



HAL
open science

Mise au point d'une technique combinée de génotypage et de recherche de résistances aux antiviraux pour le cytomégalovirus humain

Fleur Dupuy

► **To cite this version:**

Fleur Dupuy. Mise au point d'une technique combinée de génotypage et de recherche de résistances aux antiviraux pour le cytomégalovirus humain. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03522691

HAL Id: dumas-03522691

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03522691>

Submitted on 12 Jan 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue le 10 septembre 2021

Par M^{elle} DUPUY Fleur

Née le 12/10/1993

à Cannes

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017 portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE COMBINÉE
DE GÉNOTYPAGE ET DE RECHERCHE
DE RÉSISTANCES AUX ANTIVIRAUX
POUR LE CYTOMÉGALOVIRUS HUMAIN

----oOo----

JURY :

Président : Madame le Professeur Caroline SOLAS

Membres : Monsieur le Docteur Antoine NOUGAIREDE (Directeur de thèse)
Madame le Docteur Christine ZANDOTTI

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue le 10 septembre 2021

Par M^{elle} DUPUY Fleur

Née le 12/10/1993

à Cannes

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017 portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE COMBINÉE
DE GÉNOTYPAGE ET DE RECHERCHE
DE RÉSISTANCES AUX ANTIVIRAUX
POUR LE CYTOMÉGALOVIRUS HUMAIN

----oOo----

JURY :

Président : Madame le Professeur Caroline SOLAS

Membres : Monsieur le Docteur Antoine NOUGAIREDE (Directeur de thèse)
Madame le Docteur Christine ZANDOTTI

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
--	---------------

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs »

Remerciements

Aux membres du jury,

À **Madame le Professeur Caroline SOLAS**, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je tiens à vous remercier pour vos enseignements durant ces années d'études à la Faculté de Pharmacie, ainsi que votre accueil durant les six mois que j'ai passé dans le service de Pharmacologie. J'ai pu découvrir un autre versant de la biologie médicale durant ce stage, qui a été pour moi très enrichissant aussi bien professionnellement qu'humainement. J'en garde un excellent souvenir. Veuillez trouver ici l'expression de tout mon respect et mon admiration.

À **Monsieur le Docteur Antoine NOUGAIREDE**, merci tout d'abord de m'avoir proposé ce sujet de thèse et d'avoir accepté de m'accompagner durant ce travail en tant que Directeur de thèse. Je te remercie pour ton aide, ta patience et tout ce que tu m'as appris. Tes conseils et ton expertise ont beaucoup contribué à la réalisation cette thèse et je t'en suis très reconnaissante.

À **Madame le Docteur Christine ZANDOTTI**, merci de m'avoir proposé ce sujet et d'avoir accepté de faire partie des membres du jury. Je tiens particulièrement à vous remercier pour votre bienveillance et votre gentillesse à mon égard, durant mes premiers mois en tant que jeune interne au laboratoire de virologie et durant les autres semestres passés à l'IHU. Vous m'avez beaucoup appris en matière de virologie, ce qui m'a d'ailleurs donné envie de travailler sur ce sujet. Merci pour tous vos conseils et votre aide dans la réalisation de ce travail.

Aux personnes ayant contribué à l'élaboration de cette thèse,

À **Paul-Rémi**, merci énormément pour ton aide et le temps que tu as consacré à m'expliquer et à participer aux manip de cette thèse. Tu as toujours été un co-interne disponible lorsque j'avais besoin d'aide que ce soit durant la réalisation de la thèse mais aussi lors de mon premier semestre en virologie. Merci aussi pour tous ces bons moments. « Ma déclaration ».

À **Maëlia**, je devrais même dire le Docteur ETOUNDI, mon binôme de thèse. Merci beaucoup d'avoir été présente durant toutes ces étapes, d'avoir été aussi déterminée et de ne jamais avoir baissé les bras même quand on en avait marre. Je suis ravie d'avoir travaillé avec toi et d'avoir appris à te connaître davantage.

À **Géraldine Piorkowski**, je te remercie pour ton aide et ton expertise pour le séquençage et la bio-informatique. Merci d'avoir contribué à la réalisation de ces travaux de thèse.

À **tous les autres membres des différents laboratoires** que j'ai pu rencontrer tout au long de mon internat et qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

À mes proches,

À **mes parents**, sans qui je ne serais pas arrivée jusque-là. Merci pour votre générosité et votre soutien à chaque étape de ma vie. Merci de m'avoir fait confiance et aidé pour chacun de mes projets, de m'avoir supportée pendant ses longues études avec des hauts et des bas (promis, c'est bientôt fini !). Et merci tout simplement pour l'amour que vous m'apportez chaque jour.

À **toute ma famille**, qui a contribué à mon bonheur et mon épanouissement. À ma petite Mamie Jo, qui me manque et qui aurait été fière de mon parcours.

À **Arnaud**, mon amour, merci de m'avoir soutenue et supportée depuis le début. C'est aussi grâce à toi, et à ta détermination dont j'ai pris exemple, que j'en suis arrivée là. Je suis si fière de toi et de ce que tu entreprends. À tous nos moments passés ensemble et à nos futurs projets à deux. Et un grand merci à toute ta famille qui m'accueille toujours à bras ouverts.

À **mes chupitas (Célia, Mathilde et Jade)**, des amies en or. Merci d'avoir été à mes côtés durant toutes ces années : depuis la maternelle avec Jade, depuis la 2^{ème} année de pharmacie avec Célia et un peu plus tard avec Mathilde, on forme une sacrée team ! Merci d'être toujours aussi bienveillantes et de m'avoir soutenue, même dans les moments les plus durs. Je suis fière d'avoir des amis comme vous, avec qui je peux tout partager et surtout sur qui je peux compter. À toutes nos soirées (souvent arrosées), à nos weekends (qui ressemblent souvent à des EVJF), à nos voyages et tous ces moments passés ensemble et à venir !

À **Léa**, merci beaucoup pour ton aide et ta motivation durant l'internat et tout particulièrement cette année, entre la thèse et le DU. Merci pour ta joie de vivre au quotidien et d'être l'amie que tu es. Vivement les apéros et les prochains weekends avec les chupitas !

À **Margaux et Anne-Sophie**, merci de m'avoir embarquée dans votre coloc à La Réunion avec Arnaud, où a débuté une belle amitié. Merci pour tous ces moments inoubliables et tous ceux à venir.

À **mes amis de Cannes**. À **William**, qui a toujours été à l'écoute et qui me connaît par cœur depuis des années, merci de m'avoir toujours soutenue dans mes projets. À **Juliette**, merci pour cette amitié et d'avoir été présente dans les bons comme dans les mauvais moments. Et aussi à **Cloé, Lisa et Charlotte**, qui sont maintenant Parisiennes, mais avec qui c'est toujours un plaisir de se retrouver pour une soirée ou un weekend.

À **mes amis de Marseille**. À Théo P, Julien D, Théo M, Maxime, merci pour ces moments festifs et pour certains à La Réunion, Mykonos et Ibiza, même si parfois j'ai dû boulonner. À Nathan (le parrain) et Laura, merci pour ces agréables moments en Martinique, « on en profite et après on verra ». Et merci à tous les autres amis de la fac, Tessa, Margaux R, Julien V, Sandra (mon binôme de TP), Nabil, Conso, Valentin etc... d'avoir contribué à rendre ces années pleines de joie.

À **mes co-internes**, Alizée (la plus adorable de toutes, avec qui nous avons fêté nos noces de cuir d'internat), Marie et Marceau (les S de la pharmaco), Céline (la doyenne des internes, toujours attentionnée et à l'écoute) et tous les autres internes que j'ai pu rencontrer durant tous ces semestres. Merci pour tout.

Table des matières

LISTE DES FIGURES	16
LISTES DES TABLEAUX	17
INDEX DES ABREVIATIONS	18
INTRODUCTION	20
PARTIE 1 : LE CYTOMEGALOVIRUS	22
I. GENERALITES	22
A. HISTORIQUE.....	22
B. CLASSIFICATION.....	23
C. STRUCTURE DU VIRUS ET DU GENOME.....	24
1. L'enveloppe.....	24
2. Le téguement.....	25
3. La capside.....	25
4. Le génome.....	26
D. MECANISME DE REPLICATION : LE CYCLE VIRAL.....	26
1. Attachement et entrée du virus.....	27
2. Cycle productif.....	27
3. Libération du virus.....	28
4. Latence et réactivation.....	28
II. ÉPIDEMIOLOGIE	29
III. PHYSIOPATHOLOGIE	30
IV. CLINIQUE	31
A. PRIMO-INFECTION CHEZ L'IMMUNOCOMPETENT.....	31
B. INFECTION CHEZ L'IMMUNODEPRIME.....	31
1. Patients transplantés d'organe.....	31
2. Patients greffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	32
3. Patients VIH.....	32
C. INFECTION CONGENITALE.....	33
1. Épidémiologie.....	33
2. Manifestations cliniques.....	33
V. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE	35
A. DIAGNOSTIC INDIRECT.....	35
1. Sérologie.....	35
2. Test d'avidité des IgG.....	37
B. DIAGNOSTIC DIRECT.....	37
1. Culture cellulaire.....	37
2. Détection d'antigènes viraux.....	38
3. Détection de l'ADN par biologie moléculaire.....	38
4. Examen histopathologique.....	41
C. PARTICULARITES DIAGNOSTIQUES.....	41
1. Dans le cadre de la grossesse.....	41
2. Chez les patients transplantés.....	43
VII. TRAITEMENTS ET MECANISMES DE RESISTANCE	44
A. MOLECULES ANTIVIRALES DISPONIBLES.....	44
1. Ganciclovir (CYMEVAN®) et Valganciclovir (ROVALCYTE®).....	44
2. Cidofovir (VISTIDE®).....	46
3. Foscarnet (FOSCAVIR®).....	47
4. Aciclovir et Valaciclovir.....	48
5. Autres molécules.....	49

B.	NOUVELLES CIBLES ANTIVIRALES	50
1.	<i>Inhibiteur du complexe terminase : Letermovir</i>	50
2.	<i>Maribavir</i>	50
C.	STRATEGIES THERAPEUTIQUES	51
1.	<i>Infection congénitale</i>	51
2.	<i>Infections chez les patients transplantés</i>	51
D.	RESISTANCES AUX TRAITEMENTS	52
1.	<i>Tests phénotypiques</i>	53
2.	<i>Tests génotypiques</i>	54
3.	<i>Fréquence des résistances et facteurs de risque</i>	58
4.	<i>Mécanismes de résistance</i>	59
5.	<i>Prise en charge thérapeutique en cas de résistance</i>	65
PARTIE 2 : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE GENOTYPAGE DU CMV.....		67
I.	MATERIELS ET METHODES.....	67
A.	ÉTUDE BIO-INFORMATIQUE	67
1.	<i>Sélection des séquences du génome complet du CMV</i>	67
2.	<i>Détermination des régions à séquencer</i>	70
6.	<i>Design des amorces</i>	71
B.	REGENERATION DES AMORCES	75
C.	SELECTION DES ECHANTILLONS	76
1.	<i>1ère série d'échantillons</i>	76
2.	<i>2ème série d'échantillons</i>	77
D.	EXTRACTION DES ECHANTILLONS	78
E.	PCR.....	79
F.	MIGRATION SUR GEL D'AGAROSE	79
1.	<i>Préparation du gel d'agarose</i>	79
2.	<i>Électrophorèse sur gel</i>	80
G.	PURIFICATION DE L'ADN.....	80
H.	QUANTIFICATION DE L'ADN ET PREPARATION DES TUBES POUR LE SEQUENÇAGE	81
I.	SEQUENÇAGE.....	81
II.	RESULTATS DES PCR ET PROPOSITIONS D'AMELIORATION.....	82
A.	RESULTATS DES PCR.....	82
1.	<i>Analyse des gels d'électrophorèse</i>	82
2.	<i>Résultat de la quantification d'ADN</i>	84
B.	SOURCES D'ECHEC DES PCR ET PROPOSITIONS D'AMELIORATION	86
1.	<i>Optimisation de la PCR</i>	86
2.	<i>Amélioration de nos PCR</i>	88
III.	RESULTATS DU SEQUENÇAGE.....	88
DISCUSSION		94
BIBLIOGRAPHIE.....		97

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Illustrations : A gauche : Cellules avec des inclusions intranucléaires avec un halo ont été pensées par Jesionek et Kiolemenoglou pour représenter des parasites. A droite : Cellule cytomégaly infectée par le CMV avec inclusion intranucléaire avec halo.....	22
Figure 2 : Structure du CMV (7)	24
Figure 3 : Représentation des 4 isomères possibles, notés de 1 à 4.	26
Figure 4 : Mécanisme d'attachement et pénétration du CMV.....	27
Figure 5 : Rétinite à CMV avec un aspect non hémorragique	33
Figure 6 : Le taux d'infection du fœtus et les séquelles après une infection de la mère (30)	34
Figure 7 : Principe de la technique ELISA.....	36
Figure 8 : Effet cytopathogène du CMV (37)	38
Figure 9 : Principe de la PCR en temps réel avec sonde (45).....	40
Figure 10 : Modèle graphique de la PCR en temps réel (45)	40
Figure 11 : Mécanismes d'action des antiviraux anti-CMV	48
Figure 12 : Séquençage méthode Sanger	56
Figure 13 : Exemple de fluorogramme	57
Figure 14 : Répartition des cas de résistances par pathologies.....	59
Figure 15 : Représentation des domaines conservés de l'UL97 et des différentes mutations retrouvées avec les plus fréquentes en gras	61
Figure 16 : Représentation des domaines conservés de l'UL54 et des différentes mutations retrouvées avec les plus fréquentes en gras	63
Figure 17 : Représentation de l'UL56 et les différentes mutations de résistance.....	64
Figure 18 : Algorithme en cas de résistance aux traitements (3 ^{ème} consensus international 2017 de la gestion du CMV chez les transplantés d'organes solides)	66
Figure 19 : Alignement des séquences du génome complet du CMV	67
Figure 20 : Arbre phylogénétique et sélection des séquences pour l'alignement	70
Figure 21 : Variabilité positions par positions	71
Figure 22 : Principe de la PCR Multiplex.....	71
Figure 23 : Proposition de dispositions d'amorces par Primalscheme®	72
Figure 24 : Électrophorèse 1 ^{ère} série d'échantillons	82
Figure 25 : Électrophorèse 2 ^{ème} série d'échantillons.....	83

Figure 26 : Électrophorèse 2 ^{ème} série d'échantillons (Suite)	83
Figure 27 : Électrophorèse 2 ^{ème} série d'échantillons (Suite)	84
Figure 28 : Mesure des concentrations en acides nucléiques sur le Nanodrop®	85
Figure 29 : Schéma de la séquence de référence avec nos 4 régions.....	89
Figure 30 : Mapping des reads avec notre séquence de référence.....	89
Figure 31 : Correction des erreurs	90

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des herpès virus humains.....	23
Tableau 2 : Code pour les bases dégénérées.....	72
Tableau 3 : Séquences d'amorces	75
Tableau 4 : Sélection des 7 premiers échantillons et leurs caractéristiques	77
Tableau 5 : Sélection de la 2 ^{ème} série d'échantillons et leurs caractéristiques.....	78
Tableau 6 : Concentration en ADN des 14 premiers prélèvements	85
Tableau 7 : Concentration en ADN pour les prélèvements restants	86
Tableau 8 : Nombres de reads et nombre de reads mappant avec la séquence de référence	91

INDEX DES ABREVIATIONS

A : adénine
ACV : aciclovir
ADN : acide désoxyribonucléique
ATU : autorisation temporaire d'utilisation
BCV : brincidofovir
BD : biodisponibilité
C : cytosine
CDV : cidofovir
CI50 : concentration inhibitrice à 50%
CMV : cytomégalovirus
CNR : centre national de référence
CSH : cellules souches hématopoïétiques
Ct : cycle de température
dNTP : désoxynucléotides
ddNTP : didésoxynucléotides
DFGe : débit de filtration glomérulaire
DMSO : diméthylsulfoxyde
DO : densité optique
EBV : Epstein-Barr virus
EGF-R : epithelial growth factor receptor
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
FDA : Food and Drug administration
FOS : foscarnet
G : guanine
Gp : glycoprotéines
GCV : ganciclovir
GVH : greffon versus hôte
HHV-5 : Human herpesvirus 5
HHV-6 : Human herpesvirus 6
HHV-7 : Human herpesvirus 7

HHV-8 : Human herpesvirus 8
HSV : Herpès simplex virus
Ig : immunoglobuline
IV : intraveineuse
LCR : liquide céphalo-rachidien
LTV : letermovir
MBV : maribavir
MIEP : major immediate early promoteur
NABM : nomenclature des actes de biologie médicale
NASBA : nucleic acid sequence-based amplification
NGS : next generation sequencing
ORF : Open Reading Frame
pdb : paire de base
PCR : polymerase chain reaction
RFLP : restriction fragment length polymorphism
rpm : revolutions per minute of rotor
SIDA : syndrome d'immunodépression acquise
SNC : système nerveux central
T : thymine
TBE : tris borate EDTA
TE : tampon Tris-EDTA
 $T_{1/2}$: demi-vie
TK : thymidine kinase
Tmax : temps maximal
UI : unité internationale
UL : unit Long
US : unit Short
Vd : volume de distribution
VGCV : valganciclovir
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VZV : virus de la varicelle et du zona

INTRODUCTION

Le cytomégalovirus (CMV) est un virus ubiquitaire issu de la famille des *Herpesviridae*, connu pour sa capacité à persister sous forme latente secondairement à une primo-infection. C'est un virus cosmopolite et fréquent puisqu'il est responsable d'infections chez une grande majorité de la population mondiale, avec une séroprévalence qui varie de 50% à 100% selon la situation géographique et le contexte socio-économique. Chez les individus immunocompétents, la primo-infection est la plupart du temps asymptomatique ou peut être associée à un syndrome mononucléosique. En revanche, les infections chez les patients immunodéprimés, notamment les patients VIH au stade SIDA et les patients transplantés traités par immunosuppresseurs, peuvent être graves et nécessitent une surveillance particulière. L'infection peut survenir lors d'une primo-infection, d'une réactivation ou d'une réinfection. Le CMV représente également la première cause d'infection congénitale d'origine virale dans le monde. Sa fréquence et son implication dans différentes situations cliniques, font de lui un problème majeur de santé publique.

Différentes molécules antivirales ont été développées afin de traiter ou prévenir cette infection. Les traitements antiviraux, peu nombreux, sont utilisés depuis plusieurs années et ont montré leur efficacité. Mais une utilisation prolongée peut être responsable d'apparition de mutations conférant une résistance aux traitements. Les mutations peuvent être détectées soit par des techniques phénotypiques nécessitant de cultiver le virus, soit par des techniques génotypiques comme le génotypage par séquençage qui est la méthode de référence actuellement utilisée pour documenter les résistances et aider à la prise en charge thérapeutique. En revanche, cette technique n'est pas encore répandue dans tous les laboratoires de France, et actuellement, la majorité des prélèvements sont acheminés au centre national de référence (CNR) de Limoges pour pouvoir être analysés, ne facilitant pas la rapidité du rendu des résultats.

L'identification et la connaissance de ces mutations de résistance représentent un enjeu important, d'une part pour la recherche fondamentale sur le virus, et d'autre part pour la prise en charge du patient.

Le but de ce travail a été de mettre au point une technique combinée de génotypage et de recherche de résistances, au laboratoire de virologie à l'IHU Méditerranée Infection à Marseille, afin de faciliter la prise en charge des patients suivis dans notre établissement et d'étudier l'épidémiologie des résistances. Le fait de combiner le génotypage avec la recherche des mutations

de résistances, permet d'analyser les différents génotypes et d'établir un lien avec la présence de certaines résistances. Cela permet également d'alimenter la banque de séquences nécessaire pour le génotypage. La mise au point de cette technique a nécessité l'élaboration d'un système PCR (Polymerase Chain Reaction), à partir de l'ADN issu de prélèvements biologiques de patients, afin d'amplifier des séquences d'ADN d'intérêt connues pour être responsables de mutations de résistance mais aussi des séquences hypervariables qui seront utiles pour le génotypage. Il a fallu ensuite analyser les séquences obtenues après séquençage à haut débit, afin d'établir des génotypes, et par la suite, rechercher les mutations de résistance.

PARTIE 1 : LE CYTOMEGALOVIRUS

I. GENERALITES

A. HISTORIQUE

En 1881, le Dr. Ribbert observe pour la première fois, au niveau des reins et de la glande parotidienne d'un enfant mort-né, de très larges cellules qu'il est incapable d'interpréter, avant la découverte de Jesionek et Kiolemenoglou. Ces derniers, en 1904, observent des cellules similaires dans les poumons, reins et foie d'un fœtus syphilitique de 8 mois, semblables à des protozoaires. Ils décrivent des grandes cellules avec un noyau excentré et contenant un corps nucléaire central entouré d'un halo clair (1) (Figure 1). Ce sont les premières descriptions des « cellules cytomégaliennes » typiques avec des inclusions intranucléaires.

Dans les années 20, Lipschuetz observe ces cellules dans des lésions chez l'homme infecté par l'herpès génital et le virus de la varicelle, suggérant l'origine virale de la maladie, et non plus parasitaire (2). En 1932, 25 cas d'une rare infection congénitale mortelle caractérisée par des pétéchies, une hépatosplénomégalie et une calcification intracérébrale avaient été décrits. Tous présentaient des cellules avec des inclusions intranucléaires typiques (3). Wyatt et ses collaborateurs ont suggéré le nom de « maladie des inclusions cytomégaliennes ». Il a fallu attendre les années 50, pour qu'ils isolent le virus responsable de cette maladie, sur culture de fibroblastes humains (4).

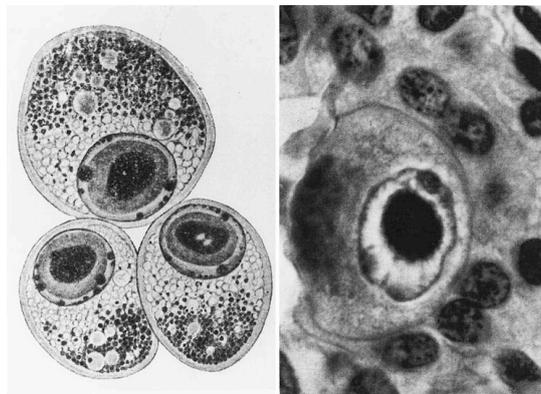


Figure 1 : Illustrations : A gauche : Cellules avec des inclusions intranucléaires avec un halo ont été pensées par Jesionek et Kiolemenoglou pour représenter des parasites. A droite : Cellule cytomégalique infectée par le CMV avec inclusion intranucléaire avec halo.

B. CLASSIFICATION

Le cytomégalovirus humain (CMVH) ou Human Herpesvirus 5 (HHV-5) appartient à la famille des *Herpesviridae*. À ce jour, 9 herpès virus ont été identifiés chez l'homme : 8 strictement humains et répartis en 3 sous familles (5) (Tableau 1) et le virus B du singe (Herpès virus *simiae*) accidentellement transmis à l'homme.

