 2822-2825.

**Freymuth F., Petitjean J., Hurault de Ligny B., Troussard X., Ryckelynck J.P., Leporrier M., Ballet J. J., Galateau F.** : Antigène cytomégalique leucocytaire. Nouvelle méthode diagnostique de l'infection à CMV après transplantation. *Presse.Med.*, 1992, 21, 1710-1713.

**Freymuth F., Petitjean J., Eugene-Ruelland G., Daon F., Galateau F.** : Infection à Cytomégalovirus après transplantation : Diagnostic virologique, traitement antiviral. *Path. Biol.*, 1993, 41, n°8, 724-730.

**Georgescu M. M.** : Cytomegalovirus et cellules sanguines : Identification par "nested PCR" et séquençage d'un gène régulateur. *DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université Joseph-fourier.Grenoble*, 1991-1992.

**Gerna G., Revello M. G., Percivalle E., Zavattoni M., Parea M., Battaglia M.** : Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 2681-2688.

**Gerna G., Zipeto D., Parea M., Revello M. G., Silini E., Percivalle E., Zavattoni M., Grossi P., Milanese G.** : Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J. Infect. Dis.*, 1991, 164, 488-498.

**Gerna G., Revello M.G., Percivalle E., Morini F.** : Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotéin (pp65) for optimal quantification of human cytomegalovirus antigenemia. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 1232-1237.

**Gleaves C. A., Smith T. F., Shuster E. A., Pearson G. R.** : Rapid detection of Cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J. Clin. Microbiol.*, 1984, 19, 917-919.

**Gleaves C. A., Meyers J. D.** : Rapid detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage specimens from marrow transplant patients: evaluation of a direct fluorescein-conjugated monoclonal antibody reagent. *J. Virol. Meth.*, 1989 a, 26, 345-350.

**Gleaves C. A., Myerson D., Bowden R. A., Hackman R. C., Meyers J. D.** : Direct detection of cytomegalovirus from bronchoalveolar lavage samples by using a rapid in situ DNA hybridization assay. *J. Clin. Microb.*, 1989 b, 27, 2429-2432.

**Gozlan J., Caburet F., Tancrede C., Petit J. C.** : A reverse polymerase chain reaction method for detection of human cytomegalovirus late transcripts in cell infected in vitro. *J. Virol. Meth.*, 1992, 40, 1-10.

**Grefte J. M. N., Van der Giessen M., Van der Gun B. T. F., Van Son W. J., The T. H.** : The predominant viral antigen present in peripheral blood leucocytes during an active cytomegalovirus infection is the lower matrix protein pp65. *Prog. Cytomegalovirus Res.*, 1991, ICS 978, 233-236.

**Grefte A., Van der Giessen M., Van Son W., The T. H.** : Circulating cytomegalovirus infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J. Inf. Dis.*, 1993, 167, 270-277.

**Grundy J. E., Lui S. F., Super M., Berry N. J., Sweny P., Fernando O. N., Moorhead J., Griffiths P. D.** : Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients : reinfection with donor virus rather than reactivation of recipients virus. *Lancet.*, 1988, 2, 132-135.

**Grundy J. E.**: Virologic and pathogenetic aspects of Cytomegalovirus infection. *Rev. Inf. Dis.*, 1990, 12, S711-S719.

**Halwachs G., Zach R., Pogglitsch H., Holzer H., Tiran A., Iberer F., Wasler A., Tscheliessnigg H. P., Lanzer G., Fölsch B., Wilders-Truschnig M.** : A rapid immunocytochemical assay for CMV detection in peripheral blood of organ-transplanted patients in clinical practice. *Transplantation.*, 1993, 56, 338-342.

**Harbison M. A., De Girolami P. C., Jenkins R. L., Hammer S. M.** : Ganciclovir therapy of severe cytomegalovirus infection in solid -organ transplant recipients. *Transplantation.*, 1988, 46, 82-88. 🍏

**Hibbert P. L., Tolkoff-Rubin N. E., Cosimi A. B., Schooley R. T., Isaacson D., Doran M., Delvecchio A., Delmonico F. L., Auchincloss H., Rubin R. H.** : Symptomatic cytomegalovirus disease in the cytomegalovirus antibody-seropositive renal transplant recipient treated with OKT3. *Transplantation.*, 1992, 53, 68-72.

**Ho M.** : Epidemiology of cytomegalovirus infection. *J. Inf. Dis.*, 1990, 12, S701-S710.

**Jiwa N. M., Van Gemert G. W., Raap A. K., Van der Rijke F. M., Mulder A., Lens P. F., Salimans M. M. M., Zwaan F. E., Van Dorp W., Van der Ploeg M.** : Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplantation.*, 1989, 48, 72-76.

**Kidd I. M., Fox J. C., Pillay D., Charman H., Griffiths P. D., Emery V. C.** : Provision of prognostic information in immunocompromised patients by routine application of the polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation.*, 1993, 56, 867-871.

**Kilpatrick B. A., Huang E. S., Pagano J. S.** : Analysis of CMV genomes with restriction endonuclease, Hind III and Eco RI. *J. Virol.*, 1976, 18, 1095-1105..

**Kraat Y. J., Christiaans M. H. L., Nieman F. H. M., Van den Berg-Loonen, Van Hoff J. P., Bruggeman C. A.** : Increased frequency of CMV infection in HLA-DR7 matched renal allograft recipients. *Lancet.*, 1993, 341, 494-495.

**Landini M. P., Rossier R., Schitz H.** : Antibodies to human cytomegalovirus structural polypeptides during primary infection. *J. Virol. Res.*, 1988, 22, 309-317.

**Landini M. P.**: Diagnostic value of the polymerase chain reaction for cytomegalovirus viremia detection in bone marrow transplant recipients. *Progress in Cytomegalovirus research. Third International Cytomegalovirus Workshop, Bologna, 11-14 June 1991.*

**Landry M. L., Ferguson D.** : Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 2851-2856.

**Legendre Ch.** : Stratégie de la prévention de l'infection à cytomégalo virus en transplantation rénale. *Viral.*, 1993, 1, 19-23.

**Littler E., Stuart A. D., Chee M. S.** : Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature.*, 1992, 358, 160-162.

**Mac Carthy J. M., Karim M. A., Krueger H., Keown P. A.** : The cost impact of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients., *Transplantation.*, 1993, 555, 1277-1282.

**Mazeron M. C., Bertrand C., Colimon R., Perol Y.** : La détection précoce du Cytomegalovirus à partir des produits pathologiques et des excréats. *Ann. Inter. Med.*, 1987, 138, 328-330.

**Mazeron M. C., Jahn G., Plachter B.** : Monoclonal antibody E-13 (M-810) to human cytomegalovirus recognizes an epitope encoded by exon 2 of the major immediate early gene. *J. Gen. Virol.*, 1992, 73, 2699-2703.

**Mazeron M. C., Alain-Albertini S.** : L'infection à cytomégalo virus humain: Méthodes nouvelles du diagnostic virologique. *Path. Biol.*, 1993, 41, 487-494.

**Mazzulli T., Rubin R. H., Ferraro M. J., D'aquila R. T., Doveikis S. A., Smith B. R., The T. H., Hirsch M. S.** : Cytomegalovirus antigenemia: Clinical correlations in transplant recipients and in persons with AIDS. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 2824-2827.

**Metselaar H. J., Weimar W.** : Cytomegalovirus infection and renal transplantation. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1989, 23, 37-47.

**Nicol D. L., Mac Donald A. S., Belitsky P., Lee S., Cohen A. D., Bitter-Suermann H., Lowen J., Whalen A.** : Reduction by combination prophylactic therapy with CMV hyperimmune globulin and acyclovir of the risk of primary CMV disease in renal transplant recipients. *Transplantation.*, 1993, 55, 841-846.

**Nielson S. L., Sorensen I., Andersen H. K.** : Kinetics of specific immunoglobulins M, E, A, and G in congenital, primary and secondary cytomegalovirus infection studied by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26, 654-661.

**Olive D. M., Simsek M., Al-Mufti S.** : Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, 27, 1238-1242.

**Pakkala S., Lautenschlager I., Hirvonen M., Ahonen J., Häyry P.** : A randomized trial with two anti-CMV hyperimmune globulins in the prevention of CMV disease in CMV-negative renal transplant patients. *Clin. Transplantation*, 1992a, 6, 336-340.