Herpesvirus	Abbreviation		Size (kb)
	Common	Formal	
<i>Alphaherpesvirinae</i>			
<i>Simplexvirus</i>			
Herpes simplex virus type 1	HSV-1	HHV-1	152
Herpes simplex virus type 2	HSV-2	HHV-2	155
<i>Varicellovirus</i>			
Varicella-zoster virus	VZV	HHV-3	125
<i>Betaherpesvirinae</i>			
<i>Cytomegalovirus</i>			
HCMV	HCMV	HHV-5	227-236
<i>Roseolovirus</i>			
Human herpesvirus type 6	HHV-6	HHV-6	159-162
Human herpesvirus type 7	HHV-7	HHV-7	144-153
<i>Gammaherpesvirinae</i>			
<i>Lymphocryptovirus</i>			
EBV	EBV	HHV-4	172-173
<i>Rhadinovirus</i>			
Human herpesvirus type 8	HHV-8	HHV-8	134-138

Tableau 1 : Classification des herpès virus humains

Chaque sous-famille a un cycle de reproduction différent :

- Les *Alphaherpesvirinae* (ou α -Herpesvirus) ont un cycle de reproduction très court (quelques heures). Ils ont la capacité de détruire les cellules infectées et de réaliser une infection latente dans les ganglions nerveux sensitifs principalement.
- Les *Betaherpesvirinae* (ou β -Herpesvirus) ont un cycle de de reproduction long (plusieurs jours). La latence a lieu au niveau des leucocytes, des cellules rénales ou glandulaires.
- Les *Gammaherpesvirinae* (ou γ -Herpesvirus) infectent spécifiquement les lymphocytes B et T. La latence s'observe dans le tissu lymphoïde et certaines cellules endothéliales.

Le CMV appartient à la sous-familles des β -herpèsvirus, au même titre que les roséolovirus (HHV-6 et HHV-7) (6).

C. STRUCTURE DU VIRUS ET DU GENOME

Le virion mature est une particule enveloppée mesurant de 150 à 200 nm de diamètre. Il est constitué de différents éléments :

- L'enveloppe
- Le tégument
- La capsid
- Le génome

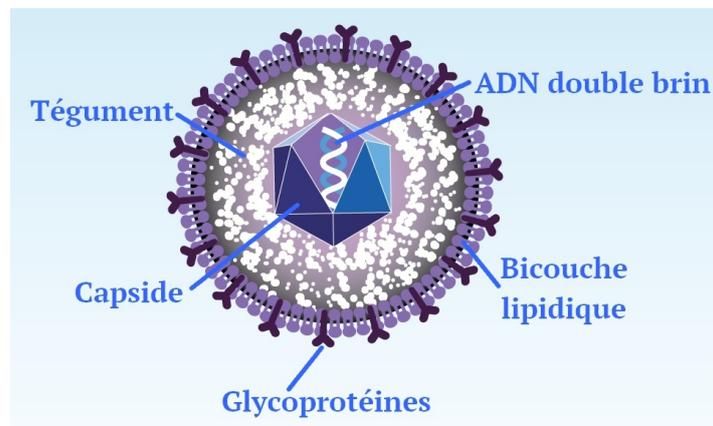


Figure 2 : Structure du CMV (7)

1. L'enveloppe

L'enveloppe du CMV est constituée d'une bicouche lipidique dérivée des membranes de la cellule hôte infectée. Elle exprime à sa surface plusieurs glycoprotéines (gp) transmembranaires, dont les plus étudiées sont les glycoprotéines B (gB), H (gH), L (gL), M/N (gM/N) et O (gO), codées respectivement par les gènes UL55, UL75, UL115, UL100, UL73 et UL74.

Le constituant le plus abondant de l'enveloppe est la protéine gB, impliquée dans l'attachement du virus à la membrane de la cellule hôte et son entrée dans celle-ci. Associée en dimère, elle compose le complexe protéique gCI. Elle est présente sur toutes les membranes des cellules infectées et est incorporée dans le virion lors du processus d'enveloppement. C'est aussi la protéine la plus conservée entre les CMV des différentes espèces (8)(9).

Les glycoprotéines gH, gL et gO composent le complexe protéique gCIII qui facilite le transport vers la surface cellulaire et l'entrée du virus dans la cellule.

Le complexe gCII est composé des glycoprotéines gM et gN.

2. Le tégment

Le tégment, situé entre la bicouche lipidique de l'enveloppe et la capsid, est une structure amorphe composée de phosphoprotéines. Les protéines du tégment représentent plus de la moitié des protéines présentes dans les virus infectieux. La plupart présentent un intérêt particulier en raison du rôle qu'elles jouent dans le cycle de réplication du CMV, notamment pp65, pp71, pp150 et pp28 (10).

Les protéines pp65, la plus abondante du tégment, est impliquée dans la neutralisation des réponses immunitaires innées et adaptatives pendant les infections par le CMV (notamment par son activité enzymatique kinase). Ainsi, elle empêche les cellules infectées d'être détruites par le système immunitaire. La pp71 joue quant à elle, un rôle important dans l'activation de l'expression génétique au début du cycle de réplication lytique. Les pp150 et pp28 sont très immunogènes et jouent des rôles dans l'assemblage et la sortie des particules virales (11).

3. La capsid

La capsid, de forme icosaédrique, fait un diamètre d'environ 100 nm et se compose d'au moins 7 protéines différentes (12) :

- La protéine pUL86, ou protéine majeure de capsid, MCP («*Major Capsid Protein*»). Elle participe à la formation des pentamères et hexamères qui sont la base de la structure icosaédrique.
- La protéine pUL85, ou protéine mineure de capsid, mCP («*minor Capsid Protein*»). Elle est située à l'intérieur de la capsid et permet l'ancrage de l'ADN à la capsid.
- La protéine pUL46 ou protéine mineure de fixation, mC-BP («*minor capsid-Binding Protein*») assure l'ancrage de l'ADN génomique.
- pUL48/49 ou la petite protéine de capsid, SCP («*Smallest Capsid Protein*»). Elle est nécessaire à l'assemblage des particules virales infectieuses.
- Trois autres protéines dérivant du peptide pUL80.

4. Le génome

Le génome du CMV est le plus long et le plus complexe de tous les herpès virus humain, avec un ADN linéaire bicaténaire d'une longueur de 230kb (7). La teneur en G+C est de 57%. Il code environ 180 protéines, dont 35 protéines constitutives de la particule virale.

Le génome se divise en 2 séquences uniques : une séquence longue unique, UL (Unit Long), correspondant à 85% du génome, et une séquence courte unique, US (Unit Short). La région UL est encadrée par des séquences répétées TRL (Terminal Repeat Long) et IRL (Internal Repeat Long), alors que les séquences TRS (Terminal Repeat Short) et IRS (Internal Repeat Short) entourent la région US (13).

Quatre isoformes différentes du génome viral peuvent apparaître au cours de la réplication virale selon l'orientation des segments UL et US (Figure 3)

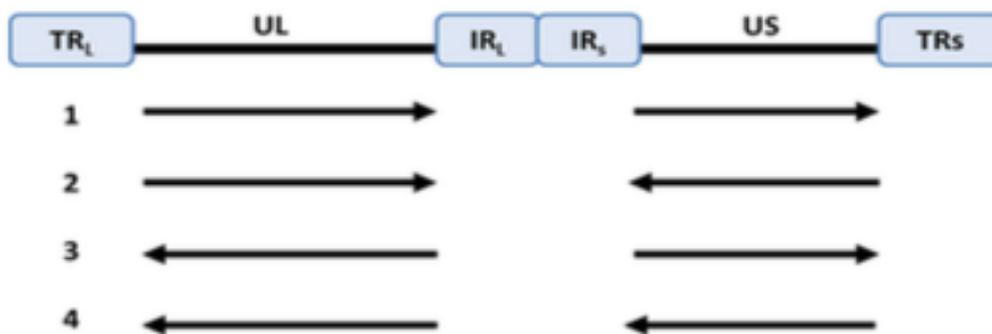


Figure 3 : Représentation des 4 isomères possibles, notés de 1 à 4.

Il existent plus de 200 cadres de lecture ouvert, ou Open Reading Frame (ORF) en anglais, permettant au CMV de coder pour toutes ces protéines (14). Le premier séquençage complet du virus a été publié en 1990 et correspond à la souche de laboratoire AD169 qui est la plus étudiée. Elle compte 230 288 paires de base (15).

D. MECANISME DE REPLICATION : LE CYCLE VIRAL

Le CMV se réplique uniquement dans les cellules humaines, mais a un tropisme cellulaire très étendu. La durée du cycle viral est variable selon la localisation cellulaire (allant de 48-72h dans les fibroblastes, jusqu'à 7 jours dans les cellules souches neurales). C'est pourquoi, *in vitro*, les cellules de choix pour l'isolement viral sont les fibroblastes humains embryonnaires.

1. Attachement et entrée du virus

L'entrée du virus nécessite une adhésion à la surface cellulaire via les heparan-sulfates à l'aide des complexes gM/gN et gB viraux. Elle implique la participation d'un grand nombre de récepteurs cellulaires encore mal connus. Les glycoprotéines gB et gH se lieraient de manière spécifique au récepteur membranaire EGF-R (epithelial growth factor) (16) et de manière aspécifique à l'annexine II ou à la β 2 microglobuline.

Le virus peut pénétrer par endocytose, comme c'est le cas dans les cellules endothéliales, ou par fusion de la membrane virale et de la membrane cellulaire. Ceci aboutit à la libération de la capside et des protéines du tégment dans le cytoplasme cellulaire. La capside est transportée jusqu'au noyau où l'ADN viral est libéré, circularisé et l'expression des gènes très précoces commence.

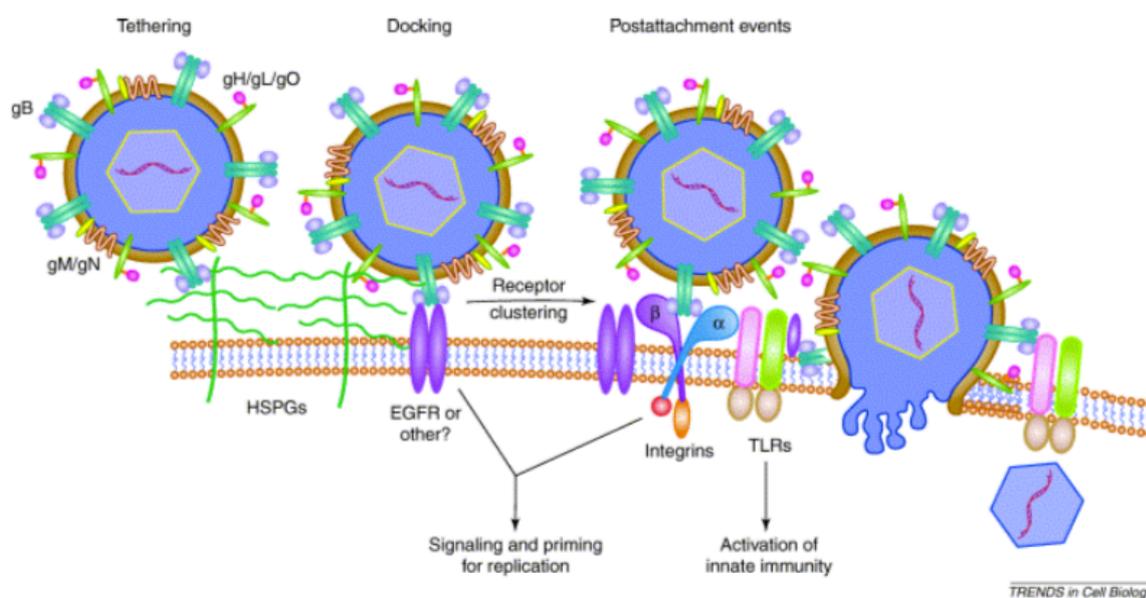


Figure 4 : Mécanisme d'attachement et pénétration du CMV

2. Cycle productif

Le cycle de réplication du CMV se déroule entre 24 et 48h après l'endocytose. La protéine tégmentaire pp71 active l'expression du promoteur majeur très précoce, le MIEP (major immediate early promoteur) et induit l'expression en cascade des gènes viraux en 3 phases successives (17) :

- **La phase très précoce (ou IE pour Immediate Early)** : rapide et correspondant à l'expression de gènes IE important dans l'initiation et la maintenance de l'expression des gènes lors du cycle lytique et latent.
- **Le phase précoce (ou E pour Early)** : correspondant à l'expression des gènes E, qui permettent la production des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral (notamment la polymérase virale pUL54, la protéine accessoire pUL44, les sous-unités du complexe hélicase-primase, pUL70, pUL102, pUL105 et la kinase virale pUL97). L'ADN viral est circularisé et répliqué en une multitude de copies assemblées bout à bout pour former une molécule d'ADN bicaténaire.
- **La phase tardive (ou L pour Late)** : correspondant à l'expression des gènes L, commençant à être exprimés 24h après l'infection et codant pour des protéines de structure du virion. La réplication de l'ADN viral se prolonge durant la phase tardive, puis vient sa maturation, son encapsidation dans les capsides néoformées puis la tégmentation des virions. Une partie des virions matures est ainsi libérée dans le milieu extracellulaire, tandis que l'autre moitié reste attachée à la membrane plasmique. Les nouveaux virions ont une demi-vie de 24 à 48h.

3. Libération du virus

Le virus est observé sous plusieurs formes dans la cellule : le virion complet, les corps denses (résultant d'une production excessive de protéines virales, constitués uniquement de capsides et de tégment) ou les particules enveloppées non infectieuses (sans ADN).

Le virus sort de la cellule par fusion des vésicules golgiennes avec la membrane plasmique. La libération s'accompagne de la mort de la cellule hôte.

4. Latence et réactivation

Le CMV est capable d'établir une latence dans ses cellules cibles : le virus entre dans les cellules mais le cycle répliatif est ensuite rapidement interrompu et il n'y a pas d'expression des gènes précoces et tardifs. L'ADN viral forme un épisome, permettant la production de « transcrit de latence ». Cette latence se maintient grâce à un échappement à la réponse immunitaire et à des mécanismes moléculaires de maintien du génome viral dans les cellules (7). L'ADN du CMV peut

devenir latent dans les cellules de la lignée myéloïde comme les monocytes et leurs précurseurs hématopoïétiques CD34+ (18), ainsi que dans les cellules endothéliales (19). Le virus peut alors se réactiver lors de la différenciation de ces cellules ou sous l'effet d'autres facteurs.

II. ÉPIDEMIOLOGIE

Les infections à CMV sont cosmopolites et endémiques. Sa séroprévalence est inversement corrélée au niveau socio-économique (50 à 80 % chez l'adulte dans les pays industrialisés et jusqu'à 100% dans certains pays en voie de développement) (6)(20) et augmente avec l'âge (21). On estime, en France, que 50% de la population est séropositive au CMV.

La transmission est exclusivement interhumaine, l'homme étant le seul réservoir. Il existe plusieurs modes de transmission (7):

- Par voie sexuelle (sperme et sécrétions cervico-vaginales), par voie salivaire ou par contact avec les excréments viraux (urines de nouveau-nés, salive)
- Lors de transplantations d'organes ou de greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH)
- Par transfusion sanguine (mode de transmission en diminution depuis la déleucocytation des concentrés globulaires)
- De la mère à l'enfant : via le placenta (CMV congénital), le lait maternel, les sécrétions cervicales et la salive

On observe 2 pics de contamination : lors de la petite enfance (début de la vie en collectivité) et entre 15-30 ans (principalement par transmission sexuelle ou salivaire).

En France, l'incidence de l'infection à CMV chez la femme enceinte est de 0,6 à 1,4 %. Le risque de transmission du virus de la mère à l'enfant est de l'ordre de 40% (plus souvent par voie hématogène transplacentaire) (6).

Actuellement, l'infection à CMV représente la virose opportuniste la plus fréquente après transplantation d'organe et la plus fréquente des infections virales congénitales dans les pays développés (depuis la diffusion du vaccin contre la rubéole) (22).

III. PHYSIOPATHOLOGIE

Après contamination, soit par voie hématogène (transplantation ou transfusion sanguine) ou soit par pénétration aux niveaux des muqueuses, le virus va disséminer dans tout l'organisme grâce à la distribution ubiquitaire de ses cibles. La dissémination se fait principalement par l'infection des cellules endothéliales, des monocytes, macrophages et polynucléaires. Le virus présente également la capacité de se répliquer dans les cellules fibroblastiques, les cellules épithéliales, les cellules musculaires, les cellules nerveuses. Ce large tropisme explique la diversité des signes cliniques retrouvés (6)(23).

- Primo-infection :

Elle est caractérisée par une phase de virémie transitoire permettant au virus d'atteindre les organes cibles conduisant à une excrétion virale dans tous les liquides biologiques qui constituent alors une source possible d'infection.

- Phase de latence :

Après la primo-infection, le CMV persiste au sein de l'hôte de façon latente, dans les noyaux des monocytes circulants, des progéniteurs de moelle osseuse et des cellules endothéliales. Le génome viral persistera de manière définitive sous forme d'épisome circulaire extra-chromosomique sans réplication.

- Réactivations :

Le système immunitaire de l'hôte joue un rôle important dans le processus de latence mais également dans la réactivation du virus. En effet, un déficit immunitaire peut provoquer une réactivation conduisant à une virémie responsable d'une nouvelle excrétion virale. Les épisodes de réactivation peuvent survenir chez les patients VIH au stade SIDA, chez les receveurs d'allogreffe, au cours d'hémopathies malignes ou suite à la prise de traitements immunosuppresseurs.

IV. CLINIQUE

A. PRIMO-INFECTION CHEZ L'IMMUNOCOMPÉTENT

L'infection à CMV chez le sujet immunocompétent est asymptomatique dans 90% des cas. Elle peut cependant se manifester, après une incubation d'environ 3 semaines, par une fièvre isolée prolongée, une asthénie, des myalgies et des adénopathies, un syndrome mononucléosique (caractérisé par une hyperlymphocytose constituée de lymphocytes hyperbasophiles) et parfois une thrombopénie et une cytolyse hépatique. Dans de rares cas, on peut retrouver des atteintes plus graves du tractus intestinal ou du système nerveux central (méningo-encéphalite, polyradiculonévrite de Guillian Barré). Une fois infecté, le sujet reste porteur du virus à l'état latent (6)(7)(20).

B. INFECTION CHEZ L'IMMUNODEPRIME

Le pouvoir pathogène du CMV se manifeste surtout chez des patients immunodéprimés, tels que les patients infectés par le VIH au stade de SIDA, les patients transplantés ou les patients présentant un déficit immunitaire lié au développement d'une hémopathie maligne. Une réactivation asymptomatique du CMV est dénommée « infection à CMV ». Mais lorsque la réactivation est symptomatique et responsable d'atteinte tissulaire, on parle de « maladie à CMV ».

1. Patients transplantés d'organe

Les patients transplantés d'organe peuvent développer une infection ou une maladie à CMV suite à une primo-infection ou à une réactivation.

Le risque de primo-infection est majeur lorsque le donneur est séropositif pour le CMV et le receveur séronégatif (D+/R-). Ces derniers n'ont pas d'immunité humorale et cellulaire préexistante spécifique au CMV et, en présence d'une immunosuppression induite par les médicaments, cela peut entraîner une incapacité à contrôler l'infection. En revanche, lorsque le receveur est séropositif (R+), le virus endogène peut se réactiver suite à l'immunodépression. Plus rarement, le receveur séropositif peut présenter une réinfection par une autre souche provenant d'un donneur positif (D+), moins sévère que la primo-infection.

La réplication peut être asymptomatique ou entraîner une maladie à CMV correspondant soit à un syndrome viral, soit à une atteinte tissulaire. Elle débute par une atteinte de l'organe greffé

puis dissémine vers d'autres organes. L'organe le plus fréquemment touché par le CMV est le tube digestif, qui représente plus de 70 % des cas de maladies à CMV invasives dans les tissus. D'autres atteintes viscérales peuvent s'observer : pneumonie, hépatite, myocardite, pancréatite et plus rarement encéphalite. L'infection à CMV est un facteur aggravant le risque de rejet de greffe (6)(21).

2. Patients greffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Les infections à CMV suite à une allogreffe de CSH sont liées à une primo-infection du patient séronégatif avec un donneur séropositif (D+/R-) (avec une incidence de 17%) ou liées à la réactivation du virus latent du receveur. Les receveurs de greffes allogéniques sont particulièrement exposés au risque de pneumopathie à CMV, avec une incidence d'environ 10 à 30 % (contre 1 à 6% après une greffe autologue). Elle survient à un stade d'immunosuppression majeure, dans les 3 mois suivant la greffe, et conduit au décès dans 70% des cas en l'absence de traitement. Le CMV interviendrait également dans la réaction du greffon contre l'hôte (6)(21). Contrairement aux transplantés d'organes solides, le risque d'infection et de maladie à CMV chez les receveurs de greffe de CSH est plus élevé lors d'un statut CMV R+, avec une incidence autour de 70 % (24). Elle peut être prévenue par la recherche systématique par PCR d'une virémie pendant les 3 mois qui suivent la greffe.

3. Patients VIH

Chez les personnes infectées par le VIH, l'infection à CMV a des conséquences dépendantes du taux de lymphocytes T CD4. En effet, elle peut survenir lorsque le taux de CD4 est inférieur à 50/mm³. La rétinite à CMV est la localisation la plus fréquente (80%), parfois associée à des atteintes digestives (colites), pulmonaires ou neurologiques (encéphalites, neuropathies périphériques). La rétinite, en l'absence de traitement, entraîne une destruction rétinienne progressive subaiguë conduisant à une cécité irréversible. Un fond d'œil est donc réalisé chez les patients ayant un taux de CD4 inférieur à 100/mm³ et une sérologie CMV positive (6)(21). La maladie à CMV est devenue une infection opportuniste rare, depuis la généralisation des traitements antirétroviraux.

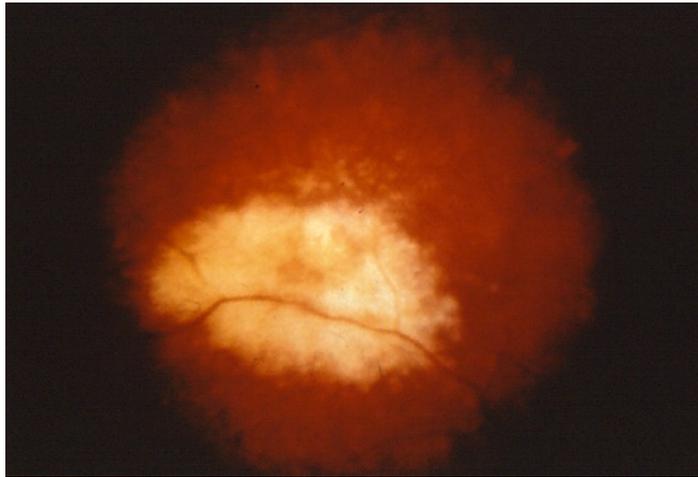


Figure 5 : Rétinite à CMV avec un aspect non hémorragique

C. INFECTION CONGÉNITALE

1. Épidémiologie

La prévalence mondiale de l'infection congénitale à CMV est de 0,64%, mais varie selon le contexte socio-économique (25). En effet, elle est autour de 0,5-1 % en Amérique du Nord et en Europe, et jusqu'à 6 % dans les pays en développement (26). L'immunité maternelle diffère également selon le contexte socio-économique (90% pour les femmes de catégories socio-économiques basses contre 50% pour les femmes de catégories socio-économiques supérieures). Le CMV représente la première cause d'infection congénitale d'origine virale dans le monde (7).

2. Manifestations cliniques

L'infection du fœtus par le CMV peut survenir tout au long de la grossesse avec une transmission à travers le placenta, par les leucocytes lors d'une virémie maternelle. L'infection survient le plus souvent chez les nourrissons nés de mères ayant développées une primo-infection pendant la grossesse (la transmission se produisant dans environ 40% des cas (27)), et plus rarement lors d'une infection non primaire par le CMV, c'est à dire lors d'une réinfection ou d'une réactivation (21). En France, environ 0,4% des nouveau-nés sont infectés par le CMV (6). Le risque de transmission materno-fœtale augmente en fonction de l'âge gestationnel de la primo-infection maternelle (de <5% en période péri-conceptionnelle à près de 70% en fin de grossesse) (28).

Le risque d'anomalie congénitale est majeur lorsque la primo-infection maternelle survient dans les 3 premiers mois de la grossesse (< 20 semaines d'aménorrhée). La sévérité des atteintes fœtales diminue au cours de la grossesse (29).

Dans 90% des cas, les enfants infectés in utero se développent normalement, mais certains d'entre eux peuvent présenter des séquelles graves à la naissance (principalement la surdité). Par ailleurs, 10% des infections in utero sont symptomatiques et peuvent être responsables d'atteintes viscérales parfois mortelles. La maladie congénitale à CMV peut se manifester par une éruption pétéchiale, un ictère avec hépatosplénomégalie, des anomalies neurologiques telles que microcéphalie, chorioretinite, atrophie du nerf optique, prématurité et faible poids à la naissance. Certains de ces nouveaux nés garderont des séquelles neurosensorielles notamment une surdité, des retards psychomoteurs ou mentaux (Figure 6) (27)(29)(30), avec parfois de apparition tardives. L'infection congénitale à CMV est la première cause de déficit auditif d'origine infectieuse diagnostiquée avant l'âge d'acquisition de la parole (6).

L'infection de la femme enceinte par le CMV peut être corrélée à un contact avec de jeunes enfants (dans les crèches par exemple), excréant souvent de façon abondante du virus dans la salive et les urines.

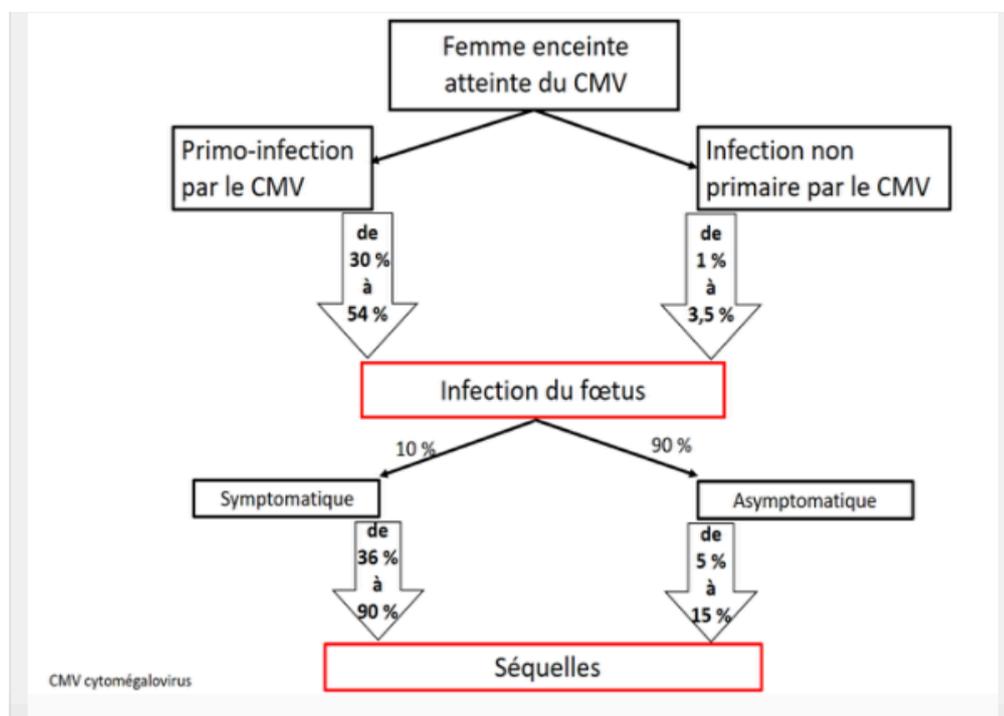


Figure 6 : Le taux d'infection du fœtus et les séquelles après une infection de la mère (30)

V. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE

Le diagnostic de l'infection à CMV peut se faire à partir d'éléments paracliniques d'orientation tels que des signes biologiques de primo-infection : syndrome mononucléosique, neutropénie, thrombopénie, cytolysse hépatique. Mais des examens biologiques sont nécessaires au diagnostic de primo-infection ou de réactivation. La recherche du virus a pour but d'évaluer le risque d'apparition de complications liées aux pathologies à CMV. Des examens virologiques sont réalisés à partir de différents prélèvements biologiques selon le contexte clinique : sang, salive, urines, liquide-céphalorachidien (LCR), biopsies, liquide amniotique.

En cas de suspicion de primo-infection, le diagnostic indirect par sérologie est le plus souvent réalisé et suffisant au diagnostic. En cas de réactivation, notamment chez les patients immunodéprimés, le diagnostic direct par biologie moléculaire sera préféré (6).

A. DIAGNOSTIC INDIRECT

1. Sérologie

Le diagnostic indirect se fait par technique sérologique à partir d'un prélèvement sanguin, la plupart du temps sur un tube sec, et permet de mettre en évidence des anticorps anti-CMV dans le sérum du patient.

Les techniques principalement utilisées sont de type immuno-enzymatiques, notamment la technique de type ELISA (« Enzyme-linked immunosorbent assay »). Elle permet la détection des immunoglobulines G (IgG) et immunoglobulines M (IgM) dirigées contre le CMV. Les IgM anti-CMV apparaissent en premier, mais ne sont pas toujours synonymes de primo-infection. En effet, elles peuvent également être retrouvées lors d'une persistance prolongée des IgM, une réactivation, une réinfection ou d'une réactivité non spécifique (par exemple une réaction croisée vis-à-vis de l'EBV ou une interférence avec un facteur rhumatoïde de classe IgM).

C'est la mise en évidence d'une séroconversion (apparition des IgM puis des IgG anti-CMV) qui permet le diagnostic de certitude de primo-infection. La présence seule d'IgG est le témoin d'une immunité ancienne. Leur taux peut augmenter en cas de réactivation ou réinfection (6)(20)(28).

Les IgM apparaissent entre 2 et 4 semaines après l'infection primaire, et les IgG sont détectables quelques jours après les IgM.

La sérologie anti-CMV est indispensable pour diagnostiquer une primo-infection, notamment chez la femme enceinte ou pour connaître le statut sérologique avant une transplantation. Mais elle n'est pas recommandée pour le diagnostic en temps réel de l'infection à CMV chez les personnes immunodéprimées. En effet, il existe un décalage entre l'apparition de la maladie clinique et l'apparition des IgM, de plus les IgM peuvent persister longtemps après la résolution de la maladie, et enfin certains patients immunodéprimés ne développent pas de réponse sérologique (31)(32).

Principe de la technique ELISA :

C'est une technique immuno-enzymatique qui se déroule en plusieurs étapes (33) :

- **Fixation de l'antigène** : L'antigène connu et spécifique à l'anticorps recherché, est incubé sur une plaque de microtitration. L'antigène va se fixer au fond des puits. Ils sont ensuite lavés pour enlever les antigènes non fixés.
- **Fixation de l'anticorps à doser** : On incube notre sérum à doser (contenant des anticorps ou non). Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés.
- **Fixation de l'anticorps secondaire** : On incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une enzyme, de nature anti-IgG qui reconnaît l'anticorps primaire. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.
- **Révélation** : On incube un substrat spécifique à l'enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés.

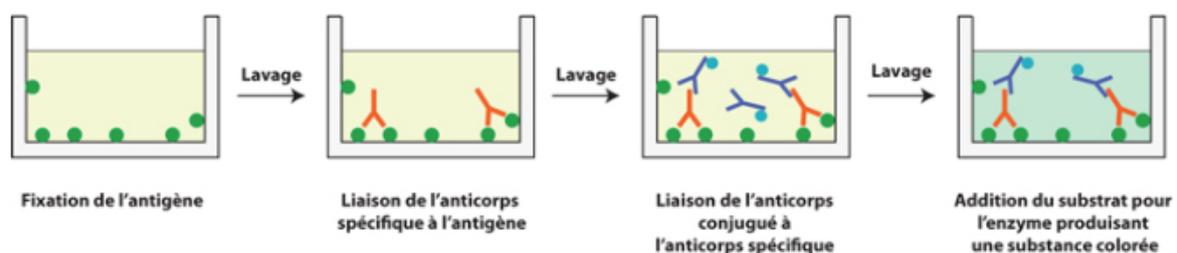


Figure 7 : Principe de la technique ELISA

2. Test d'avidité des IgG

Dans certains cas, notamment chez la femme enceinte, il peut être nécessaire de dater la primo-infection. Le test d'avidité des IgG permet de distinguer les infections récentes (< 3 mois) des infections anciennes (> 3 mois). L'avidité mesure l'affinité des IgG anti-CMV synthétisées en réponse à une infection. Les anticorps produits au cours de l'infection primaire ont une affinité plus faible pour l'antigène que dans le cas d'une infection non primaire. L'avidité des IgG augmente progressivement avec le temps après une immunisation. Donc, les IgG de faible avidité permettent d'affirmer une primo-infection récente datant de moins de 3 mois, alors que les IgG de forte avidité excluent une primo-infection dans les 3 premiers mois (34).

L'utilisation d'un agent dissociant la liaison antigène/anticorps (ex : l'urée), en parallèle avec la technique habituelle de mesure des IgG, permet de comparer la densité optique (DO) obtenue après action de l'agent dissociant avec la DO obtenue sans action de cet agent (35).

On mesure l'avidité de cette façon : $DO \text{ en présence d'agent dénaturant} / DO \text{ sans agent dénaturant} \times 100$. La valeur seuil pour déterminer si l'avidité est faible ou forte est notifiée par chaque fournisseur de la technique utilisée.

B. DIAGNOSTIC DIRECT

1. Culture cellulaire

La mise en évidence du CMV peut se faire par culture cellulaire. Les échantillons sont inoculés sur des cellules de la lignée MRC-5 (fibroblastes de poumon d'embryon humain). Après plusieurs jours voire semaines d'incubation, on peut observer un effet cytopathogène au microscope, avec un aspect en banc de poissons, qui se manifeste par des cellules infectées larges et arrondies contenant des inclusions cytoplasmiques. Cette technique est rarement utilisée en routine pour le diagnostic car la culture est lente et manque de sensibilité, mais elle permet l'isolement des souches à visée épidémiologique.

Il existe une technique de culture rapide, par centrifugation à faible vitesse de l'inoculum sur les cellules et détection du CMV par un anticorps monoclonal, ce qui permet de raccourcir le temps d'analyse et d'augmenter la sensibilité (21)(28)(36).

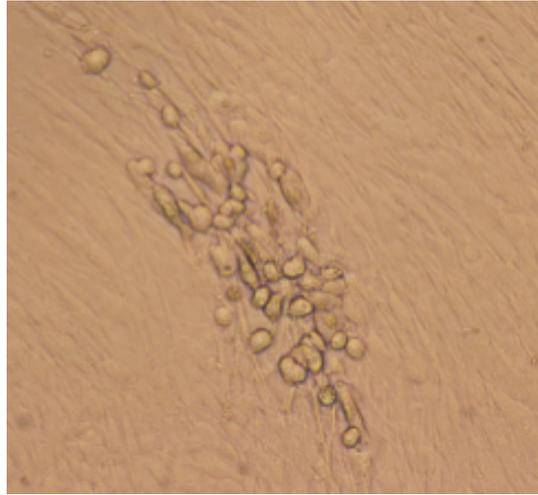


Figure 8 : Effet cytopathogène du CMV (37)

2. Détection d'antigènes viraux

Cette technique repose sur la détection dans les leucocytes de l'antigène pp65, qui correspond à la protéine du tégument pp65, à l'aide d'anticorps monoclonaux. La présence de cette protéine spécifique du CMV peut être mise en évidence notamment par immunofluorescence. Cette technique n'est actuellement plus utilisée en routine, car remplacée par des techniques de biologie moléculaire beaucoup plus sensibles (31)(36).

3. Détection de l'ADN par biologie moléculaire

La recherche du CMV par biologie moléculaire est la méthode privilégiée pour le diagnostic rapide du CMV chez les personnes immunodéprimées. Elle est basée sur la détection ou/et la quantification des acides nucléiques du CMV dans des prélèvements biologiques. Cependant, le CMV peut persister sous forme latente dans des cellules nucléées, c'est pourquoi il existe un risque de détecter un CMV inactif et non répliqué, d'où la nécessité d'une quantification à partir des prélèvements sanguins.

Parmi les méthodes moléculaires de quantification du CMV, la détection du génome viral peut être réalisée par différentes techniques (38)(39):

- Amplification de l'ADN viral par PCR (polymerase chain reaction) classique, avec détection des amplicons en point final, mais cette technique n'est quasiment plus utilisée.

- Amplification de l'ADN viral par des techniques de PCR en temps réel, plus sensibles et plus précises que la PCR classique, et adaptées aux grandes séries. En effet, la PCR en temps réel permet simultanément d'amplifier le gène d'intérêt et d'analyser les produits d'amplification, permettant une obtention des résultats plus rapide que la PCR classique (en moins de trois heures). Le risque de faux positifs par contamination est également réduit. Il existe de nombreux protocoles maisons et des troussees commercialisées (40)(41).
- Détection des transcrits ARNm très précoces ou tardifs (pp67) par NASBA.
- Détection de l'ADN viral par hybridation moléculaire.

La PCR en temps réel est la technique virologique de référence pour déterminer la charge virale du CMV (21)(40). Cette technique, d'une excellente sensibilité (proche de 100%), consiste à amplifier in vitro une séquence connue du virus, ciblée par deux amorces qui sont dirigées l'une vers l'autre, et une sonde marquée par un fluorochrome permettant la détection du produit d'amplification. Il est nécessaire tout d'abord d'extraire l'ADN à partir des échantillons primaires. Puis, à partir de l'extrait, la PCR en temps réel se déroule en plusieurs étapes (42) (43) (Figure 9) :

- Dénaturation de l'ADN : séparation des doubles brins de la séquence d'ADN en simples brins, par augmentation de la température.
- Hybridation : les amorces s'hybrident au niveau de chaque simple brin dénaturé à une température spécifique de la séquence ciblée.
- Élongation : l'ADN polymérase synthétise l'intégralité du brin complémentaire de la séquence ciblée. À chaque fois qu'un brin complémentaire est synthétisé, l'activité 3'exonucléasique de l'ADN polymérase va hydrolyser la sonde et libérer le fluorochrome.

Ces trois étapes correspondent à un cycle qui sera répété plusieurs fois sur un automate (thermocycleur) afin de permettre l'amplification de l'ADN. Plus les cycles de répliation s'enchainent, plus la quantité d'ADN va augmenter. L'augmentation de l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN produit durant la réaction. Une courbe de fluorescence est établie et on détermine le cycle de température (Ct) à partir duquel la courbe se forme, et qui correspond à un nombre de cycles minimum où l'ADN est détectable. Plus l'ADN est détectable tôt (ce qui correspond à un Ct bas), plus la quantité d'ADN présente dans l'échantillon est importante (Figure 10).

On peut ainsi quantifier l'ADN amplifié, grâce à une gamme d'étalonnage qui exprime le nombre de copies virales/mL en fonction du Ct. Le Ct de l'échantillon est converti en copies/mL, qui

correspond à la charge virale. La quantification de la charge virale permet d'évaluer la cinétique de l'expression virale d'un patient et ainsi d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique, notamment chez les patients transplantés. Il existe également un standard international WHO de quantification qui permet de convertir les résultats en UI/mL.

Une étude de 2012 (44) a répertorié les différentes techniques de PCR utilisées dans plusieurs laboratoires de France. Certains d'entre eux utilisaient des trousse commerciales : R-gene (ARGENE®) ou CMV PCR Kit (Qiagen®) et d'autres, des PCR artisanales ciblant des gènes différents (UL83, UL123, US8, US18 ou la région HXLF4).

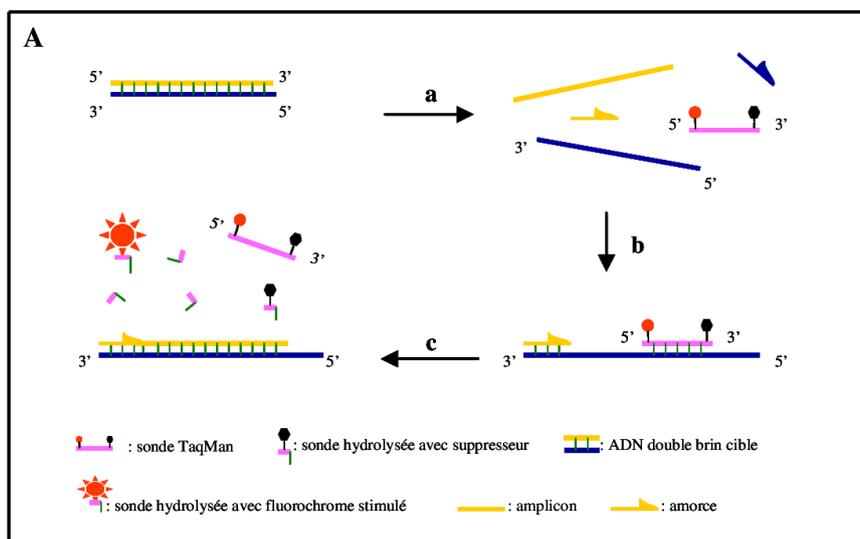


Figure 9 : Principe de la PCR en temps réel avec sonde (45)

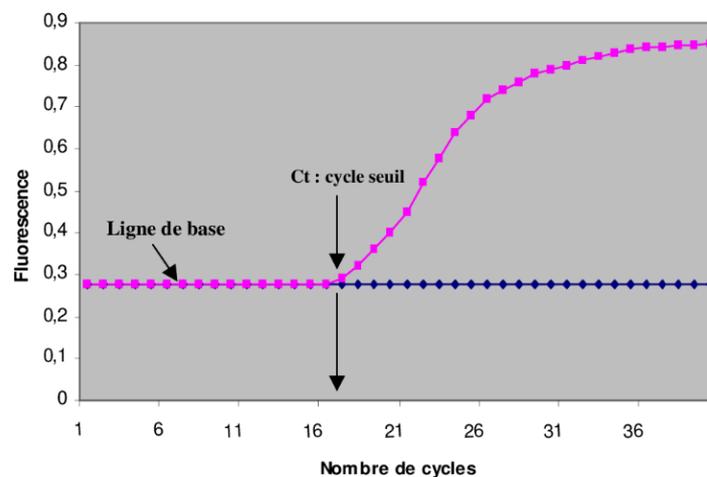


Figure 10 : Modèle graphique de la PCR en temps réel (45)

4. Examen histopathologique

Pour le diagnostic de la maladie invasive à CMV dans les tissus, l'examen histologique des échantillons de biopsie est essentiel. Il se fait par l'examen microscopique d'un fragment tissulaire avec la recherche de signes inflammatoires, de l'effet cytopathique du virus (responsable de la formation de cellules à inclusions intranucléaires) et de la présence d'antigènes ou d'ADN spécifiques du CMV. Pour confirmer la présence du CMV dans les tissus, l'ADN du CMV peut être mis en évidence par hybridation in situ, par exemple à l'aide d'une sonde ADN biotinylée, ou par PCR CMV effectuée sur coupes de tissus incluses en paraffine (6)(46).

C. PARTICULARITES DIAGNOSTIQUES

1. Dans le cadre de la grossesse

a) Infection maternelle

Le statut sérologique de la femme enceinte n'est pas déterminé de manière systématique car le dépistage n'est pas recommandé en France, bien que l'infection congénitale à CMV soit un problème de santé publique (40)(47). Mais il est tout de même souvent réalisé afin de détecter les primo-infections durant la grossesse et de les dater à l'aide de l'avidité des IgG. Pour la détection des IgM, les techniques d'immunocapture seront privilégiées car elles limitent le risque de réactions faussement positives, pouvant être liées à la présence de facteur rhumatoïde.

Si une première sérologie évoque une primo-infection, il est nécessaire de faire un contrôle sérologique sur un 2^{ème} prélèvement à 15 jours d'intervalle pour confirmer cette primo-infection (20). Une fièvre ou des anomalies échographiques doivent faire suspecter une primo-infection maternelle au CMV.

La datation de la primo-infection présente un intérêt majeur au 1^{er} trimestre de grossesse. En effet, une avidité forte au 1^{er} trimestre de grossesse correspond à une phase aiguë virémique de la primo-infection maternelle à priori antérieure au début de grossesse, donc avec un risque faible de transmission materno-fœtale de l'infection à CMV. En revanche, une faible avidité au 1^{er} trimestre suggère une phase aiguë de primo-infection maternelle survenue au cours de la grossesse, donc à un risque important de transmission de l'infection maternelle au fœtus (40).

Il n'existe pas de standardisation des tests de dépistage entre les différents laboratoires d'analyses médicales, ce qui peut impacter l'interprétation des résultats notamment pour la datation. En cas de résultats douteux, il est souhaitable que la mesure d'avidité soit contrôlée et interprétée par un laboratoire spécialisé pour éviter les erreurs diagnostiques (40).

b) Infection fœtale

La mise en évidence d'un virus sur un prélèvement fœtal atteste du diagnostic d'infection congénitale. L'infection fœtale peut être diagnostiquée par la détection de l'ADN du CMV dans le liquide amniotique, idéalement après la 21^{ème} semaine d'aménorrhée et au moins 6 semaines après la première sérologie maternelle positive. La PCR en temps réel est la méthode de référence avec une spécificité de 100% et sensibilité de 95% (28).

L'imagerie fœtale par échographie joue un rôle important également car elle permet de mettre en évidence un retard de croissance fœtale, une microcéphalie et des anomalies structurelles du cerveau (21)(48).

Le diagnostic prénatal n'élimine pas le risque d'infection congénitale, c'est pour cela que le nouveau-né devra faire l'objet d'un dépistage postnatal.

c) Infection du nouveau-né

L'infection maternelle ou fœtale n'entraîne pas toujours une atteinte clinique chez le nouveau-né. Mais la recherche du CMV à la naissance est systématiquement faite lors de la présence d'une primo-infection durant la grossesse, d'anomalies à l'échographie compatibles avec une infection congénitale à CMV ou de signes évocateurs à la naissance (21).

Le diagnostic d'infection congénitale est souvent démontré par la présence de CMV dans l'urine ou la salive au cours des trois premières semaines de vie, par technique PCR, avec une bonne sensibilité et spécificité (40)(49). Le prélèvement de salive est plus pratique à réaliser mais une PCR positive au niveau salivaire doit toujours être confirmée par un prélèvement dans les urines (50). La PCR en temps réel dans le liquide amniotique, les urines et la salive du nouveau-né, n'était pas inscrit dans la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) d'après le rapport de l'HAS de 2015 (40), mais a obtenu le remboursement depuis 2019 en cas de suspicion d'infection congénitale à CMV.

Devant un retard psychomoteur ou une surdité chez l'enfant observés de manière rétrospective, il est possible de détecter le virus par PCR à partir du sang séché conservé sur les cartes de Guthrie, permettant d'affirmer l'infection congénitale, en tenant compte de la sensibilité limitée de ce test (28)(32).