- Pakkala S., Salmela K.** : Anti-CMV hyperimmune globulin prophylaxis does not prevent CMV disease in CMV-negative renal transplant patients. *Transplant-proc.*, 1992b, 24, 283-284.
- Percivalle E., Revello M. G., Vago L., Morini F., Gerna G.**: Circulating Endothelial giant cells permissive for Human Cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J. Clin. Invest.*, 1993, 92, 663-670.
- Perol Y.** : Comment reconnaître l'infection à cytomégalovirus pour prévenir sa pathologie chez le receveur de greffe tissulaire? *Viral.*, 1993, 3, 15-22.
- Plotkin S., Starr S. E., Friedman H. M., Brayman K., Harris S., Jackson S., Tustin N. B., Grossman R., Dafoe D., Barker C.** : Effect of town life vaccine on cytomegalovirus disease after renal transplant. A controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, 1991, 114, 525-531.
- Porter-Jordan K., Rosenberg E., Keiser J., Gross J., Ross A., Nasim S., Garret C.** : Nested PCR assay for the detection of CMV overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. *J. Med., Vir.*, 1990, 30, 85-91.
- Pouteil-Noble C., Ecochard R., Landrison G. Donia-Maged A., Tardy J. C., Bosshard S., Colon S., Betuel H., Aymard M., Touraine J. L.** : Cytomegalovirus infection-an etiological factor for rejection? *Transplantation.*, 1993, 55, 851-857.
- Revello M. G., Zavattoni M., Percivalle E., Grossi P., Gerna G.** : Correlation between immunofluorescent detection of human cytomegalovirus immediate early antigens in polymorphonuclear leukocytes and viremia. *J. Inf. Dis.*, 1989 a, 160, 159-160.
- Revello M. G., Percivalle E., Zavattoni M., Parea M., Grossi P., Gerna G.** : Detection of human cytomegalovirus immediate early antigen in leukocytes as a marker of viremia in immunocompromised patients. *J. Med. Virol.*, 1989 b, 29, 88-93.
- Richardson W. P., Colvin R. B., Cheeseman S. H., Tolkoff-Rubin N. E., Herrin J. T., Cosimi A. B., Collins A. B., Hirsch M. S., Mc Cluskey R. T., Russel P. S., Rubin R. H.** : Glomerulopathy associated with cytomegalovirus viremia in renal allograft. *N. Engl. J. Med.*, 1981, 305, 57-63.
- Rocha E., Campos H. H., Rouzioux C., Le Bihan C., Landais P., Legendre C., Kreis H.**: Cytomegalovirus infections after kidney transplantation : Identical risk whether donor or recipient is the virus carrier. *Transpl. Proc.*, 1991, 23, 2638-2640.
- Roizman B.** : The family of herpesviridae : genome description, taxonomy and classification. *In Herpes viruses vol. 1 Plenum Press NY.*, 1982, 1-23.
- Rondeau E., Peraldi M. N., Kanfer A., Sraer J. D.**: Le traitement des infections à cytomégalovirus chez le transplanté rénal. *Néphrologie*, 1991, 12, 189-192.
- Rondeau E., Bourgeon B., Peraldi M. N., Lang P., Buisson C., Schulte K. M., Weill B., Sraer J. D.** : Prophylaxie des infections à cytomégalovirus par le ganciclovir chez les receveurs de greffe de rein. *Presse. med.*, 1992, 21, 1979-1980.



**Rowley A.H., Wolinsky S.M., Sambol S.P., Barkholt L., Ehrnst A., Andersson J.P.** : Rapid detection of cytomegalovirus DNA and RNA in blood of renal transplant patients by in vitro enzymatic amplification. *Transplantation*, 1991, 51, 1028-1033.

**Rubin R. H.** : Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev. Inf. Dis.*, 1990, 12, S754-S766.

**Sarov I., Friedman M., Levy E.** : Detection of recurrent cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *J. Infect. Dis.*, 1984, 149-277.

**Schmidt G. M., Kovacs A., Zaia J. A., Horak D. A., Blume K. G. et coll.** : Ganciclovir / immunoglobulin combination therapy for the treatment of human cytomegalovirus-associated interstitial pneumonia in bone marrow allograft recipients. *Transplantation*, 1988, 46, 905-907.

**Schmidt G. M., Horak D. A., Niland J. C. et coll.** : A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogenic bone marrow transplants. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 324, 1005-1011.

**Schmidt C. A., Oettle H., Neuhaus P., Wiens M., Timm H., Wilborn F., Siegert W.** : Demonstration of cytomegalovirus by polymerase chain reaction after liver transplantation. *Transplantation.*, 1993, 56, 872-876.