2. Chez les patients transplantés

Après avoir évalué le statut sérologique du donneur et du receveur, il est important de surveiller la charge virale sanguine à partir du sang total ou du plasma. La surveillance virologique est recommandée en l'absence de prophylaxie pendant environ 3 mois suivant la greffe et plus longtemps pour les patients à risque, en cas de GVH, d'immunodépression sévère ou lors d'une primo-infection à CMV dans les 100 premiers jours post-greffe. Elle n'est pas systématique si une prophylaxie est mise en place (51).

Les PCR quantitatives sont recommandées pour suivre l'évolution de la charge virale CMV et prédire le développement d'une maladie à CMV. Les résultats doivent être exprimés en UI/mL. Lorsque la charge virale est d'emblée très élevée, un traitement est immédiatement mis en place. En revanche lorsque le résultat est douteux, il est nécessaire de réaliser une cinétique de la charge virale, sur au moins deux prélèvements consécutifs, dans les mêmes conditions (28). Pour conclure à une augmentation significative de la charge virale, il est recommandé d'avoir une variation de la charge virale dépassant 0,5 log₁₀ UI/mL (triplement) (51).

Il est important également de rechercher en parallèle le virus dans l'organe atteint. La détection du CMV par PCR dans le LCR ou les prélèvements ophtalmiques est suffisante. Mais d'autres localisations nécessitent une confrontation aux données anatomo-pathologiques (46). La majorité des maladies tissulaires invasives à CMV chez les receveurs concernent le tractus gastro-intestinal et leur diagnostic est orienté par la clinique et l'examen endoscopique. Le diagnostic est étayé par la détection du CMV dans le sang périphérique (bien qu'il ne soit pas toujours présent chez les patients transplantés CMV R+) et confirmé par la démonstration du CMV dans les tissus par hybridation in situ en histopathologie, culture ou PCR des échantillons de tissus (21)(32).

Suite à une greffe de CSH, il est recommandé de suivre la charge virale toutes les semaines pendant 100 jours (52). Les PCR en temps réel dans le cadre d'un suivi d'allogreffe sont inscrites depuis 2015 dans le NABM et sont remboursées depuis février 2019 (40).

VII. TRAITEMENTS ET MECANISMES DE RESISTANCE

A. MOLECULES ANTIVIRALES DISPONIBLES

Tous les traitements disponibles utilisés contre les *Herpesviridae*, sont virostatiques (non virucides) et n'ont pas d'activité sur les virus en latence. Ils inhibent tous au final l'ADN polymérase virale à des concentrations inhibitrices variables et sont tous tératogènes chez l'animal sauf l'aciclovir.

1. Ganciclovir (CYMEVAN®) et Valganciclovir (ROVALCYTE®)

Le spectre d'activité du ganciclovir (GCV) in vitro inclue le CMV, les virus herpes-simplex 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2), les herpès virus humains 6, 7 et 8 (HHV-6, HHV-7, HHV-8), le virus d'Epstein-Barr (EBV), le virus varicelle-zona (VZV) et le virus de l'hépatite B. Les études cliniques ont été limitées à l'évaluation de l'efficacité chez des patients atteints d'une infection à CMV.

a) Mécanisme d'action

Le GCV est la principale molécule antivirale utilisée pour le traitement du CMV. C'est un analogue de la 2'désoxyguanosine, qui doit subir trois phosphorylations pour être actif. La première phosphorylation est effectuée par une protéine kinase d'origine virale pUL97 puis les deux autres phosphorylations sont prises en charge par des kinases cellulaires. Le ganciclovir-triphosphate exerce son activité antivirale en inhibant la synthèse de l'ADN polymérase virale pUL54 de manière sélective et compétitive. L'analogue nucléosidique s'incorpore dans l'ADN viral, stoppe l'élongation de la chaîne d'ADN, interrompant ainsi la réplication virale (53)(54)(55)(56).

Le valganciclovir (VGCV) est une prodrogue, dérivé ester du GCV, nécessitant une étape d'hydrolyse et a donc le même mécanisme d'action que le GCV (53)(55)(57).

b) Pharmacocinétique et pharmacodynamie

Le GCV a une faible biodisponibilité par voie orale et doit donc être administré par voie intraveineuse (IV). La voie intraoculaire est une alternative pour les infections oculaires. Afin de pallier à la faible biodisponibilité du GCV par voie orale, le VGCV a été développé et présente une biodisponibilité de l'ordre de 60% (57)(58)(55).

Le GCV est éliminé majoritairement au niveau rénal par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire sous forme inchangée dans les urines. La demi-vie est courte, entre 3 et 4h avec une atteinte de la concentration maximale à $T_{max} = 1h$ et une atteinte de l'équilibre en moins de 24h. Cette molécule présente un volume de distribution (V_d) autour de 30-70L et diffuse rapidement au niveau tissulaire avec une faible liaison aux protéines plasmatique (1%). La concentration inhibitrice 50% (CI50) est comprise entre 0,75 mg/L et 2 mg/L (ou entre 2,5 μM et 8 μM). L'efficacité est corrélée à l'ASC (aire sous la courbe) qui est autour de 40-50 mg/L/h (55).

Les effets indésirables sont majoritairement hématologiques avec une leucopénie, thrombopénie ou anémie, lui conférant une toxicité hématologique. On peut également retrouver des diarrhées et une néphrotoxicité. C'est pourquoi il est important d'adapter la posologie à la fonction rénale.

Le suivi thérapeutique par dosage des concentrations plasmatiques peut être intéressant chez certaines populations ayant des facteurs de variabilité pharmacocinétique individuels (59):

- Poids : augmentation des concentrations plasmatiques par diminution du débit de filtration glomérulaire (DFGe) si l'indice de masse corporelle (IMC) est élevé
- Sexe : baisse du V_d chez la femme
- Âge : baisse du DFGe si > 65 ans
- Associations médicamenteuses : par exemple le Bactrim® diminue la clairance rénale du GCV et il faut faire attention aux autres molécules néphrotoxiques
- Malabsorption du VGCV dans certaines maladies (mucoviscidose, Crohn, ...)
- Fonction rénale perturbée : augmentation de la demi-vie, corrélée à la créatinine sérique
- Dialyse : diminution de 50% des taux plasmatiques après mise sous dialyse

Les concentrations plasmatiques en GCV habituellement observées en période résiduelle sont entre 0,5 et 2 $\mu g/mL$ dans le cas des infections non graves. Lors d'un traitement prophylactique il est préférable d'être $> 0,5 \mu g/mL$ et en cas de réactivation $> 1 \mu g/mL$. En cas d'infections graves, des concentrations $> 2 \mu g/mL$ sont attendues (60).

c) Indications

Le GCV est indiqué dans le traitement des infections à CMV chez les patients immunodéprimés (SIDA, immunodépressions iatrogènes associées à la greffe de CSH, de moelle osseuse ou d'un organe solide) et en prévention des infections à CMV chez les patients présentant

une immunosuppression induite par un traitement médicamenteux (notamment à la suite d'une transplantation). Le GCV reste la molécule de choix, en 1^{ère} ligne, pour le traitement de l'infection à CMV chez les transplantés (61).

2. Cidofovir (VISTIDE®)

a) Mécanisme d'action

Le cidofovir (CDV) est un analogue acyclique de la désoxycitidine monophosphate. Contrairement au GCV, le CDV doit subir seulement 2 phosphorylations pour être actif. Sa phosphorylation n'implique que des kinases cellulaires et ne nécessite pas l'intervention de la kinase pUL97. Il inhibe également de manière compétitive l'ADN polymérase virale pUL54 (55).

b) Pharmacocinétique

Le CDV est un puissant inhibiteur de l'ADN polymérase virale, comme en témoigne sa CI50 de 0,5 à 1 µM sur les souches sensibles. Il est administré exclusivement par voie intraveineuse, mais présente une demi-vie longue entre 17 à 65 jours selon les études et les sujets, ce qui permet d'espacer les administrations. Le principal effet indésirable est une toxicité rénale avec une protéinurie et une hypercréatinémie, nécessitant une bonne hydratation et l'administration de probénécide (un uricosurique). D'autres effets indésirables tels que l'alopecie, rash cutané, uvéites, neuropathie périphérique, ont été plus rarement décrits (55)(57).

Le développement d'un promédicament, ester du CDV, le brincidofovir (BCV), a permis d'améliorer la biodisponibilité par voie orale et d'éviter la toxicité rénale du médicament d'origine. Il a conduit à une alternative plus sûre pour le traitement des infections à CMV résistantes aux médicaments de première intention chez les patients immunodéprimés (62). Le principal effet indésirable pour cette molécule est de type digestif. Une formulation intraveineuse du BCV a été développée pour limiter les effets secondaires gastro-intestinaux du médicament (63).

c) Indications

Le CDV est un médicament de seconde ligne pour lequel le laboratoire a demandé le retrait d'AMM depuis septembre 2014, face à des difficultés financières de production et devant l'existence d'alternatives thérapeutiques. Sa principale indication était le traitement des rétinites à CMV chez les patients VIH au stade SIDA, ne présentant pas d'insuffisance rénale (64). Mais il est également actif contre l'HSV, le VZV, l'HHV6 et d'autres virus à ADN (comme les polyomavirus et les adénovirus) (57).

Le BDV faisait l'objet d'essais cliniques de phase III depuis 2014, pour une utilisation en prophylaxie contre le CMV chez les transplantés, et disponible sous ATU en France (65). Mais devant l'échec des études et une augmentation du nombre d'effets indésirables graves, les essais cliniques ont été interrompus en 2019 et l'ATU a été supprimée en février 2021.

3. Foscarnet (FOSCAVIR®)

a) Mécanisme d'action

Le foscarnet (FOS), analogue de pyrophosphate inorganique, exerce son activité antivirale par inhibition directe et réversible de l'ADN polymérase virale. Il ne nécessite pas d'activation par phosphorylation par la thymidine kinase ou d'autres kinases cellulaires. Il inhibe la pUL54 en se liant sur le site de liaison du pyrophosphate et bloque ainsi le clivage du groupement pyrophosphate du dNTP, prévenant de cette façon son incorporation sur le brin d'ADN en élongation (55)(57).

b) Pharmacocinétique et pharmacodynamie

La CI50 du FOS est très variable, de 40 à 400 µM. Son activité est synergique de celle du GCV, il est donc possible d'utiliser ces deux molécules en association. Le FOS est administré par voie IV exclusivement du fait de sa faible biodisponibilité. La demi-vie est plutôt courte et varie entre 2,4 et 6 heures. Les principaux effets indésirables touchent la fonction rénale (néphrotoxicité tubulaire, perturbations électrolytiques). L'administration doit s'accompagner d'une hydratation importante et d'une surveillance accrue du DFG. Des troubles digestifs à type de nausées et vomissements sont également rapportés, ainsi que des ulcérations uro-génitales par mécanisme caustique (55).

c) Indications

Le FOS est un agent antiviral à large spectre qui inhibe in vitro, à des concentrations n'affectant pas la croissance cellulaire normale, tous les virus humains connus du groupe herpès. Mais il a une activité particulièrement sur les souches HSV mutantes, présentant un déficit en thymidine kinase, et certains rétrovirus y compris le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le FOS inhibe également in vitro l'ADN polymérase virale du virus de l'hépatite B.

Cette molécule est le plus souvent administrée en 2^{ème} intention chez les patients ne répondant plus à un traitement de 1^{ère} intention ou qui développent une résistance au GCV. Elle est cependant préférée au GCV chez les patients neutropéniques du fait de l'hématotoxicité du GCV (55)(56).

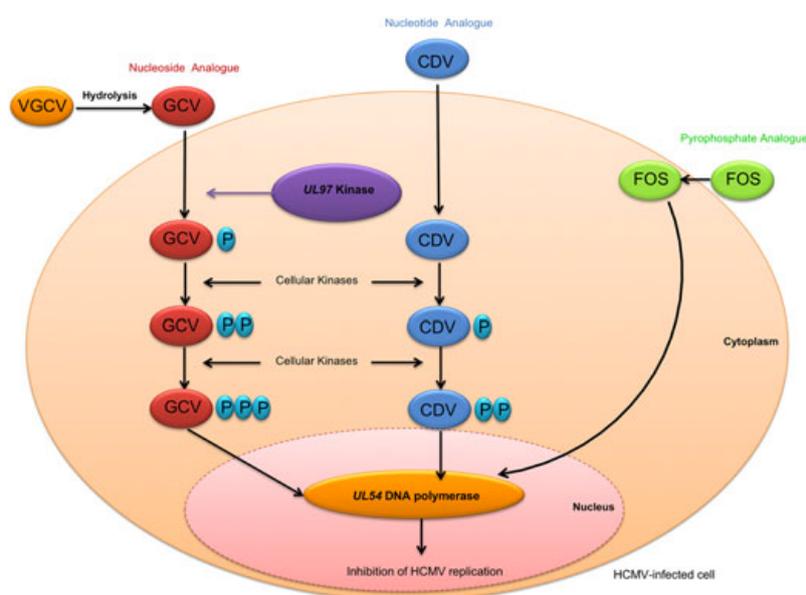


Figure 11 : Mécanismes d'action des antiviraux anti-CMV

4. Aciclovir et Valaciclovir

L'aciclovir (ACV) est également un analogue 2'désoxyguanosine comme le GCV dont il est très proche structurellement. Le mécanisme d'action de l'ACV vis-à-vis du cytomegalovirus est identique à celui du GCV mais son efficacité est moindre. L'ACV nécessite aussi d'être triphosphaté par une kinase virale puis des kinases cellulaires, pour être actif. L'activité de l'ACV est donc dépendante de la protéine kinase pUL97.

Du point de vue pharmacocinétique, l'ACV et sa prodrogue le Valaciclovir ont une biodisponibilité par voie orale respectivement de 15 % et de 54 %. Leur demi-vie plasmatique est de 2 à 3 heures et leur élimination est majoritairement rénale. L'ACV est la plupart du temps bien toléré. Mais en cas d'administration à fortes doses, on peut retrouver une néphrotoxicité et neurotoxicité.

Ces molécules sont utilisées uniquement dans le traitement prophylactique des infections à CMV chez les sujets immunodéprimés, du fait de leur plus faible efficacité sur le CMV (6)(55)(57).

5. Autres molécules

a) Fomivirsen (VITRAVENE®)

Le fomivirsen est un ARN de 21 nucléotides complémentaire à une région de l'ARNmessenger du gène très précoce codant une protéine qui régule l'activité d'un grand nombre de promoteurs de gènes viraux et cellulaires. Le fomivirsen inhibe l'entrée du virus dans le cycle de réplication. Il est actif sur les souches résistantes au GCV, CDV et FOS. Cette drogue est spécifique contre le CMV, chez qui elle s'est avérée être efficace.

Elle est administrée exclusivement sous forme d'implants intravitréens du fait de sa faible biodisponibilité, dans le cadre du traitement des rétinites récemment diagnostiquées ou persistantes chez les sujets VIH au stade SIDA.

Ce composé n'est plus disponible en France car il a été retiré du marché européen en 2002 mais il reste disponible en Suisse et aux États-Unis (55).

b) Immunoglobulines intraveineuses (CYTOTECT®)

Les immunoglobulines sont parfois proposées seules ou en association avec la chimiothérapie antivirale sous forme d'immunoglobulines polyvalentes ou d'immunoglobulines spécifiques anti-CMV pour prévenir ou atténuer l'infection (55)(66). L'association ganciclovir + CYTOTECT® est souvent rencontrée chez les patients greffés pulmonaires.

B. NOUVELLES CIBLES ANTIVIRALES

Afin de palier à l'émergence des résistances des molécules habituellement utilisées contre le CMV, il a été nécessaire de rechercher des nouvelles cibles antivirales.

1. Inhibiteur du complexe terminase : Letermovir

Plusieurs molécules agissant sur le complexe terminase (principalement constitué de UL51, UL56 et UL89) ont été découvertes. Le complexe de terminase virale est impliqué dans le clivage et l'emballage de l'ADN viral dans la capsid. Le letermovir (LTV), aussi appelé AIC246, est le premier de cette classe des inhibiteurs du complexe terminase. Comme la plupart des inhibiteurs de ce complexe, le LTV est sélectif pour le CMV (67). Il montre une certaine efficacité contre les souches virales résistantes aux antiviraux actuellement approuvés, mais il est inactif contre tous les autres herpès virus. Il est généralement bien toléré et présente une exposition élevée et durable chez les sujets humains, ce qui permet une administration unique et quotidienne (68). En effet, la CI50 est très faible (0,004 μM), comparée à celle du GCV, ce qui prouve son efficacité. De plus, il n'existe pas de résistance croisée avec les autres anti-CMV.

Le LTV a été approuvé par la FDA pour la prophylaxie des infections à CMV chez les receveurs de cellules souches allogènes (69). Il possède actuellement l'ATU pour le traitement préventif chez les patients à haut risque receveurs de CSH (R+). La tolérance au niveau hématologique et néphrologique est plutôt bonne, avec une persistance de quelques troubles digestifs. Il n'existe pas à ce jour d'indication pour le traitement curatif.

2. Maribavir

Le maribavir (MBV), a pour cible la protéine kinase UL97. Il appartient à une nouvelle classe d'analogues nucléosidiques, les dérivés benzimidazolés L-ribonucléosides. Il inhibe le passage extranucléaire des capsides et indirectement, la synthèse d'ADN viral par blocage de la phosphorylation par l'UL97 de la protéine pUL44, elle-même accessoire de la polymérase virale pUL54. Des études in vitro ont montré que le MBV inhibe la réplication des souches de CMV à des concentrations 7 à 10 fois inférieures à celles du GCV. Il est actif sur les souches résistantes aux GCV,

CDV et/ou FOS avec une biodisponibilité de 30 à 40 % après administration orale. Mais il est inactif sur l'HSV et le VZV (55)(70).

C. STRATEGIES THERAPEUTIQUES

1. Infection congénitale

a) Au cours de la grossesse

Il n'y a pas de thérapie validée à ce jour. Pour le traitement et la prévention de l'infection fœtale à CMV, deux approches sont en cours d'évaluation : les immunoglobulines (Ig) et les antiviraux. Le traitement par Ig a montré dans plusieurs études une efficacité, avec un taux plus faible d'infection fœtale après administration d'Ig, mais les données sont encore insuffisantes pour les recommander (71). Le GCV, le FOS et le CDV quant à eux ne sont pas recommandés pendant la grossesse du fait de leur tératogénicité. Le Valaciclovir serait la seule molécule n'ayant pas montré de tératogénicité et étant responsable d'une diminution de la charge virale fœtale sous traitement de la mère (40).

b) À la naissance

Chez le nouveau-né atteint, l'utilisation du GCV et du VGCV a montré un bénéfice et une amélioration des atteintes neurologiques et de la surdité. Il est recommandé de traiter avec du VGCV oral (16 mg/kg 2 fois par jour) les enfants avec une symptomatologie modérée à sévère pendant 6 mois et le traitement doit être initié dès le 1^{er} mois de vie (50).

Tous les enfants confirmés à la naissance comme ayant contracté une infection congénitale à CMV doivent être suivis régulièrement, notamment au niveau auditif, car la surdité congénitale peut apparaître plusieurs mois après.

2. Infections chez les patients transplantés

Plusieurs stratégies sont possibles : le traitement prophylactique, le traitement préemptif et le traitement curatif (72).

Un traitement prophylactique peut être prescrit pour éviter la survenue d'une infection à CMV chez les patients immunodéprimés. Les molécules antivirales les plus utilisées dans cette

indication sont le valaciclovir (posologie chez l'adulte : 2000 mg 4 fois par jour), le ganciclovir (posologie : 5 mg/kg 1 fois par jour) ou le valganciclovir (posologie chez l'adulte : 900 mg 1 fois par jour). La mise en place systématique d'un traitement prophylactique est recommandée chez les patients à haut risque de maladie sévère à CMV (receveurs de poumons et d'intestin, les patients D+/R-, les patients sous immunosuppresseurs) et permet de réduire le risque d'infection à CMV post-greffe. Le traitement prophylactique n'est pas ou peu utilisé chez les patients allogreffés.

Le traitement préemptif consiste à effectuer une surveillance régulière de la charge virale par PCR (hebdomadaire ou bimensuelle), au cours des premiers mois après la transplantation. Si la virémie dépasse un seuil prédéfini, et que, malgré une diminution du traitement immunosuppresseur, la charge virale persiste toujours à des taux élevés, un traitement antiviral pourra être instauré. Cette stratégie sera le plus souvent choisie après des greffes de CSH.

Le traitement curatif a pour objectif d'obtenir une diminution de la charge virale sanguine d'au moins 1 log copies ou UI/ml durant les 2 premières semaines de traitement. Après disparition des signes cliniques et l'obtention de 2 PCR CMV sanguines successives indétectables (à au moins 48h d'intervalle), il sera possible d'arrêter le traitement. Le GCV est le médicament de première intention pour un traitement curatif et le VGCV en 2ème intention. Les posologies des antiviraux sont adaptées à la fonction rénale du patient. Les doses administrées en curatif sont classiquement le double de la dose utilisée en prophylaxie.

D. RESISTANCES AUX TRAITEMENTS

Malgré la mise en place d'un traitement anti-CMV, il est possible que chez certains patients une réplication virale persiste, associée à une absence d'amélioration clinique, faisant évoquer une non-réponse au traitement.

Dans un premier temps, il faut envisager l'hypothèse de la mauvaise observance. Si le traitement est pris correctement, il faut évoquer un sous-dosage du médicament, qui peut être dû à la présence de facteurs de variabilité individuels. Le dosage plasmatique permettra de voir si les concentrations sont comprises ou non dans les cibles thérapeutiques. Si cette hypothèse est écartée, il faudra envisager la présence d'une souche résistante.

Des critères ont été définis pour indiquer la recherche de résistance aux antiviraux (7)(73) :

- Persistance de la virémie après minimum 3 semaines de traitement bien conduit.

- Diminution de la charge virale de moins de 0,5log par semaine ou augmentation de la charge virale ou persistance d'une charge virale élevée après 2 semaines de traitement.
- Aggravation clinique.

À noter que le rapport de la conférence de consensus internationale de 2017, ajoute la notion d'exposition dans les critères pour la recherche de résistance au GCV : « Plus de six semaines d'exposition au GCV et échec thérapeutique après plus de deux semaines de traitement à dose curative » (51). Ceci permet d'anticiper la recherche de résistance en cas d'exposition préalable par prophylaxie.

C'est à la fin des années 80, que les premières souches résistantes au GCV ont été observées (74), en lien avec l'augmentation de l'utilisation des traitements prophylactiques à cette période. L'émergence de souches de CMV résistantes aux antiviraux est un risque majeur au cours des traitements prolongés notamment chez les patients immunodéprimés et peut conduire à l'échec thérapeutique.

Avant la mise sous traitement antiviral, les souches sauvages coexistent avec les souches mutantes. Le traitement va bloquer la réplication des souches virales sensibles. Mais si la pression de sélection est maintenue, les souches virales portant une ou plusieurs mutations de résistance deviennent majoritaires.

Les résistances aux traitements peuvent être caractérisées par une approche phénotypique ou bien génotypique.

1. Tests phénotypiques

L'approche phénotypique consiste à cultiver le virus en présence de concentrations croissantes d'un antiviral, afin de déterminer la concentration du médicament qui inhibe 50 % de la croissance virale (CI50) ou 90% (CI90).

Le test « plaque reduction Assay » est le « gold standard » de l'évaluation phénotypique de la sensibilité des agents antiviraux (75). Ce test consiste à inoculer, dans différents puits, un inoculum viral standardisé que l'on va laisser cultiver pendant quelques jours, en présence de dilutions de médicaments. Ensuite, on regarde le pourcentage de croissance virale par rapport à la croissance dans un puit témoin sans antiviral, afin de déterminer la CI50.