**Schrier R. D., Nelson J. A., Oldstone M. B. A.** : Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science*, 1985, 230, 1048-1051.

**Shaw S B., Rasmussen R. D., Mac Donough S. H., Staprans S. I., Vacquier J. P., Spector D. H.** : Cell-related sequences in the DNA genome of human cytomegalovirus strain AD 169. *J. Gen. Virol.*, 1985, 55, 843-848.

**Sherlock C. H., Denegri J. F., Ashley R. L.** : Serological responses to cytomegalovirus during renal transplant rejection. *Transplantation*, 1991, 52, 272-275.

**Shibata D., Martin W. J., Appleman M. D., Causey D. M., Leedom J. M., Arnheim N.** : Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. dis.*, 1988, 1185-1192.

**Sing G. K., Ruscetti F. W.** : Preferential suppression of myelopoiesis in normal human bone marrow cells after in vitro challenge with human cytomegalovirus. *Blood*, 1990, 75, 1965-1973.

**Smiley M. L., Wlodaver C. G., Grossman R. A., Barker C. F., Perloff L. J., Tustin N. B., Starr S. E., Plotkin S. A., Friedman H. M.** : The role of pretransplant immunity in protection from cytomegalovirus disease following renal transplantation *Transplant.*, 1985, 40, 157-161.

**Snydman D. R.** : Cytomegalovirus immunoglobulins in the prevention and treatment of Cytomegalovirus disease. *Rev. Inf. Dis.*, 1990, 12, S839-S848.

**Snydman D. R., Rubin R. H., Werner B. G.** : New developments in Cytomegalovirus prevention and management. *Am. J. Kid. Dis.*, 1993, 21, 217-228.

**Spaete R. R.** : A recombinant subunit vaccine approach to HCMV vaccine development. *Transpl. Proc.*, 1991, 23, 3, 90-96.

**Spector S. A., Rua J. A., Spector D. H., Mac Millan R. M.:** Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization. *J. Inf. Dis.*, 1984, 150, 121-126.

**Stinski M. F. :** Cytomegalovirus and its replication. *Virology*, 2nd ed., 1990, Raven Press, Ltd., N. Y., chapter 69.

**Sullivan V., Talarico C. L., Stanat S. C., Davis M., Coen D. M., Biron K. K.:** A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* 1992, 358, 162-164.

**Taylor-Wiedeman J., Sissons J. G. P., Borysiewicz L. K., Sinclair J. H. :** Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.*, 1991, 72, 2059-2064.

**Taylor-Wiedeman J., Hayhurst G. P., Sissons J. G. P., Sinclair J. H.:** Polymorphonuclear cells are not sites of persistence of human cytomegalovirus in healthy individuals. *J. Gen. Virol.*, 1993, 74, 265-268.

**The T.H., Van der Bij W., Van der Berg A.P., Van der Giesen M., Weits J., Sprenger H. G., Van Son W. J. :** Cytomegalovirus antigenemia. *Rev. Infect. Dis.*, 1990, 12, S737-S744.

**The T. H., Van der Ploeg M., Van der Berg A. P., Vlieger A. M., Van der Giessen M., Van Son W. J. :** Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes-A review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation.*, 1992, 54, 193-198.

**Toorkey C. B., Carrigan D. R. :** Immunohistochemical detection of an immediate early antigen of human cytomegalovirus in normal tissues. *J. Inf. Dis.*, 1989, 160, 742-751.

**Van den Berg A.P., Van der Bij W., Van Son W. J., Anema J., Van der Giessen M., Schirm J., Tegzess A. M., The T. H. :** Cytomegalovirus antigenemia as a useful marker of symptomatic cytomegalovirus infection after renal transplantation-a report of 130 consecutive patients. *Transplantation.*, 1989, 48, 991-995.

**Van den Berg A. P., Van Son W. J., Jiwa N. M., Van der Bij, Schirm J., Van der Giessen M., The T. H. :** Recent advances in the diagnosis of active CMV infection after organ transplantation. *Transplant. Proc.*, 1990, 22, 226-228.

**Van den Berg A.P., Klompaker I.J., Haagsma E.B., Scholten-Sampson A., Bijleveld C. M. A., Van der Giessen M., Slooff M. J. H., The T. H. :** Antigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation. *J. Infect. Dis.*, 1991 a, 164, 265-270.