D'autres tests ont été développés. Ils sont basés soit sur la détection de l'ADN du CMV par hybridation ou PCR quantitative, soit sur la détection d'antigènes spécifiques du CMV par dosage

immuno-enzymatique, cytométrie de flux, dosage par immunofluorescence ou dosage par immunoperoxydase.

Pour le GCV, les augmentations de la CI50 de 2 à 5 fois peuvent être considérées comme faibles, de 5 à 15 fois comme modérées (pouvant suggérer la présence d'une seule mutation au niveau de l'UL97), et plus de 15 fois comme un niveau élevé (pouvant suggérer l'effet combiné des mutations UL97 et UL54) (51)(76).

Cette manière d'évaluer la sensibilité aux antiviraux présente de nombreux inconvénients, puisque d'une part, il est nécessaire de cultiver la souche, et d'autre part, la variabilité inter-laboratoire est problématique. En effet, il existe de nombreuses techniques qui sont souvent mal standardisées et dont il est difficile de comparer les résultats et de déterminer une valeur seuil de la CI50. Les tests phénotypiques prennent beaucoup de temps, du fait de la culture lente du CMV, et peuvent manquer de sensibilité notamment pour la détection d'une résistance de faible niveau (77).

2. Tests génotypiques

L'approche génotypique permet de détecter les mutations virales associées à des résistances. Ces tests sont basés sur le séquençage de l'ADN des gènes viraux qui sont connus pour être impliqués dans la résistance aux traitements anti-CMV (principalement UL97 et UL54). Ils peuvent être réalisés directement à partir des échantillons primaires (généralement sur plasma ou sang total), contrairement à l'analyse phénotypique qui nécessite de travailler sur le virus cultivé, réduisant considérablement le temps d'obtention des résultats (77).

Le séquençage de l'ADN est la méthode de choix pour détecter la présence de mutations sur l'UL54 et UL97, en raison du grand nombre de mutations signalées sur ces gènes. Il nécessite au préalable une extraction de l'ADN puis une amplification par PCR. Il est conseillé d'utiliser des échantillons dont la charge virale est supérieure à 1000-2000 copies ou UI/mL (78).

Les approches génotypiques sont rapides et sensibles, mais l'interprétation des résultats n'est pas toujours facile, notamment pour différencier une mutation associée au polymorphisme naturel, d'une mutation liée à une résistance.

a) Analyse par endonucléase de restriction

Une des premières méthodes génotypiques utilisées est la détection de mutations par des changements dans les séquences de reconnaissance des endonucléases de restriction de l'UL97 amplifiées. Ces tests rapides RFLP (restriction fragment length polymorphism) ont été développés puisqu'environ 70% des résistances aux traitements anti-CMV, contiennent des mutations sur l'un des trois codons de l'UL97 (codons 460, 594 et 595). L'avantage de ce test était sa rapidité, mais devant l'émergence de nouvelles résistances, il est nécessaire de séquencer le gène UL97 dans son intégralité (79). Cette technique n'est à ce jour plus utilisée.

b) PCR en temps réel

La PCR en temps réel avec analyse de la courbe de fusion fait partie des techniques existantes pour identifier les mutations de résistance au niveau de l'UL97. Des sondes d'hybridation spécifiques à chaque mutation sont marquées avec différents colorants fluorescents. Les modifications de la courbe de fusion induites par la présence de mutations sont analysées après amplification par PCR. Il est possible d'amplifier un très faible nombre de copies d'ADN sans culture cellulaire et plusieurs mutations peuvent être détectées simultanément en utilisant différents marqueurs de colorants. Mais des polymorphismes proches des mutations connues peuvent affecter la courbe de fusion (80).

c) Séquençage par la méthode Sanger

La méthode Sanger est la première technique de séquençage ayant été développée en 1977 (81). Elle est précédée d'une étape d'amplification par PCR des gènes d'intérêt (principalement UL97 et UL54).

Cette technique comporte plusieurs étapes (82):

- Préparation d'un mélange avec l'ADN à séquencer (simple brin), des amorces, l'ADN polymérase, des désoxynucléotides (dNTP).
- Hybridation des amorces.
- Répartition du mélange réactionnel en 4 tubes contenant des didésoxynucléotides (ddNTP) différents (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) chacun marqué par des fluorochromes de couleurs différentes.

- Polymérisation dans chacun des tubes, avec une incorporation de temps en temps d'un ddNTP à la place d'un dNTP qui stoppe la polymérisation. Des produits de tailles différentes seront ainsi présents dans le tube.
- Chaque mélange réactionnel est déposé dans un puit d'une plaque d'électrophorèse. Les brins les plus courts migreront plus vite.
- Grâce au marquage par les fluorochromes, tous les fragments de différentes tailles sont révélés sur le gel d'électrophorèse à la fin de la migration (Figure 12).
- La succession des bandes colorées sera convertie en une succession de nucléotides correspondant à notre séquence d'intérêt.

La méthode Sanger originale nécessite du temps et n'est pas adaptée pour les brins d'ADN de grandes tailles.

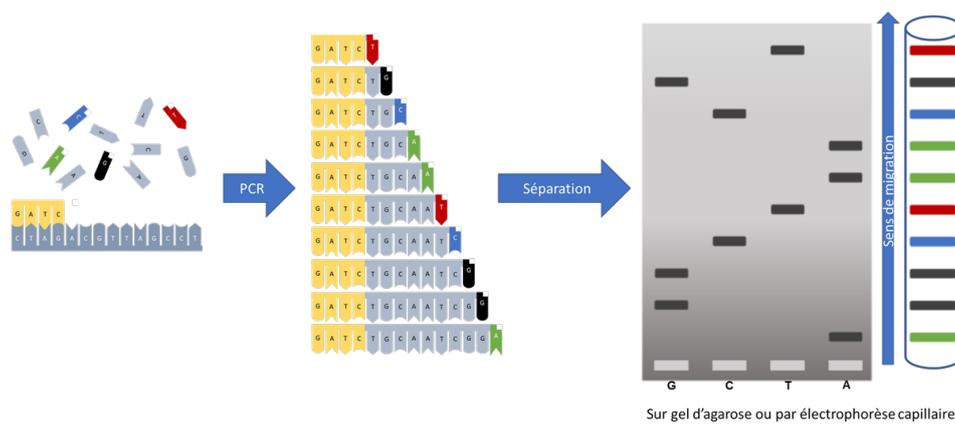


Figure 12 : Séquençage méthode Sanger

L'électrophorèse capillaire va permettre, tout en gardant le même principe de séquençage, d'augmenter considérablement la vitesse de séparation électrophorétique des fragments sur gel de polyacrylamide. De plus, cette technique peut être automatisée. La fluorescence émise étant de longueur d'onde différente pour chaque nucléotide marqué, la séquence va être représentée par un fluorogramme sous forme de succession de pics de couleurs différentes, chaque couleur correspondant à un nucléotide (Figure 13).

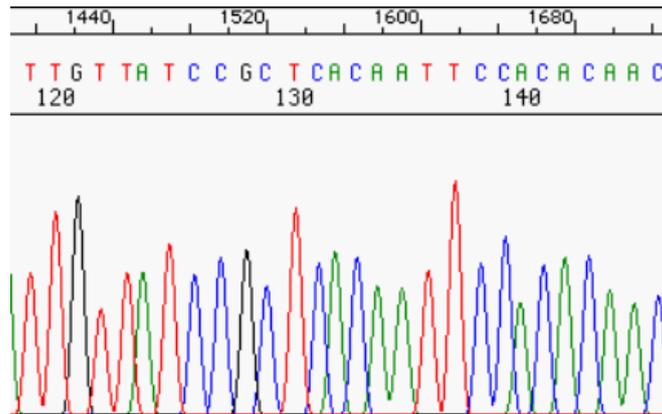


Figure 13 : Exemple de fluorogramme

Les séquences obtenues sont alignées à la séquence de référence du CMV et confrontées à une base de données automatisée, qui répertorie la majeure partie des mutations décrites. Les mutations de résistance aux antiviraux sont bien distinctes des mutations de polymorphisme présentes naturellement.

d) Séquençage par NGS (Sequencing Next Generation)

La nécessité d'un séquençage à plus haut débit des génomes de grandes tailles a déclenché le développement de nombreuses technologies de deuxième génération. On retrouve deux grands groupes de nouvelles technologies (83) :

- Le séquençage par hybridation : hybridation de petites séquences chevauchantes sur une matrice
- Le séquençage par synthèse : il diffère du séquençage Sanger par la présence de reads (c'est à dire des fragments de plusieurs bases) beaucoup plus courts, avec généralement un taux d'erreur intrinsèquement plus élevé mais une couverture de lecture de séquence élevée afin d'obtenir une séquence précise basée sur l'identification d'une séquence consensus. Plusieurs techniques existent :
 - 454 pyrosequencing
 - Ion Torrent™
 - Illumina technology™

Nous évoquerons surtout la technique Ion Torrent™ puisque c'est la technique que nous avons utilisé pour notre travail.

Les réactions de séquençage se produisent dans des millions de puits recouvrant une puce semi-conductrice contenant des millions de pixels qui convertissent les informations chimiques en informations de séquençage. Tout d'abord, l'ADN est fragmenté par ionisation en fragments de 200 paires de bases environ, qui sont ensuite liés à des adaptateurs. Les fragments d'ADN sont fixés à une bille et sont amplifiés sur la bille par PCR, chaque bille correspondant à un clone amplifié. Ce processus permet à des millions de billes d'avoir chacune plusieurs copies d'une séquence d'ADN. Chaque bille est acheminée dans un puit sur la puce, de manière à ce qu'une seule bille puisse entrer dans un puit individuel. Lorsqu'on introduit des nucléotides dans le milieu réactionnel (un à la fois) et qu'un nucléotide est complémentaire au brin à séquencer, il va entraîner une libération d'ion H⁺ et donc provoquer une variation de pH qui sera détectée par un capteur. Entre chaque incorporation de nucléotide, une étape de lavage est faite. Si aucun nucléotide n'est incorporé, aucun pic de tension ne se produit.

Cette technique possède une profondeur de lecture importante (c'est à dire le nombre de nucléotides totaux des reads sur la taille du génome étudié), permettant de détecter plus facilement des variants de sous-populations.

3. Fréquence des résistances et facteurs de risque

Les principaux facteurs de l'émergence des résistances aux antiviraux sont l'exposition prolongée à un antiviral, le sous dosage de l'antiviral ou la présence d'une immunodépression importante. La résistance virologique représente 50% des étiologies de non-réponse aux traitements.

Chez les patients VIH, lorsque le taux de CD4 est très bas (< 50/mm³), l'incidence pouvait aller jusqu'à 20 % de résistance à tous les traitements anti-CMV. Mais plus récemment, grâce à l'efficacité des thérapies antirétrovirales, l'incidence a diminué à environ 5 % et la résistance du CMV aux antiviraux chez les patients VIH est un problème moins rencontré.

Actuellement, le risque de résistance est le plus élevé chez les patients transplantés et varie selon le type de greffe. Les patients avec un statut D-/R+ représente la population la plus à risque de développer des résistances aux traitements, surtout chez les transplantés pulmonaires. Des résistances chez les patients greffés de CSH sont rencontrées mais l'incidence est plus faible (80). Dans une étude réalisée entre 2006 et 2010 dans 33 centres répartis dans toute la France, sur une cohorte de 680 patients virémiques traités, 8,1% des patients transplantés d'organes solides avaient

des résistances aux antiviraux et 3,1% chez les patients greffés de CSH (7). Une autre étude réalisée entre 2012 et 2016 sur 371 patients virémiques, retrouve respectivement 7,1% et 1,1% de résistances aux antiviraux (Nouvel observatoire de la résistance virologique pharmacologique et immunologique : OrPhaViC).

Le nombre de demandes de recherches de résistance auprès du CNR a augmenté en 2017 et 2018 d'après le dernier rapport du CNR, témoignant d'une augmentation des cas de non-réponse aux traitements. En 2018, 423 génotypages pour 317 patients ont été réalisés et 141 montraient la présence d'une résistance (73). Les résistances étaient principalement retrouvées chez les patients transplantés du rein et des poumons et chez les patients greffés de CSH (Figure 14).

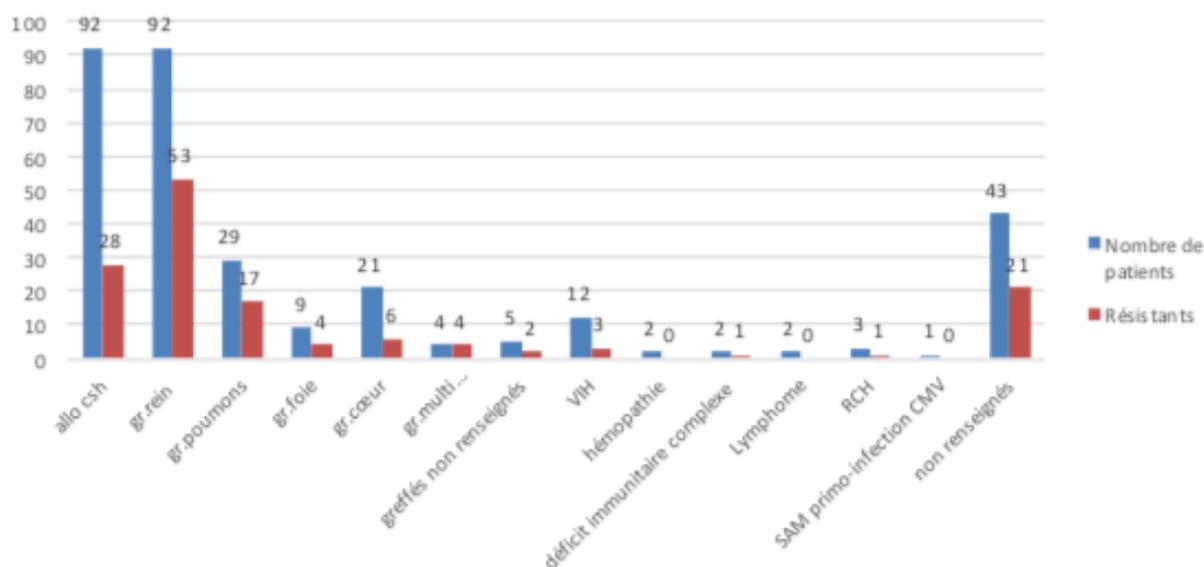


Figure 14 : Répartition des cas de résistances par pathologies

4. Mécanismes de résistance

Les principaux mécanismes de résistance sont dus à des mutations au niveau de l'UL97 (qui code pour la kinase virale) et UL54 (qui code pour l'ADN polymérase). D'après le rapport du CNR de 2019, en France, on retrouve majoritairement des mutations au niveau de l'UL97 (75% des cas), mais 24% des patients portent aussi des mutations au niveau de l'UL54, isolées pour certains, conférant des résistances croisées à deux ou trois antiviraux. Ceci souligne la nécessité d'utiliser des nouvelles molécules. On remarque quelques mutations de résistance au letermovir sur le gène UL56 (1%), correspondant au début de son utilisation en prophylaxie avec ATU en 2018.

a) Mutations sur l'UL97

La résistance au GCV a été décrite pour la première fois en 1986, à partir de la souche de référence AD169 qui a été mise en culture de manière successive en présence de GCV. Cette expérience a permis de mettre en évidence une souche résistante 759rD100 qui était 10 fois moins sensible que la souche de référence (84). Cette mutation était localisée sur l'UL97 et correspondait à une délétion des codons 590 à 593, responsable d'une forte diminution de la phosphorylation du GCV. Plus tard, la mutation M460I au niveau du site catalytique de l'UL97 a été mise en évidence et fait partie des mutations les plus fréquentes. Le rôle essentiel de l'UL97 dans la phosphorylation du GCV implique que toute mutation qui nuit à son activité confèrera une résistance au GCV et une résistance croisée à tout médicament qui dépend de l'UL97 pour la phosphorylation ou qui utilise l'UL97 comme cible virale. Une étude a montré la possibilité que l'ACV soit responsable de résistance croisée au GCV. Cette étude a été réalisée sur 3 isolats obtenus auprès de patients traités seulement par de l'ACV et qui ont montré une sensibilité diminuée au GCV (85).

L'UL97 est composé de plusieurs régions conservées (Figure 15) :

- Région I : du codon 337 au 345, qui correspond au site de liaison de l'ATP
- Région II : lysine du site catalytique (K355) commun à toutes les kinases
- Région III : glutamate E380
- Région VIB : du codon 453 au 462
- Région VII : du codon 481 à 483
- Région VIII : du codon 520 au 527
- Région IX : du codon 553 au 557, qui correspond au site de liaison du substrat

Au cours des dernières décennies, les mutations de l'UL97 les plus courantes conférant une résistance clinique au GCV étaient regroupées au niveau des codons 460, 520 et 590-607 avec notamment les substitutions d'acides aminés M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S/F/W et C603W (80)(86)(87). Ces mutations confèrent une augmentation de la CI50 de 5 à 15 fois, sauf 3 fois pour la mutation C592G. Au fil du temps, d'autres mutations de l'UL97 au niveau des codons 590-607 apparaissent pour conférer des niveaux variables de résistance au GCV. Des mutations rares ont été décrites plus récemment sur d'autres régions de l'UL97 : F342S, V356G, D456N, C480R, C518Y,

P521L, A613V, Y617del, E655K (88). Le mutant K355Q montre également une absence de l'activité de phosphorylation.

L'utilisation du maribavir (MBV), également inhibiteur compétitif de l'UL97, a provoqué l'apparition de mutations de l'UL97 regroupées autour du site de liaison de l'ATP, comme les substitutions d'acides aminés V353A, T409M et H411Y/N/L. Ces mutations ont été initialement observées in vitro et confèrent au MBV une CI50 9 à 80 fois supérieure, mais il n'y a pas de résistance croisée avec le GCV (88)(89). Des essais effectués sur l'UL97 ont montré que le MBV était un inhibiteur puissant et spécifique de l'autophosphorylation de l'enzyme de type sauvage mais pas de la version mutante L397R (70).

Récemment, il a été décrit que la mutation F342Y de la boucle p de l'U97 conférait une résistance croisée au MBV, après traitement antérieur par GCV (90) (91). De plus, une nouvelle mutation C480F détectée après un traitement au MBV, présente un phénotype de résistance de haut grade au MBV et de résistance croisée au GCV de bas grade (92).

Les mutations au sein de l'UL97 sont généralement les premières à apparaître chez les patients traités par GCV et se manifestent soit par des mutations ponctuelles, soit par des courtes délétions qui empêchent la phosphorylation du GCV, mais les autres fonctions de l'UL97 sont maintenues (77). Le FOS et le CDV présentent un intérêt vis à vis de ces souches résistantes, puisque leur activité est préservée. En revanche, ces molécules ne protègent pas du risque d'apparition de résistances au niveau de l'UL54.

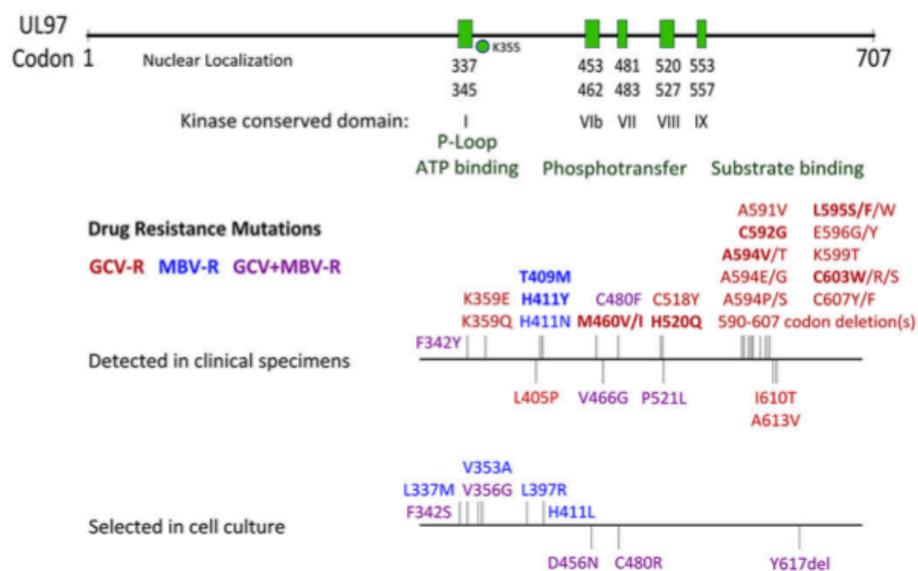


Figure 15 : Représentation des domaines conservés de l'UL97 et des différentes mutations retrouvées avec les plus fréquentes en gras

b) Mutations sur l'UL54

Les mutations au niveau de l'UL54 codant pour la polymérase virale sont moins fréquentes et apparaissent généralement plus tardivement. Les mutations sont retrouvées principalement au sein des domaines conservés.

La première souche résistante au GCV, 759rD100, s'est avérée contenir la mutation de l'UL97 dont nous avons parlé précédemment, mais aussi la mutation A987G dans la région V de la polymérase, qui confère une double résistance au GCV et au CDV (93).

Un grand nombre de mutations sur UL54 ont été retrouvées suite à l'analyse d'isolats présentant des résistances aux antiviraux. Ces mutations sont fréquentes in vivo après un traitement prolongé par GCV et peuvent être responsables de l'augmentation du niveau de résistance déjà conféré par des mutations sur UL97. En général, la présence de mutation sur l'UL54 sans mutation préalable au niveau de l'UL97 est rare mais a déjà été décrite (77).

Au niveau des domaines exonucléases et de la région V de l'UL54, on peut retrouver des mutations conférant la double résistance GCV-CDV et celles conférant la résistance au FOS sont concentrées dans et entre les régions II et III. Par exemple, la mutation N408K, conserve une aptitude à la croissance normale en culture cellulaire mais confère une augmentation de la CI50 de 3 à 4 fois pour la GCV et d'environ 20 fois pour le CDV. Certaines de ces mutations peuvent être responsable d'une faible résistance croisée au GCV. D'autres mutations tels que A834P et 981-2 confèrent une résistance modérée au GCV, à la FOS et au CDV.

Les résistances au niveau de l'UL54 sont beaucoup plus étendues sur l'ensemble du gène et nécessitent un séquençage sur une plus grande partie du gène (du codon 300 à 1000).