**Van den Berg A. P., Tegzess A. M., Scholten-Sampson A., Van der Giessen M., The T.H., Van Som W. J. :** Quo vadis? The clinical dilemma of simultaneous cytomegalovirus infection and steroid-resistant rejection. *Transplantation.*, 1991 b, 52, 1081-1083.

**Van den Berg A. P., Tegzess A. M., Scholten-Sampson A. and all :** Cytomegalovirus antigenemia is useful for monitoring antiviral therapy. *Transplant. Int.*, 1992, 5, 101.

**Van den Berg A. P., Van Son W. J., Haagsma E. B., Klompmaker I. J., Tegzess A. M., Schirm J., Dijkstra G., Van der Giessen M., Slooff M. J. H., The T. H.** : Prediction of recurrent cytomegalovirus disease after treatment with ganciclovir in solid-organ transplant recipients. *Transplantation*, 1993, 55, 847-851.

**Van der Bij W., Schirm J., Torensma R. et coll.** : Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26, 2531-2535.

**Van der Bij W., Van Son W. J., Van der Berg A. P., Tegzess A. M., Torensma R., The T. H.** : Cytomegalovirus antigenemia: rapid diagnosis and relationship with CMV-associated clinical syndromes in renal allograft recipients. *Transplant. Proc.*, 1989, 21, 2061-2064.

**Van Dorp W. T., Vlieger A., Jiwa N. M., Van Es L. A., Van der Ploeg M., Van Saase J. L. C. M., Van der Woude F. J.** : The polymerase chain reaction, a sensitive and rapid technique for detecting cytomegalovirus infection after renal transplantation. *Transplantation*, 1992, 54, 661-664.

**Van Dorp W. T., Van Wieringen A. M., Marselis-Jonges E., Bruggeman C. A., Daha M. R., Van Es L. A., Van der Woude F. J.** : Cytomegalovirus directly enhances MCH class 1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on cultured proximal tubular epithelial cells. *Transplantation*, 1993, 55, 1367-1371.

**Van Willebrand E., Pettersson E., Ahonen J., Häyry P.** : CMV infection, class II antigen expression, and human kidney allograft rejection. *Transplantation*, 1986, 42, 364.

**Wolf D. G., Spector S. A.** : Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma. *Transplantation*, 1993, 56, 330-334.

**Wu B. C., Dowling J. N., Ho m.** : Enhancement of mouse cytomegalovirus infection during host-versus-graft rejection. *Science*, 1975, 190, 56-58.

**Zipeto D., Revello M G., Silini E. et al.** : Development and clinical significance of a diagnostic assay based on the polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus DNA in blood samples from immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 527-530.

# ABBREVIATIONS

## **ABREVIATIONS**

**Acme** : anticorps monoclonal  
**ADN** : acide desoxyribonucléique  
**ARN** : acide ribonucléique  
**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité  
**CMV** : cytomégalovirus  
**EA** : early antigen  
**ECP** : effet cytopathogène  
**FEH** : fibroblaste embryonnaire humain  
**IEA** : immediate early antigen  
**IF** : immunofluorescence  
**IgG** : immunoglobuline G  
**IgM** : immunoglobuline M  
**IP** : immunoperoxydase  
**LA** : late antigen  
**LBA** : lavage broncho-alvéolaire  
**LCR** : liquide céphalo-rachidien  
**PCR** : polymerase chain reaction  
**VPN** : valeur prédictive négative  
**VPP** : valeur prédictive positive

TAMPONS ET  
SOLUTIONS

**TAMPONS ET SOLUTIONS**

<b>SSC 20X</b>	NaCl Citrate Na <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O qsp 1litre pH 7,0	175,3 g 88,23 g
<b>Tampon de pré-hybridation</b>	SSC Denhardt SDS	5X 5X 0,2%
<b>Tampon PNK 10X</b>	Tris pH 7,6 MgCl <sub>2</sub> DTT Spermidine HCl EDTA pH 8	0,5 M 0,1 M 50 mM 1mM 1mM
<b>Tampon PBS</b>	NaCl NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4	0,15 M 20 mM
<b>Tampon Taq Polymerase 10X</b>	KCl Tris pH 8,3 MgCl <sub>2</sub> Gélatine	500 mM 100 mM 15 mM 0,1%
<b>Tampon TBE</b>	Tris borate EDTA H <sub>2</sub> O qsp 1 litre pH 8,0	0,9 M 20 mM
<b>SSC 20X</b>	NaCl Citrate Na <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O qsp 1litre pH 7,0	175,3 g 88,23 g

CONCLUSIONS

Mémoire soutenu par M<sup>lle</sup> BISTHOUD Nathalie et M<sup>lle</sup> VONDUT Nathalie.

CONCLUSION

Aujourd'hui, l'infection à CMV demeure un problème préoccupant en transplantation rénale. Dans ce travail, nous avons voulu, au cours d'une étude prospective réalisée sur 25 greffés rénaux, évaluer l'apport de l'antigénémie et de la PCR dans le diagnostic de l'infection en les comparant à la culture et à la sérologie plus classiquement utilisées.

Nous avons pu montrer que l'antigénémie et la PCR étaient des techniques plus sensibles et plus précoces que les techniques habituelles.

En pratique :

-l'antigénémie est une méthode rapide, utilisable en diagnostic d'urgence. Elle a l'avantage d'être quantifiable, permettant ainsi d'évaluer l'efficacité d'une thérapeutique antivirale, ce qui nous conduit à la recommander pour la surveillance des sujets transplantés.

-la PCR par contre, longue, coûteuse est actuellement peu envisageable pour un diagnostic en routine. De ce fait, malgré sa grande sensibilité, elle n'a pas encore sa place en systématique dans le suivi d'un transplanté rénal.

Il est possible cependant que les nouvelles méthodologies PCR qui sont actuellement en cours de développement puissent modifier cet aspect.

Au niveau diagnostic clinique, aucune de ces deux techniques ne nous a permis de cerner parmi les patients présentant une infection biologique, ceux qui deviendraient symptomatiques. D'autres études devraient pouvoir déterminer le marqueur virologique le plus prédictif de la survenue d'une maladie à CMV et permettre ainsi de traiter les patients de façon très précoce avant les premiers signes cliniques.

L'antigénémie appliquée à la fraction des cellules mononucléées, ainsi que les nouvelles méthodologies PCR (PCR plasmatique, PCR sur les ARNm, quantification de la PCR) sont des perspectives d'études qui pourraient apporter prochainement une réponse.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

GRENOBLE, le 12 septembre 1994

Le Président de l'Université  
Joseph FOURIER

D. BLOCH

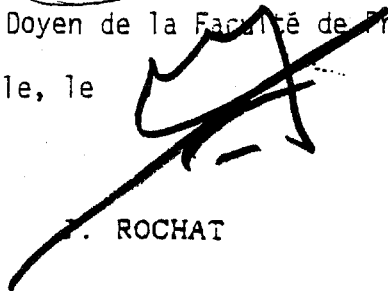


Le Président du Jury  
(Nom et signature)

P. Favre

Vu le Doyen de la Faculté de Pharmacie  
Grenoble, le

J. ROCHAT





CONCLUSIONS

Mémoire soutenu par M<sup>lle</sup> BUTHOUD Nathalie et M<sup>lle</sup> VONDUY Nathalie.

CONCLUSION

Aujourd'hui, l'infection à CMV demeure un problème préoccupant en transplantation rénale. Dans ce travail, nous avons voulu, au cours d'une étude prospective réalisée sur 25 greffés rénaux, évaluer l'apport de l'antigénémie et de la PCR dans le diagnostic de l'infection en les comparant à la culture et à la sérologie plus classiquement utilisées.

Nous avons pu montrer que l'antigénémie et la PCR étaient des techniques plus sensibles et plus précoces que les techniques habituelles.

En pratique :

-l'antigénémie est une méthode rapide, utilisable en diagnostic d'urgence. Elle a l'avantage d'être quantifiable, permettant ainsi d'évaluer l'efficacité d'une thérapeutique antivirale, ce qui nous conduit à la recommander pour la surveillance des sujets transplantés.

-la PCR par contre, longue, coûteuse est actuellement peu envisageable pour un diagnostic en routine. De ce fait, malgré sa grande sensibilité, elle n'a pas encore sa place en systématique dans le suivi d'un transplanté rénal.

Il est possible cependant que les nouvelles méthodologies PCR qui sont actuellement en cours de développement puissent modifier cet aspect.

Au niveau diagnostique clinique, aucune de ces deux techniques ne nous a permis de cerner parmi les patients présentant une infection biologique, ceux qui deviendraient symptomatiques. D'autres études devraient pouvoir déterminer le marqueur virologique le plus prédictif de la survenue d'une maladie à CMV et permettre ainsi de traiter les patients de façon très précoce avant les premiers signes cliniques.