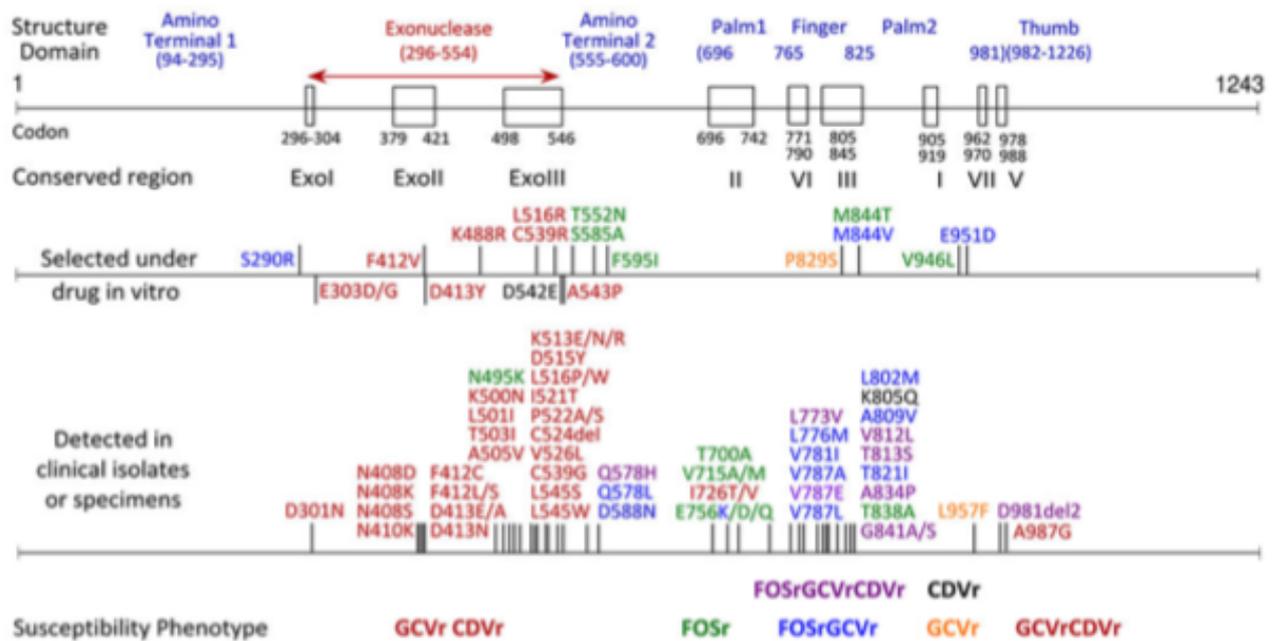


Figure 16 : Représentation des domaines conservés de l'UL54 et des différentes mutations retrouvées avec les plus fréquentes en gras

c) Mutations sur le complexe terminase

Les mutations au niveau du complexe terminase se retrouvent principalement sur les gènes UL56 et UL89. La principale caractéristique est que plusieurs substitutions différentes de nucléotides au niveau du codon 325 de l'UL56 confèrent une résistance absolue au LTV avec une augmentation de la CI50 aux alentours de 3000 fois. Cette résistance ne semble pas altérer la capacité de la réplication virale. De nombreuses expériences in vitro ont montré la diversité des mutations génétiques qui concernent ce gène (88)(87).

La détection de la résistance au LTV in vivo a commencé avec la découverte des mutations V236M et C325W sur l'UL56 au cours des essais cliniques. Il a été montré également des échecs thérapeutiques avec la présence des mutations E237G et R369T.

Aucune résistance croisée ne devrait survenir entre le LTV et les autres traitements anti-CMV actuels, étant donné que le mécanisme d'action est différent, mais il a été observé une légère augmentation de la CI50 du GCV (2,1 fois) pour le mutant E237G de l'UL56 (94).

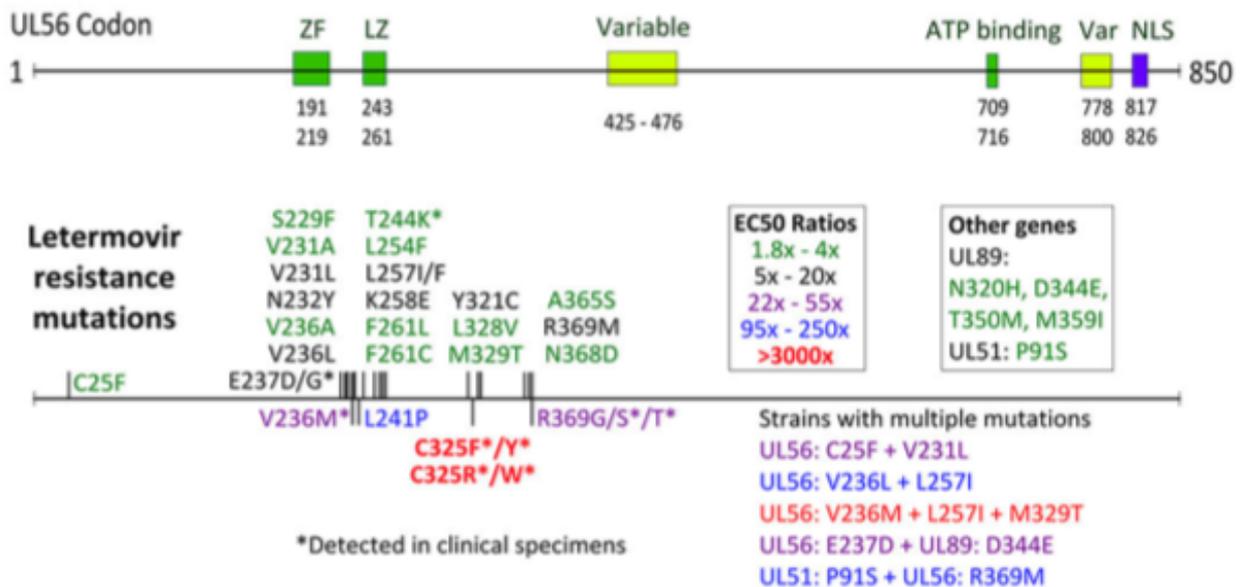


Figure 17 : Représentation de l'UL56 et les différentes mutations de résistance

De manière générale, les tests permettant la recherche de résistance devraient couvrir la totalité des séquences codantes des gènes UL97 et UL54, étant donné que ce sont les deux gènes pour lesquels on retrouve le plus de mutations conférant une résistance. Mais de nombreux laboratoires de diagnostic effectuent des tests sur des plages de codons plus limitées, telles que 450 à 650 pour UL97 et 300 à 1000 pour UL54, qui couvrent les mutations les plus courantes mais omettent certaines régions inhabituelles où des mutations de résistance ont été signalées (51). Plus récemment, dans certains laboratoires, le génotypage peut s'étendre sur la plage de codons 229-369 de l'UL56 (87).

Dans le cadre d'essais cliniques, il est préférable de séquencer l'ensemble des codons UL97 et UL54, ainsi que l'ensemble du codon UL27 pour le MBV et l'ensemble des codons UL56, UL89 et UL51 pour les inhibiteurs de terminase, afin de fournir des données permettant de guider le développement ultérieur des diagnostics cliniques.

5. Prise en charge thérapeutique en cas de résistance

Actuellement, aucune donnée issue d'essais contrôlés ne permet de définir le traitement optimal de substitution en cas de résistance aux médicaments.

En se basant sur une approche phénotypique, si on suspecte une mutation au niveau de l'UL97 suite à un traitement par GCV, avec un ratio de la CI50 (souche muté) / CI50 (souche sauvage) > 5, on envisagera de switcher vers du FOS. Et si ce ratio est < 5, on envisagera la possibilité d'augmenter les doses de GCV (95).

Lors du 3^{ème} consensus international de la gestion du CMV chez les patients transplantés d'organes solides, un algorithme a été mis en place pour définir certaines recommandations (Figure 18)(51). Mais son application à des cas individuels doit tenir compte de l'urgence du changement de traitement et des facteurs liés à l'hôte qui peuvent influencer fortement les résultats. En fonction de la gravité de la maladie à CMV et des facteurs de risque de l'hôte (D+/R-, immunosuppression sévère), des changements empiriques de traitement peuvent être effectués lorsqu'une résistance aux médicaments est suspectée, en attendant d'avoir les résultats du génotypage. Si une ou plusieurs mutations de résistance sont confirmées par génotypage, il conviendra de suivre l'algorithme. Si aucune résistance n'est confirmée par génotypage, il est nécessaire de mettre l'accent sur l'optimisation des facteurs de l'hôte et de l'administration des médicaments plutôt que de changer de molécule antivirale. La surveillance thérapeutique des médicaments peut être utile pour ajuster les doses afin de maintenir des niveaux de médicaments efficaces par rapport aux concentrations inhibitrices et de minimiser la toxicité. En effet, des concentrations en GCV en dessous du seuil thérapeutique, peuvent être responsable de la sélection de mutants résistants et le risque d'échec du traitement (96).

D'autres traitements peuvent améliorer les défenses antivirales de l'hôte comme les Ig anti-CMV ou les perfusions adaptatives de cellules T spécifiques du CMV. Plusieurs médicaments utilisés à d'autres fins, notamment les inhibiteurs de mTOR (sirolimus et everolimus), le léflunomide et l'artésunate, ont des effets anti-CMV in vitro qui peuvent parfois agir en synergie avec les antiviraux classiques.

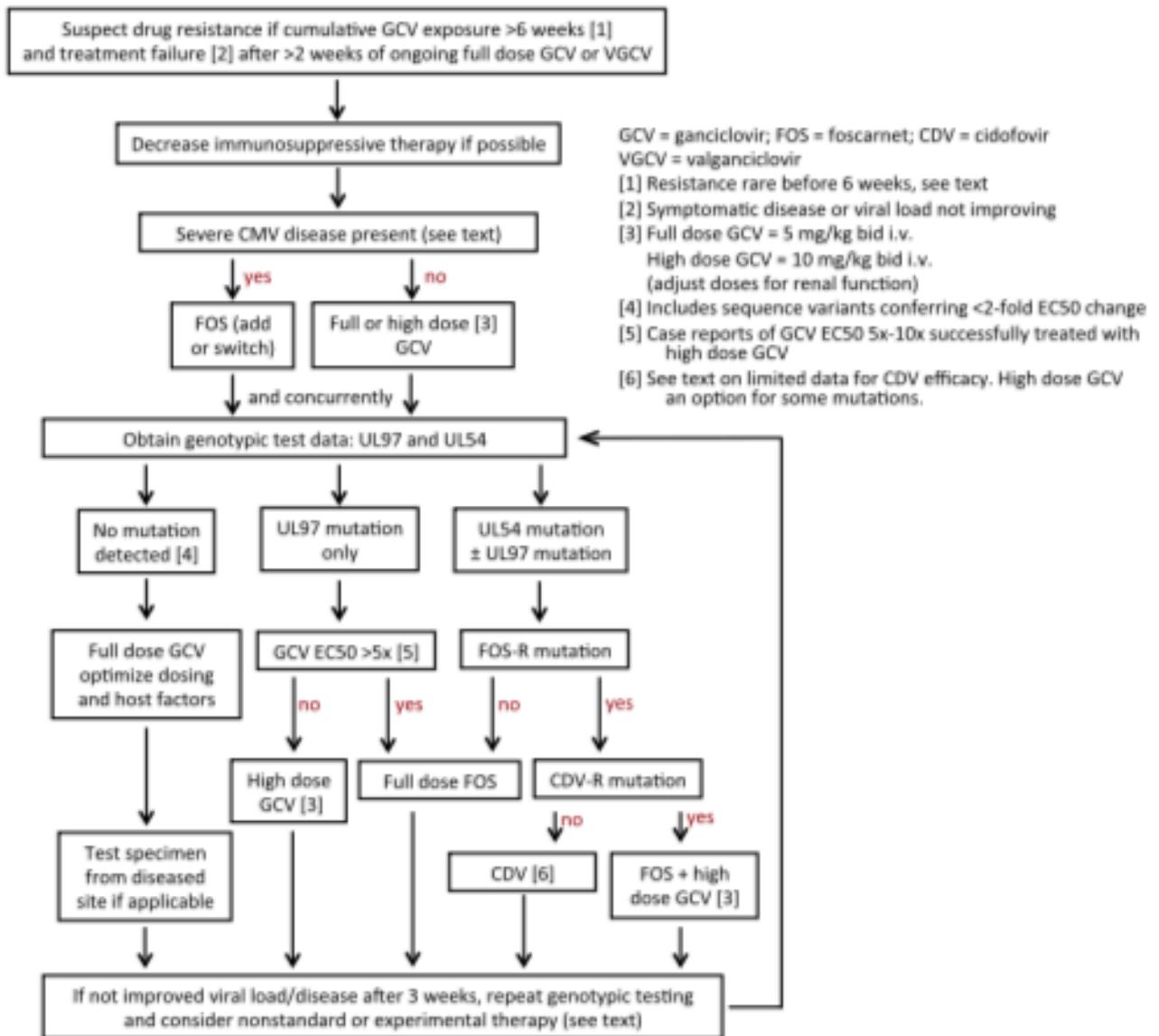


Figure 18 : Algorithme en cas de résistance aux traitements (3^{ème} consensus international 2017 de la gestion du CMV chez les transplantés d'organes solides)

PARTIE 2 : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE GENOTYPAGE DU CMV

Ce travail consiste à mettre au point une technique de génotypage du CMV, afin de rechercher les résistances aux antiviraux et ainsi pouvoir adapter la prise en charge du patient.

I. MATERIELS ET METHODES

A. ÉTUDE BIO-INFORMATIQUE

Afin de mettre au point cette technique de génotypage, une analyse bio-informatique a été nécessaire. Dans un premier temps, il a fallu déterminer les zones d'intérêt de notre génome, intéressantes à séquencer : les régions connues comme étant responsables de potentiel résistances et les zones hypervariables. Dans un second temps, pour permettre l'amplification de notre génome par technique PCR et le séquençage par technique NGS, nous avons dû designer des amorces.

1. Sélection des séquences du génome complet du CMV

À partir de la plateforme NCBI Genbank (97), nous avons sélectionné plusieurs séquences du génome complet du CMV (qui correspond à environ 250 000 paires de base). Sur le logiciel MEGA, les séquences ont été corrigées en supprimant notamment les nucléotides N. Ensuite les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel MAFFT (98) puis analysées sur MEGA afin de trier et d'éliminer les séquences non correctes, issues de virus non circulants ou incomplètes.

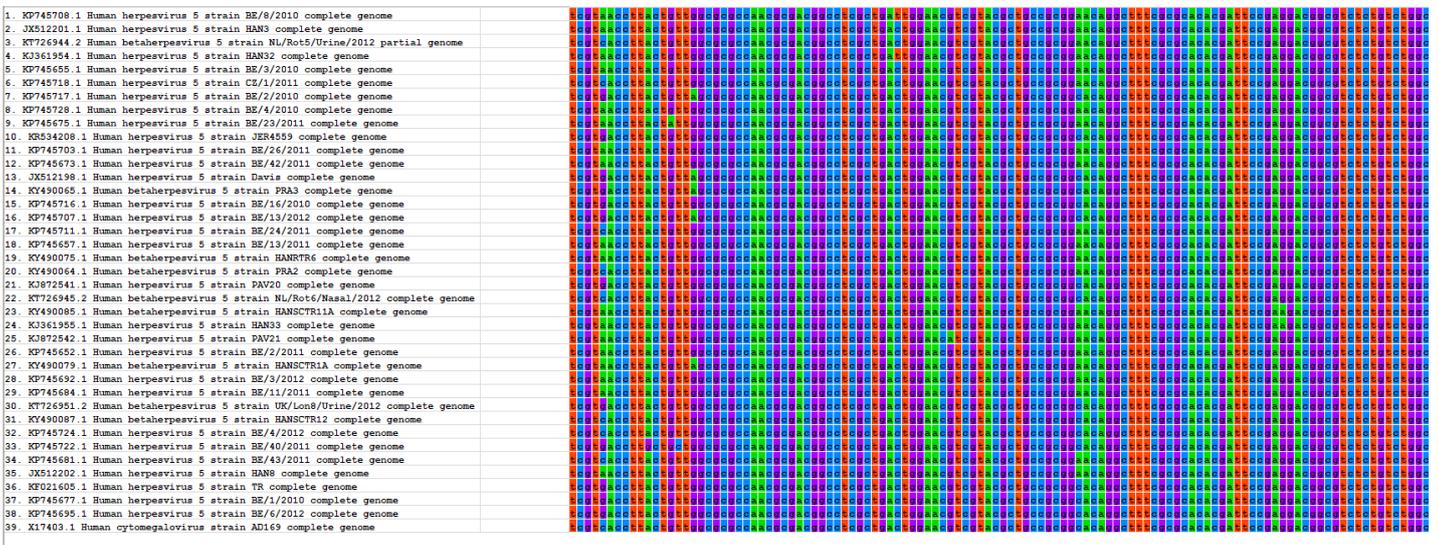
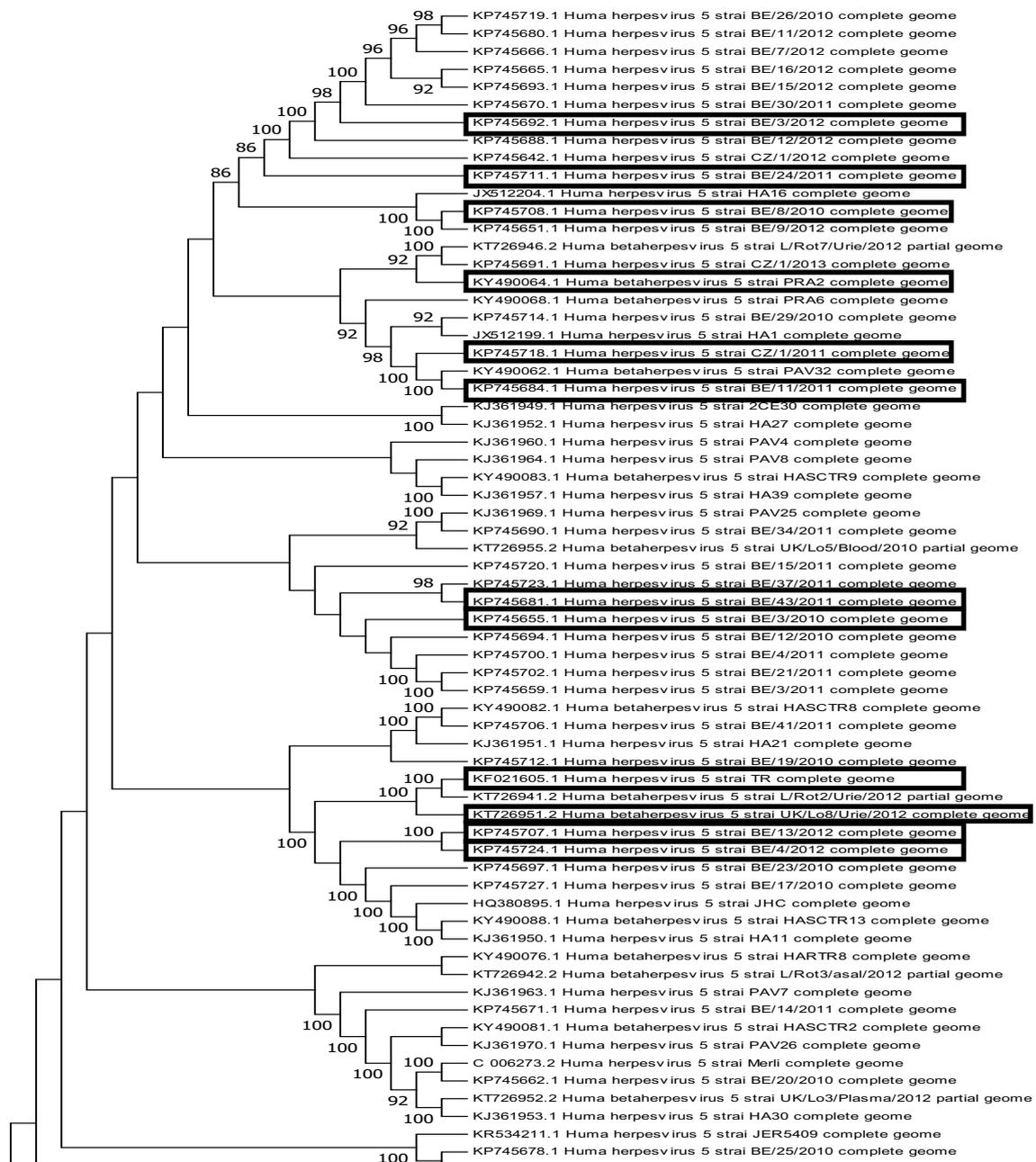


Figure 19 : Alignement des séquences du génome complet du CMV

Nous avons ensuite réalisé un arbre phylogénétique sur MEGA, permettant d'observer l'homologie des séquences. Les nœuds de l'arbre correspondent à un ancêtre commun et la longueur des branches correspond à l'éloignement génétique. Nous avons éliminé les séquences aberrantes et déterminé des groupes. Enfin, pour faciliter le travail bio-informatique, nous avons sélectionné 39 séquences au sein de ces groupes espacées les unes des autres d'un point de vue phylogénétique. Cette sélection permet d'avoir un maximum de diversité dans nos séquences qui vont nous servir pour la suite de l'étude.



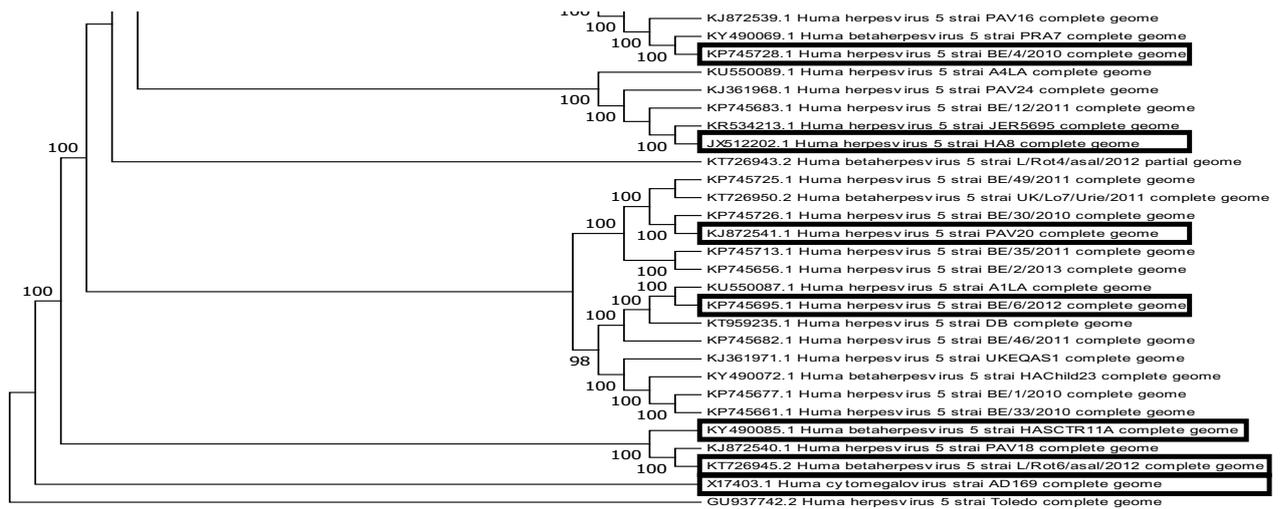


Figure 20 : Arbre phylogénétique et sélection des séquences pour l'alignement

2. Détermination des régions à séquencer

Une fois l'alignement réalisé, nous avons sélectionné des zones du génome contenant des séquences homologues hypervariables, qui seront essentielles pour réaliser le génotypage.

Pour cela, à partir de notre alignement de 39 séquences, nous avons regardé le nombre de positions variables tout le long des séquences d'ADN. Le logiciel MEGA permet de calculer la variabilité position par position qui est ensuite représentée sous forme de graphique. La sélection des zones hypervariables se fait sur plusieurs critères : conservation d'une homologie de la séquence, espacement suffisant entre chacune des zones, pas de chevauchement avec les zones de gènes de résistance connues (UL54 et UL97). Nous n'avons pas choisi les zones hypervariables aux extrémités du génome car la variabilité était potentiellement due à des problèmes lors de l'alignement. Des arbres phylogénétiques ont été réalisés de nouveau sur chacune des régions sélectionnées pour comparer les arbres et s'assurer que la répartition des groupes soit équivalente.

Ainsi, nous avons choisi 2 zones hypervariables (entourées en rouge sur le graphique, Figure 21), allant sur notre alignement :

- Du nucléotide n°102 600 au n°110 500, que nous appellerons par la suite zone N°1
- Du nucléotide n°187 500 au n°193 500, que nous appellerons par la suite zone N°2

Enfin, sur Genbank, nous avons regardé quelles étaient les positions des 2 gènes impliqués dans la plupart des mécanismes de résistance : l'UL97 et l'UL54.

Au total, nous avons donc 4 zones que nous allons séquencer : les 2 zones hypervariables et les 2 gènes UL97 (allant du nucléotide n° 158 000 au n°160 500 sur notre alignement) et UL54 (du n°91 000 au n°94 500).

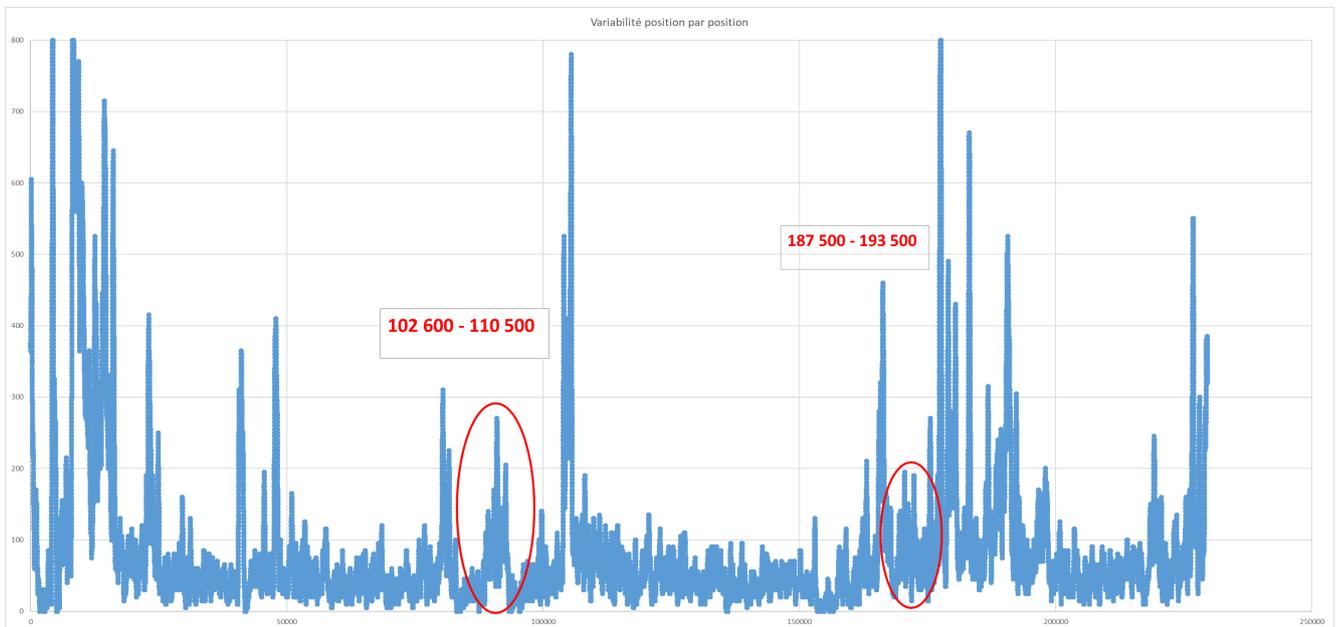


Figure 21 : Variabilité positions par positions

6. Design des amorces

Pour séquencer nos différentes régions à partir de prélèvements de patients, il a été nécessaire d'amplifier notre matériel génétique par technique PCR. La technique d'amplification que nous avons décidé de mettre en place est une PCR multiplex (qui consiste à réaliser plusieurs PCR en parallèle dans un même puit). Cette technique demande d'avoir plusieurs couples d'amorces (sens et anti-sens) qui vont chacun amplifier une partie différente du génome.

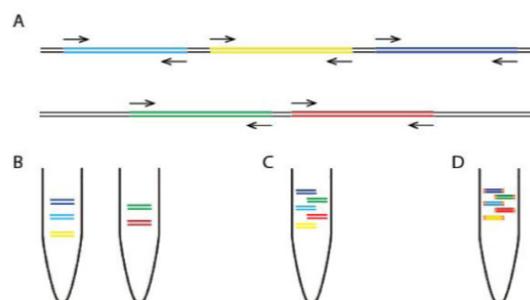


Figure 22 : Principe de la PCR Multiplex

Nous avons créé des couples d’amorces pour chacune des zones prédéterminées. C’est sur un logiciel disponible gratuitement sur Internet, Primalscheme® (99), que nous avons pu designer les amorces, simplement en y exportant le fichier FASTA de chacune de différentes zones et en définissant certains paramètres (taille de l’amorce, pourcentage de G+C). Une fois les amorces créées, nous avons vérifié sur le logiciel Sequencher® que tous les nucléotides des amorces étaient bien complémentaires avec toutes les séquences. Si ce n’était pas le cas, nous avons apporté quelques modifications aux amorces en les dégénéralant, c’est à dire en modifiant un ou plusieurs nucléotides de l’amorce afin que celle-ci puisse correspondre avec plusieurs possibilités de nucléotides sur la séquence (par exemple : l’amorce GGTTACAGAATCACCGTTGTCTG a été modifié en GGTTACAGAATCACCGTKGTCTG. Le K correspond à un T et à un G, la solution d’amorces contient un mélange des deux). Une fois le design des amorces terminées, nous les avons commandées.

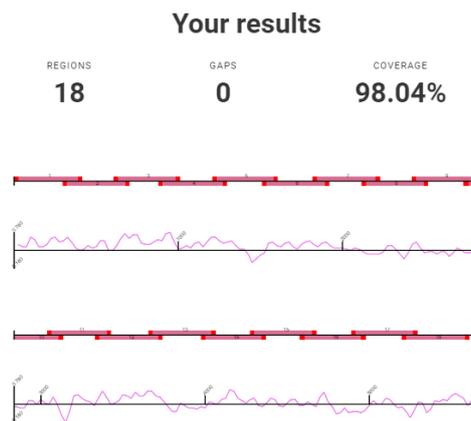


Figure 23 : Proposition de dispositions d’amorces par Primalscheme®

A	Adénine
T	Thymine
G	Guanine
C	Cytosine
Y	C ou T
R	A ou G
K	T ou G
M	A ou C

Tableau 2 : Code pour les bases dégénéralées

Noms des amorces	Séquences
187500_193500_1_LEFT	CGTAGATAGGCAGCATGAACCC
187500_193500_1_RIGHT	CCATGCAGGTGAACAACAAGGG
187500_193500_2_LEFT	GTGTGCTCCATGAGGAAAGGAG
187500_193500_2_RIGHT	CCCCGCAAGAAGAAGAGCAARC
187500_193500_3_LEFT	GTAACAAGAGAGCGATTGGTGT
187500_193500_3_RIGHT	CCGACCCGATGAAGATAGTTCC
187500_193500_4_LEFT	TCATCTCCTCGGACTCACTCTC
187500_193500_4_RIGHT	GTAAGAAACCGCGCAAACCAC
187500_193500_5_LEFT	CGGGCGGTTTAATAATCACCTTGAA
187500_193500_5_RIGHT	ACTGTTATGGATCCCACGTCAC
187500_193500_6_LEFT	ACAGGCGTGACACGTTTATTGA
187500_193500_6_RIGHT	AGCTCCTCTGATTCTCTGGTGT
187500_193500_7_LEFT	CTGATCACTGTTCTCAGCCACA
187500_193500_7_RIGHT	GTCACYAGTGACGCTTGTATGA
187500_193500_8_LEFT	AAGAYATAGCAGCACAGCACCC
187500_193500_8_RIGHT	TAACAAGTTRGGGGGTGCACTG
187500_193500_9_LEFT	TTCCTGTAGCACATATAMATCATCTTTCT
187500_193500_9_RIGHT	GGACGGATACTTATATGTGTTGTTATCC
187500_193500_10_LEFT	TGTGCTCCTTGATTCTATGCCG
187500_193500_10_RIGHT	CGACGTTYCTGCAGACTATGTT
187500_193500_11_LEFT	AGGGATTCTTCGGCCAAYTCTG
187500_193500_11_RIGHT	CAGTGTRGTCTGAGCAGTATTCGT
187500_193500_12_LEFT	GGAACAGTCTGTTAGTCTGTCAGC
187500_193500_12_RIGHT	GACATGGGCTCTTCTCTGGTAG
187500_193500_13_LEFT	AAGTCTGGCCTCCACTGTTAGG
187500_193500_13_RIGHT	AGCTTAGCCTATAGGTGYGGGT
187500_193500_14_LEFT	AAAGARAGTTGTGGCAAAGAGC
187500_193500_14_RIGHT	CAATGGGCGGTAGGCGTATAC
187500_193500_15_LEFT	AGGCGATCTGACGGTTCATAA
187500_193500_15_RIGHT	TTACGGTAAACTGCCACTTGG
187500_193500_16_LEFT	CGTCATTGACGTCAATAGGGGG
187500_193500_16_RIGHT	TGGTTATATAGCGTAAATCAATATTGGCT
187500_193500_17_LEFT	TTGGACATGAGCCAATATAAATGTACA
187500_193500_17_RIGHT	TGAAAATATGGCATATTGAAAATGTCGC
187500_193500_18_LEFT	TCGCGTATGCCCAAAAATCACT
187500_193500_18_RIGHT	GAATACGCTGCGGCAAAGTGAA
102600_110500_1_LEFT	CTAAAGGTATCCTCGCCCGTCA
102600_110500_1_RIGHT	GTGTAYAACACGGGCTTGTCGG
102600_110500_2_LEFT	CGTCTGATAACACGTGTGGCAA
102600_110500_2_RIGHT	GACCGAGCTCAAGTTGCATCTC
102600_110500_3_LEFT	GTAGAGCACCGAATTAGCGCTG
102600_110500_3_RIGHT	CCCGCTACGCTCTTTAATTCG
102600_110500_4_LEFT	ACACGTAGTAGAAAAGCGTCTCG
102600_110500_4_RIGHT	CGAAAGTCACGTCCTTCTGTCC

102600_110500_5_LEFT	GTGATCCTCGGTAAAAGCCACG
102600_110500_5_RIGHT	TACGAATTGCTGGGATCGTTGC
102600_110500_6_LEFT	ACCAAGGAAAAGTTCAGCACGT
102600_110500_6_RIGHT	CGTCAGGYGGTTCTTTGTGATT
102600_110500_7_LEFT	TCACATCAGCTAACAAACCGTGA
102600_110500_7_RIGHT	GTTCCCATCACGGTGTTCAT
102600_110500_8_LEFT	ATTGTGTATTTTTATTTTCCCATCCCC
102600_110500_8_RIGHT	ACGTGACCARCAAAAAGTGCTCA
102600_110500_9_LEFT	CCATCTGGTGTCTGGCATAAGAAC
102600_110500_9_RIGHT	GTAGCTTATGACGCGTATCCGG
102600_110500_10_LEFT	TCGGTGTACGTACAGGCTTCTC
102600_110500_10_RIGHT	TATGCATCCTAGGGGTGGAAGC
102600_110500_11_LEFT	ACGTCATCAGTCCGTTTTACGT
102600_110500_11_RIGHT	AATTTTACCGGCGCATGCGC
102600_110500_12_LEFT	TCCGCCTTATCCTGGGCGTT
102600_110500_12_RIGHT	CTCCAGGAAAGGGTGGAAAACG
102600_110500_13_LEFT	GCCATGACACCTCAATTGYCGT
102600_110500_13_RIGHT	ACAGTTTCGGGGCCATTTGAAC
102600_110500_14_LEFT	GTGAACCGATACGGGTRCAG
102600_110500_14_RIGHT	GAGATGGTTTGACGTCAGCGAC
102600_110500_15_LEFT	TTCCGTGATGCTACCTAGAGGG
102600_110500_15_RIGHT	GGCGGCTGTCCTAAAATGACTA
102600_110500_16_LEFT	CCAAGACTCTTACCACGTAGACG
102600_110500_16_RIGHT	CCCCCGTTTTCAAACACCTCAA
UL54_1_LEFT	CCACTACTCTCACCACCAGTCT
UL54_1_RIGHT	TAGCTGAAGATCCGAGCTACGT
UL54_2_LEFT	ACCTGCTCAAAGTACTTGTCGG
UL54_2_RIGHT	GGATCGGGTCTTTTACGTYCTG
UL54_3_LEFT	GGTTACAGAATCACCGTKGTCG
UL54_3_RIGHT	GCCTCTCACTCGATGAAGTYAA
UL54_4_LEFT	CACGGTGCAGGTAYAGATCGTC
UL54_4_RIGHT	GCTGGAGTTTGAAAAGGTCTTCG
UL54_5_LEFT	CCTCCACTTTGCCGATATAACGT
UL54_5_RIGHT	CTATGTAGTRAGAACGCGGGAG
UL54_6_LEFT	CTGTCCGTRTCCCCGTAGATGA
UL54_6_RIGHT	GTGCAACGCTTTCTACGGTTTTA
UL54_7_LEFT	ARTTGTCTTTGATGAACCGCGC
UL54_7_RIGHT	CTAGAGAACGGCGTGACSCATC
UL54_8_LEFT	TGTTCTTGTCGAGCAGCATAAC
UL54_8_RIGHT	CCGAGGTGGGTTAYTACAACGA
UL54_9_LEFT	CARAGGTTGTGAGCCATGATGA
UL54_9_RIGHT	TGGCGGCYATGTTTCAGATGTC
UL54_10_LEFT	CCACTACTGCCGGAGCCGA
UL54_10_RIGHT	GTCATCTTTGACGGACAGCAGA
UL54_11_LEFT	TGGTTGGGCAGGATAAAAATCGC

UL54_11_RIGHT	TAAGCTCAACACTATGGCCGAG
UL54_12_LEFT	GCGGGATGTCCTTGTARGACAG
UL54_12_RIGHT	CTGTATAAGGTGGACTCGCAGC
UL54_13_LEFT	GTACTGCCGCTTAAAACCCACG
UL54_13_RIGHT	GGCACTCGGGTCTTCATCTCTT
UL54_14_LEFT	AAAAGCATAAAGCCCAGCAGCA
UL54_14_RIGHT	ATCGGTGCTTGTCTTCGATAT
UL54_15_LEFT	ACAATGTCATCGGACTTCTCGG
UL54_15_RIGHT	AAAATCGGCGAGTATCTGCTGG
UL54_16_LEFT	GATCGATGACCAAACGCGTCAG
UL54_16_RIGHT	TATCTGCGTCAACGTTTTTCGGG
UL54_17_LEFT	CAATGACCTCACGCAGCCTATC
UL54_17_RIGHT	TCGAGAGATTAACATTTGTTGAGTCA
UL54_18_LEFT	AATAGGTCCCACCACGCGACCC
UL54_18_RIGHT	TCACGGTCCGCTATGTTTTTCA
UL97_1_LEFT	GACAGTGTCCGGTGTGGTAGCTA
UL97_1_RIGHT	GTTGTGCTGACGGAACCTCAGAG
UL97_2_LEFT	AAGACTGTCCCACTATGTCCT
UL97_2_RIGHT	TAACCGTCGCCGCTGGCGGCG
UL97_3_LEFT	TGATGCGTGACGGAGAAAAGA
UL97_3_RIGHT	CTCCACGTCGTTTTCTTCGAGC
UL97_4_LEFT	GTCGTTGAGTACGATCGCGAC
UL97_4_RIGHT	TGCTCGTTGGAACAGGTGCAAT
UL97_5_LEFT	GTATGTTCTTGCGCCTTACGCA
UL97_5_RIGHT	GATGTACCGTGACGTTGTGCAG
UL97_6_LEFT	GATCGCTATCGCGTGGTCAAGG
UL97_6_RIGHT	GTTACGTCGATGAGCACGTTC
UL97_7_LEFT	TGGCCGACGCTATCAAATTTCT
UL97_7_RIGHT	CCGACATGCAATAACGCCGTAG
UL97_8_LEFT	CCTATCCGGATTACAACGAGCG
UL97_8_RIGHT	CGTGAGCTTGCCGTTCTCCAAC
UL97_9_LEFT	GYACGGAGGCGTTGCTCTTTAA
UL97_9_RIGHT	TCAAGTCCCTCGCAGATTA
UL97_10_LEFT	CTTTGTGGAGGCCAAGATGTCC
UL97_10_RIGHT	TCGTCGTAGTCCAAACTCGAGA

Tableau 3 : Séquences d'amorces

B. REGENERATION DES AMORCES

Les amorces reçues sont lyophilisées. Il a donc été nécessaire de les régénérer par ajout de TE (Tampon Tris-EDTA, pH=8,0). Sur les étiquettes de chaque tube d'amorces, il est indiqué la concentration en amorces, nous permettant de déduire le volume de tampon à ajouter afin d'avoir une concentration 100 μ M.

Ensuite nous avons créé des pools d'amorces, en mélangeant les amorces impaires qui correspondent au pool n°1 et les amorces paires au pool n°2. Il est important de tenir compte de la dégradation ou non des amorces : si l'amorce est dégradée il faudra introduire un volume 2 fois moins élevé que si elle ne l'est pas. Au total, nous avons 8 pools d'amorces :

- Pool 1 de la zone N°1
- Pool 2 de la zone N°1
- Pool 1 de la zone N°2
- Pool 2 de la zone N°2
- Pool 1 de l'UL97
- Pool 2 de l'UL97
- Pool 1 de l'UL54
- Pool 2 de l'UL54

C. SÉLECTION DES ÉCHANTILLONS

Pour cette étude, nous avons travaillé sur des échantillons issus de patients de l'IHU Méditerranée Infection présentant une PCR positive pour le CMV. Ces prélèvements étaient majoritairement du sang, mais nous avons également sélectionné quelques prélèvements urinaires et des biopsies.

Seuls les prélèvements pour lesquels un médecin avait prescrit des analyses biologiques ont été utilisés. Aucun prélèvement supplémentaire n'a été demandé. Les résultats obtenus dans cette étude n'ont pas eu d'impact sur la prise en charge du patient et une non-opposition orale a été obtenue pendant l'admission des patients, le consentement spécifique des patients et l'approbation du comité d'éthique n'ont pas été nécessaires pour cette étude (100).

1. 1ère série d'échantillons

Afin de tester nos amorces et la technique PCR que nous allons utiliser pour la suite de notre travail, nous avons décidé dans un premier temps de sélectionner 7 prélèvements. Le choix s'est porté sur des échantillons de patients avec une PCR positive pour le CMV avec une charge virale pour la plupart autour de 100 000 copies/mL ou plus, sauf 3 patients ayant des charges virales plus faibles afin d'en déterminer l'impact et d'évaluer la sensibilité de cette technique.

Numéro d'échantillon	Nature du prélèvement	Charge virale obtenue par technique rt-PCR (ARGENE®)	Résultat de notre PCR
9102319084	Plasma EDTA	14 900 copies/mL	Échec
9092193947	Plasma EDTA	37 500 copies/mL	Échec
9092161441	Plasma EDTA	377 000 copies/mL	Réussite
9102277303	Plasma EDTA	383 000 copies/mL	Réussite
9061941243	Sang EDTA	123 000 copies/mL	Réussite
9061900510	Plasma EDTA	60 700 000 copies/mL	Réussite
9102233988	Plasma EDTA	21 500 copies/mL	Échec

Tableau 4 : Sélection des 7 premiers échantillons et leurs caractéristiques

Sur ces 7 prélèvements, seulement 4 ont pu être amplifiés correctement. Les différents critères pour vérifier l'amplification seront expliqués plus loin. Les 3 prélèvements qui n'ont pas pu être amplifiés, avaient une charge virale plus faible que les autres, autour de 10 000 copies/mL. Pour la suite de notre travail, nous avons donc décidé de travailler essentiellement sur des prélèvements avec des charges virales de 100 000 copies/mL minimum.

2. 2^{ème} série d'échantillons

Nous avons ensuite sélectionné un plus grand nombre d'échantillons, qui ont pu être analysés 12 par 12, étant le nombre maximum d'échantillons qu'il est possible de tester sur une plaque de PCR qui comportent 96 puits (12x8).

À noter que les échantillons de cette série ont été initialement analysés avec deux techniques différentes :

- Certains avec la technique ARGENE® (habituellement sur sang total EDTA)
- Certains avec la technique NeumoDX® (habituellement sur plasma EDTA), pour laquelle nous avons des charges virales 10 fois plus basses qu'avec l'autre technique. Ainsi, les prélèvements avec des charges virales autour de 10 000 copies/mL avec cette technique ont pu être inclus.

N° d'échantillon	Nature du prélèvement	Charge virale obtenue par RT-PCR	Résultat de notre PCR
0110831605	Plasma EDTA	105000	Réussite
0100736951	Sang EDTA	278000	Réussite
0110857985	Biopsie rectale	431000	Réussite
0110790137	Sang EDTA	87000	Échec
0110803041	Plasma EDTA	110000	Réussite
0110814073	Plasma EDTA	39000	Réussite
0110775948	Sang EDTA	32000	Échec
0090598594	Plasma EDTA	58400	Réussite
0090603135	Plasma EDTA	42100	Réussite
0100752747	Plasma EDTA	65300	Réussite
0090593404	Sang EDTA	94900	Réussite
691760	Sang EDTA	86700	Réussite
0090615889	Urines	1470000	Réussite
0090544793	Sang EDTA	339000	Réussite
9072032076	Plasma EDTA	804000	Réussite
8070899426	Plasma EDTA	235000	Réussite
8050732924	Sang EDTA	3250000	Réussite
8060817513	Plasma EDTA	144000	Réussite
8070855025	Sang EDTA	636000	Réussite
8060733451	Plasma EDTA	1760000	Réussite
9092144748	Urines	10100000	Réussite
9092192981	Urines	1310000	Réussite
9092228947	Urines	2530000	Réussite
9092218272	Sang EDTA	36600	Réussite
7100013409	Plasma EDTA	69481	Réussite
9061911850	Plasma EDTA	22400000	Réussite
9102251494	Sang EDTA	2670000	Réussite
9092182616	Plasma EDTA	48900	Réussite

Tableau 5 : Sélection de la 2^{ème} série d'échantillons et leurs caractéristiques

D. EXTRACTION DES ECHANTILLONS

La PCR nécessite une étape préliminaire qui est l'extraction de l'ADN à partir de l'échantillon primaire du patient. Il est nécessaire d'introduire un témoin d'extraction de type T4 (témoin des virus à ADN), pour vérifier a posteriori si l'extraction a bien été faite.

Pour réaliser cette étape, nous avons utilisé le kit virus QIAGEN de l'EZ1. Deux tubes ont dû être préparés :

- Tube échantillon : 90 µl de prélèvement + 10 µl de témoin d'extraction T4
- Tube carrier : 60 µl de buffer + 10 µl de polyacrylamide linéaire

Le volume total d'élution est de 60 µl.