L'antigénémie appliquée à la fraction des cellules mononucléées, ainsi que les nouvelles méthodologies PCR (PCR plasmatique, PCR sur les ARNm, quantification de la PCR) sont des perspectives d'études qui pourraient apporter prochainement une réponse.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

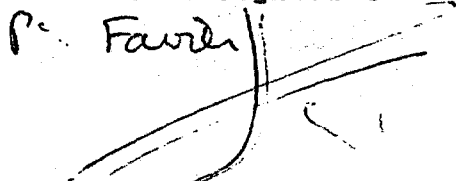
GRENOBLE, le 12 septembre 1994

Le Président de l'Université  
Joseph FOURIER

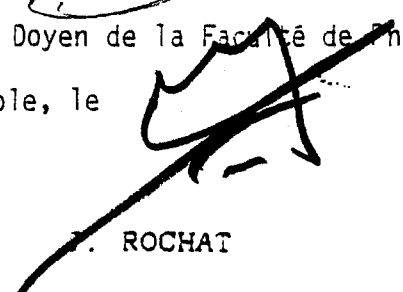
D. BLOCH



Le Président du Jury  
(Nom et signature)



Vu le Doyen de la Faculté de Pharmacie  
Grenoble, le



J. ROCHAT

<b>NOM Prénom</b>	<b>BUTHOD Nathalie</b> <b>TONDUT ep. THERIN Nathalie</b>
<b>TITRE DU MEMOIRE</b>	Apport de la PCR et de la détection de l'antigène pp65 pour le diagnostic des infections à Cytomégalovirus en transplantation rénale.
<b>NATURE DU MEMOIRE</b>	Mémoire de DES de Biologie Médicale tenant lieu de thèse de Docteur en Pharmacie. Grenoble 1994.
<b>RESUME</b>	<p>En 1994, l'infection à Cytomégalovirus (CMV) reste la plus fréquente et la plus sévère des infections virales observées après transplantation aussi bien en terme de morbidité que de mortalité.</p> <p>Au cours d'une étude prospective réalisée sur une population de greffés rénaux, nous avons voulu évaluer dans ce travail l'apport de deux nouvelles techniques: la détection de l'antigène pp65 (antigénémie) et la PCR pour le diagnostic de l'infection à CMV en les comparant aux techniques classiques : culture et sérologie.</p> <p>185 échantillons sanguins ont été analysés : la PCR s'avère la technique la plus sensible avec 43% d'échantillons positifs, contre 24% en antigénémie et 6% seulement en culture. Sur les 22 sujets suivis, 18 infections biologiques à CMV ont été diagnostiquées par ces deux nouvelles techniques alors que la culture n'en décelait que 8 et la sérologie 14. L'antigénémie et la PCR ont montré par ailleurs une plus grande précocité par rapport aux techniques classiques en détectant l'infection très souvent, avant l'apparition des premiers signes cliniques. 11 infections seulement ont été symptomatiques ce qui donne pour la PCR et l'antigénémie des valeurs prédictives positives inférieures à la culture (respectivement 58 et 62, 5% contre 83% en culture). Par contre, leurs valeurs prédictives négatives sont nettement supérieures à celles de la culture qui a laissé échapper 5 infections symptomatiques. La PCR et l'antigénémie apportent donc une aide importante dans l'exclusion du diagnostic. Nous concluons à l'apport de ces nouvelles techniques sensibles et précoces pour le diagnostic de l'infection à CMV, même si des études ultérieures doivent encore déterminer les critères virologiques les plus prédictifs du risque de développer une maladie à CMV.</p> <p>L'antigénémie de pratique plus simple, plus rapide et moins coûteuse que la PCR nous semble la plus adaptée et nous la recommandons désormais pour le suivi en routine des sujets transplantés.</p>
<b>MOTS CLES</b>	Cytomegalovirus - transplantation rénale - Antigénémie Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)
<b>JURY</b>	
<b>PRESIDENT</b>	Monsieur le Professeur A. FAVIER
<b>MEMBRES</b>	Monsieur le Professeur J. M. SEIGNEURIN Monsieur le Docteur P. MORAND Madame le docteur B. GRATACAP-CAVALLIER Monsieur le Docteur F. BAYLE
<b>Date de soutenance</b>	13 Septembre 1994