E. PCR

La PCR que nous avons utilisé, s'inspire d'un protocole déjà existant (99), et se déroule en plusieurs étapes :

- 1^{ère} étape : Préparer le mix qui est différent pour chaque pool d'amorces de chacune des zones prédéfinies. Ainsi pour 1 échantillon :
 - 12,5µl de mastermix (Q5 High fidelity 2xMaster Mix, Biolabs®) contenant la Q5 DNA polymérase (qui est l'équivalent d'une Taq polymérase)
 - 8,5 µl d'eau stérile
 - 1,5 µl de pool d'amorces
- 2^{ème} étape : Introduire le mix dans les puits de PCR puis introduire 2,5 µl d'extrait d'ADN, ce qui fait un total de 25 µl dans chaque puit.
- 3^{ème} étape : Centrifuger la plaque de PCR et lancer la PCR sur le thermocycler (2720 thermal cycler Applied Biosystems) en programmant les différentes étapes :
 - 98°C pendant 30 secondes
 - 40 cycles de 15 secondes à 98°C et 5 minutes à 65°C
 - 4°C jusqu'à l'infini (jusqu'à ce que l'on récupère la plaque dans le thermocycler)

F. MIGRATION SUR GEL D'AGAROSE

Afin de s'assurer que notre ADN s'est bien amplifié lors de l'étape de PCR, il est nécessaire de faire migrer les produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose. Un échec de la PCR se déterminera par l'absence de bandes à l'électrophorèse ou de très faible intensité, en comparant avec un témoin positif comportant différents poids moléculaires.

1. Préparation du gel d'agarose

- 1^{ère} étape : Préparer du TBE 0,5X (Tris Borate EDTA Buffer concentration x0,5) en mélangeant 100ml TBE 10X (concentration x10) et 1900 ml d'eau
- 2^{ème} étape : Préparer un gel d'agarose 2% en mélangeant 4g d'agar pour 200 ml de TBE 0,5X puis chauffer jusqu'à dilution
- 3^{ème} étape : Après refroidissement, introduire 20 µl de SYBR® Safe DNA gel stain (qui est un agent intercalant d'ADN) pour 200 ml de solution

- 4^{ème} étape : Couler le gel dans les moules et attendre sa solidification

2. Électrophorèse sur gel

- 1^{ère} étape : introduire le moule contenant le gel d'agarose dans la cuve à électrophorèse, en l'immergeant dans du TBE
 - 2^{ème} étape : Préparer en amont le mélange tampon de charge et produit de PCR, qui sera différents pour chaque puit : mélanger 5 µl de tampon de charge avec 5 µl de produit de PCR (le tampon de charge est initialement marron et se colore en bleu après ajout du produit de PCR)
 - 3^{ème} étape : Introduire 8 µl de ce mélange dans les puits du gel d'agarose
 - 4^{ème} étape : Introduire 8 µl de témoin de poids moléculaire dans une des colonnes du gel
 - 5^{ème} étape : Faire migrer à 135 V et 93 mA pendant 20min environ
 - 6^{ème} étape : Lecture à la lampe UV. Grâce à l'agent intercalant, la lampe UV permettra de mettre en évidence les produits de PCR ayant été amplifiés correctement.
- A l'issue de cette étape d'électrophorèse, il nous reste 20 µl de produit de PCR.

G. PURIFICATION DE L'ADN

Cette étape sera faite sur les échantillons ayant eu un succès lors de la PCR et permet d'éliminer le reste d'amorces et de nucléotides encore présents dans l'échantillon. Elle a été réalisée à l'aide du kit de purification Monarch[®] PCR & DNA cleanup kit, Biolabs[®] qui comportent plusieurs étapes :

- Mélanger les produits de PCR des pools 1 et 2 pour chaque échantillon et chaque séquence (ce qui correspond à un mélange de 40 µl). Au total, nous avons 4 tubes par patient correspondant à chaque séquence.
- Préparer les colonnes de purification pour chaque échantillon.
- Déposer les 40 µl de produits de PCR dans la colonne et ajouter 200 µl de Cleanup Binding Buffer (500 µl pour 100 µl).
- Centrifuger 1 min à 13 000 rpm.
- Faire 2 lavages consécutifs en ajoutant 200 µl de DNA Wash Buffer puis centrifuger 1 min à 13 000 rpm.

- Éluer 2 fois la colonne en ajoutant 10 µl d'éluant DNA Elution Buffer (préalablement chauffé) puis centrifuger 1 minute à 13 000 rpm.

H. QUANTIFICATION DE L'ADN ET PREPARATION DES TUBES POUR LE SEQUENÇAGE

Une fois notre ADN purifié, il est nécessaire de quantifier cet ADN pour déterminer quels volumes de chaque pool il faudra utiliser pour former le tube final qui sera ensuite envoyé au séquençage NGS.

La quantification de l'ADN va se faire à l'aide d'un appareil Nanodrop 1000 (Thermo scientific®) sur lequel on dépose 1,5 µl d'éluat obtenu après purification. Préalablement, il est nécessaire de réinitialiser avec de l'eau distillée et de faire le blanc avec notre DNA Elution Buffer utilisé pour l'étape de purification.

Pour rappel, nos 4 séquences à amplifier n'ont pas le même nombre de paires de base. Il va donc falloir déterminer les volumes d'éluat de chacune des séquences propres à chaque patient, afin d'avoir une répartition équimolaire. Une fois les volumes déterminés, on a mélangé les volumes de chacune des séquences afin d'obtenir le tube final qui correspond donc à un patient.

I. SEQUENÇAGE

Le séquençage nécessite quelques étapes de préparation au préalable :

- Fragmentation de l'ADN à séquencer par sonication, en fragments de 200 paires de base environ qui seront liés à un adaptateur (biotine).
- Amplification des brins anti-sens à l'aide de billes recouvertes d'amorces et amplification en parallèle des brins sens dans le milieu. Les cycles de PCR se déroulent classiquement une cinquantaine de fois.
- On obtient des billes où sont fixés des brins d'ADN bicaténares.
- La biotine liée à l'ADN amplifié va se lier à la streptavidine. Ce complexe va permettre de séparer l'ADN à l'aide d'un aimant et former des brins monocaténares qui seront disponibles pour le séquençage.
- Une bille correspondant à un read, le nombre de bille définira le nombre de reads pour le séquençage.

Le séquençage se fera ensuite par technique NGS Ion torrent™.

II. RESULTATS DES PCR ET PROPOSITIONS D'AMELIORATION

A. RESULTATS DES PCR

1. Analyse des gels d'électrophorèse

L'étape de migration des produits de PCR sur gel d'agarose par électrophorèse, nous a permis de voir si l'ADN s'est amplifié correctement. Un signal intense d'amplification, détectable grâce à la lampe UV, est signe que la séquence d'ADN a bien été amplifiée.

On peut voir que lors de notre 1^{ère} série de PCR, les échantillons N°9102319084, N°9092193947 et N°9102233998 n'ont pas été assez amplifiés puisque l'intensité de fluorescence comparée au témoin est très faible.

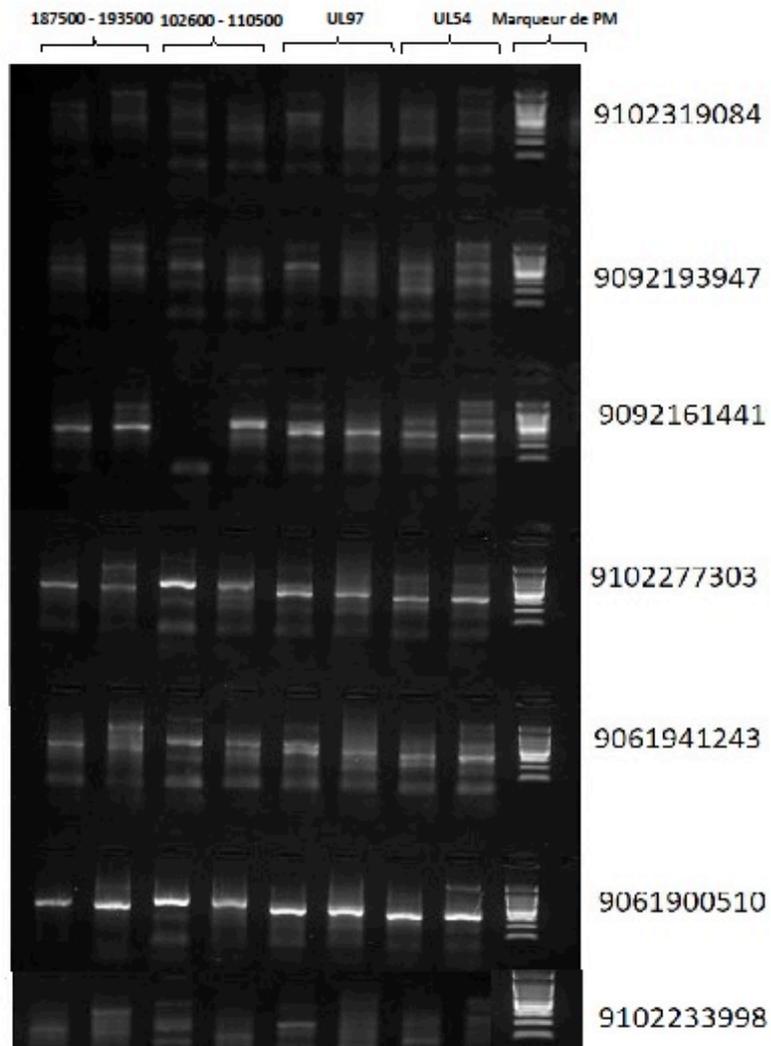


Figure 24 : Électrophorèse 1^{ère} série d'échantillons



Figure 25 : Électrophorèse 2^{ème} série d'échantillons

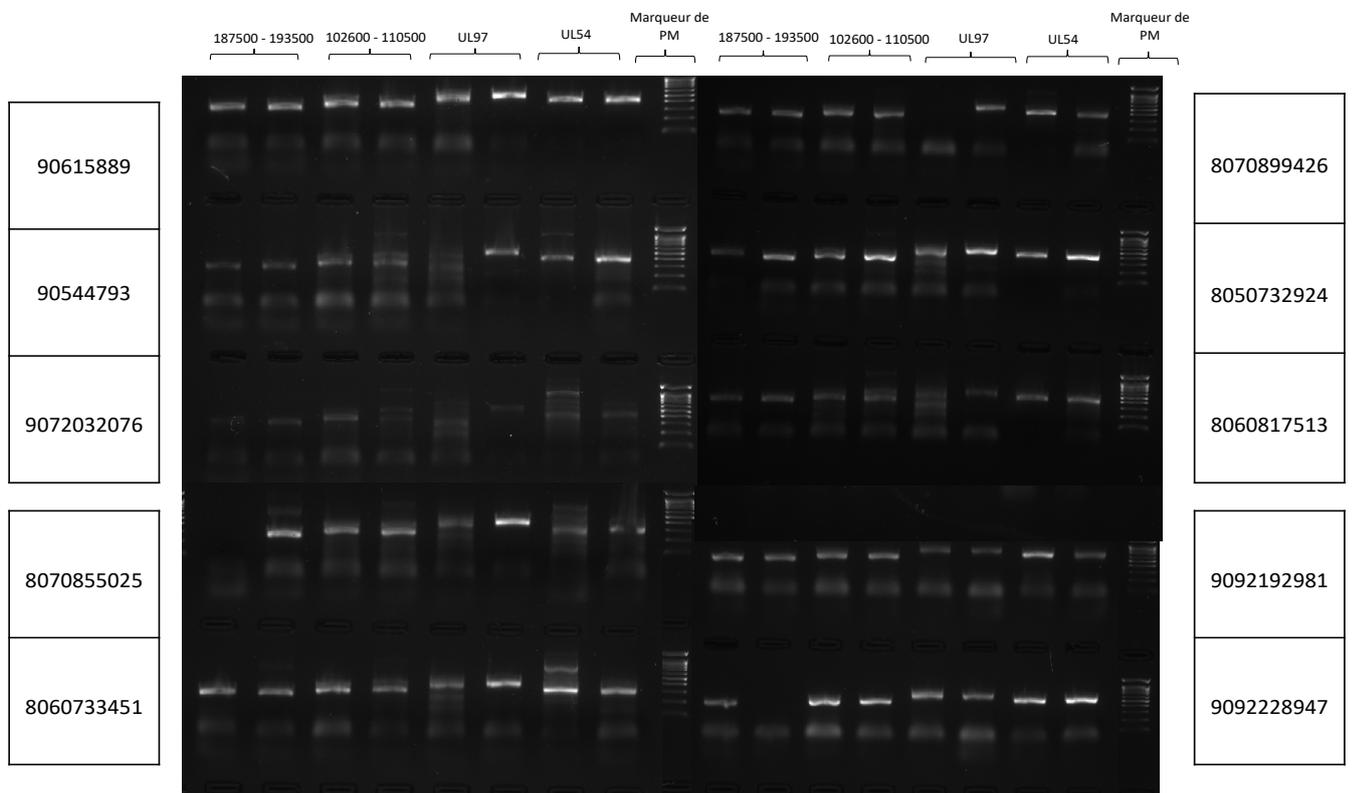


Figure 26 : Électrophorèse 2^{ème} série d'échantillons (Suite)

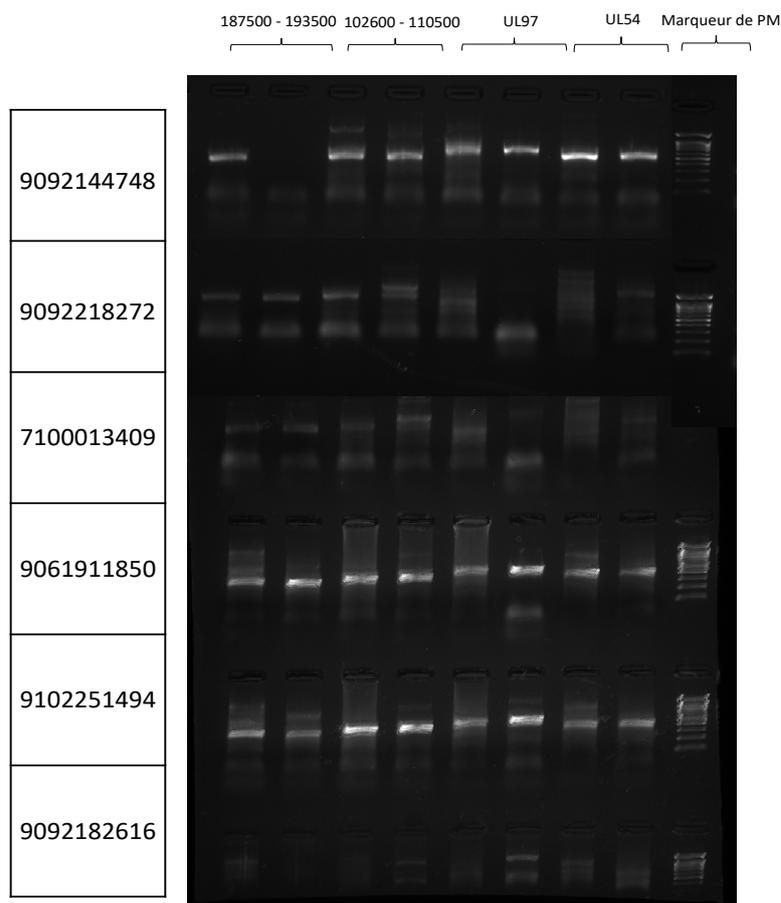


Figure 27 : Électrophorèse 2^{ème} série d'échantillons (Suite)

Sur un total de 35 échantillons testés, 5 n'ont pas été correctement amplifiés. Lors de notre 1^{ère} série, nous avons eu 3 échecs de PCR sur 7 échantillons (Tableau 4). Ces 3 échantillons avaient des charges virales basses, autour de 10 000 copies/mL. Lors de notre 2^{ème} série d'échantillons, les 2 échantillons avec des échecs de PCR (Tableau 5), qui avaient été analysés par technique ARGENE®, sont associés à une charge virale basse. La virémie est un paramètre difficile à prendre en compte, puisque certains échantillons avec une charge virale basse ont pu être correctement amplifiés.

La suite du travail se fera donc sur les 30 échantillons dont la PCR a fonctionné.

2. Résultat de la quantification d'ADN

Après la purification de nos produits de PCR, nous avons mesuré la quantité d'acide nucléique présent dans chaque tube. Cette mesure va nous permettre de savoir la quantité de

matériel à utiliser lorsque l'on pool tous les segments d'un même patient, afin d'avoir des concentrations équimolaires. Cette technique a été utilisée pour les 14 premiers prélèvements.

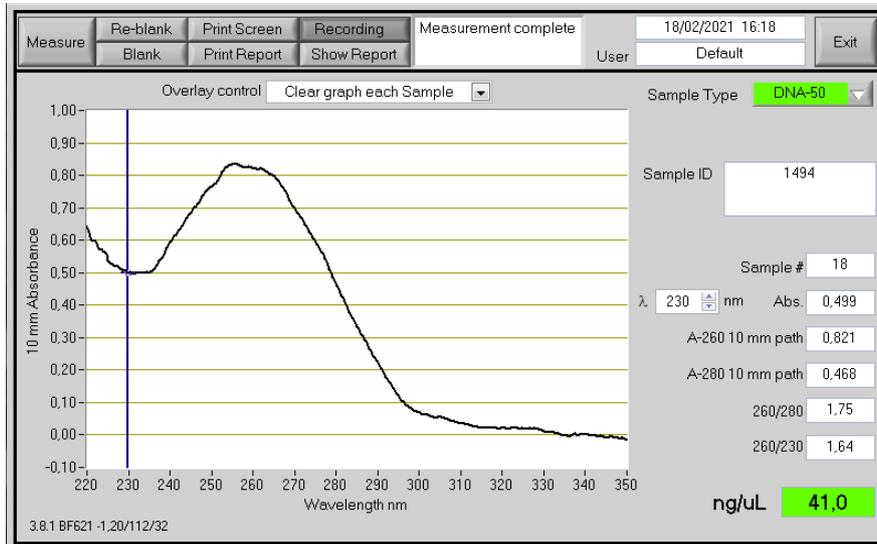


Figure 28 : Mesure des concentrations en acides nucléiques sur le Nanodrop®

N° échantillon	Concentration en acides nucléiques (en ng/μl)			
	187500 - 193500	102600 - 110500	UL97	UL54
9092161441	120	114	112	107
9102277303	101	131	172	137
9061941243	184	134	127	146
9061900510	203	118	123	74
0110831605	78	81	80	71
0100736951	89	52	72	81
0110857985	45	68	63	63
0110803041	86	47	43	34
0110814073	44	64	73	77
0090598594	71	66	49	65
0090603135	72	102	74	52
0100752747	71	85	69	73
0090593404	46	51	62	47
691760	70	76	59	64

Tableau 6 : Concentration en ADN des 14 premiers prélèvements

Pour la suite des prélèvements, nous avons décidé de pooler nos produits de PCR de chaque échantillon avant la purification. Cela a permis de rendre les manipulations plus rapides et de limiter la quantité de réactifs utilisée. Ainsi, nous avons pu calculer la quantité d'ADN directement sur le produit fini.

N° échantillon	Concentration en acides nucléiques (en ng/μl)
0090615889	49
0090544793	78
9072032076	173
8070899426	75
8050732924	59
8060817513	48
8070855025	26
8060733451	167
9092144748	187
9092192981	65
9092228947	21
9092218272	53
7100013409	30
9061911850	136
9102251494	42
9092182616	88

Tableau 7 : Concentration en ADN pour les prélèvements restants

B. SOURCES D'ÉCHEC DES PCR ET PROPOSITIONS D'AMÉLIORATION

1. Optimisation de la PCR

De manière générale, pour optimiser une PCR et qu'elle soit le plus spécifique possible, il est nécessaire de prendre en compte certains critères (82) :

- Avoir un ADN de qualité (bonne condition de conservation) et en quantité suffisante pour permettre l'amplification.
- Optimiser le choix des enzymes et leur concentration.
- Optimiser le choix des amorces (taille, pourcentage de G+C) et la température de fusion des amorces.

- Définir une concentration en chlorure de magnésium ($MgCl_2$) adéquate, puisque les dNTP (nucléotides) chélatent une partie des ions Mg^{2+} et ainsi une augmentation des dNTP diminue la concentration en Mg^{2+} disponible pour le bon fonctionnement de la PCR.
- Utiliser éventuellement des agents potentialisant (DMSO, formamide) pour augmenter le rendement de la PCR.
- Éliminer les bandes parasites qui sont le reflet d'un manque de spécificité à l'électrophorèse en réalisant :
 - Une PCR hot start : l'ADN polymérase ou les amorces ne sont rajoutés qu'au moment où le mix a atteint une température inhibant l'hybridation des amorces entre elles ou à des séquences non spécifiques.
 - Une PCR touch down : Démarrer la PCR à une température d'hybridation plus élevée et diminuer la température après un certain de nombre de cycles pour amener à une température inférieure à la température de fusion, pour éviter les hybridations non spécifiques.

Pour améliorer la spécificité d'une PCR, il est possible :

- D'augmenter la température d'hybridation.
- De diminuer la concentration en Mg^{2+} , en dNTP, le nombre de cycles, la concentration en amorces et en Taq polymérase.

Une fois les conditions de PCR définies, il est important de s'assurer de l'absence de contaminations et d'inhibiteurs de PCR qui pourraient être responsables d'échecs.

En effet, la PCR étant une technique très sensible, une molécule d'ADN différentes de notre ADN à amplifier, serait susceptible également d'être amplifié en grande quantité et être responsable d'un résultat faussement positif. Il est nécessaire de respecter certaines précautions d'usage pour éviter toutes contaminations (respecter le circuit de la PCR lorsque les différentes étapes sont réalisées dans des pièces différentes, désinfection...).

L'autre risque est de rendre un résultat faussement négatif en raison de la présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase : l'hème, le DMSO, l'héparine, le sarkosyl, les DNases, le phénol, les polyamines, le SDS (dodecyl sulfate de sodium). Certains milieux biologiques contiennent des

substances inhibitrices, comme par exemple l'urée dans les prélèvements urinaires. C'est ici que l'étape de purification de l'ADN joue un rôle important pour éliminer certains inhibiteurs.

2. Amélioration de nos PCR

Dans le cadre de notre travail, certains paramètres ont pu impacter sur la qualité de nos résultats. En effet, les échantillons sont issus de prélèvements initialement analysés en routine et certains ont pu subir plusieurs décongélations pour les besoins du laboratoire, ce qui peut altérer la qualité de l'ADN et donc la qualité de la PCR.

Nous avons vu également que la faible quantité d'ADN présente dans les échantillons peut être une source d'échec des PCR, bien que certains prélèvements avec des charges virales basses aient pu être correctement amplifiés.

Les échecs directement liés au système de PCR semblent peu probables, puisque nous nous sommes basés sur une technique publiée qui a prouvé son efficacité (99) et la majorité de nos PCR ont fonctionné. Cependant, certains paramètres du système peuvent être améliorés. Les paramètres d'amplification déterminés ne sont peut-être pas optimaux pour le CMV, comme les températures, les durées des différentes étapes de PCR ou encore le nombre de cycles. Il serait intéressant de modifier ces paramètres et de les comparer avec les valeurs initiales pour évaluer la performance.

De plus, nous n'avons utilisé qu'un seul kit de PCR, mais il en existe d'autres que l'on pourrait tester et comparer. Le fait d'avoir des concentrations en $MgCl_2$ prédéfinies dans les kits de PCR, limite la possibilité de faire varier les concentrations en $MgCl_2$ en cas d'échecs.

III. RESULTATS DU SEQUENÇAGE

Une fois le séquençage par IonTorrent™ terminé, nous avons obtenu plusieurs reads par échantillon, c'est-à-dire des fragments de plusieurs bases. Pour obtenir une séquence d'ADN exploitable, il est nécessaire d'avoir un nombre de reads aux alentours de 200 000 ou plus.

Au préalable, nous avons créé notre séquence de référence, à partir de la souche de référence, dont le génome est très conservé, et pour laquelle nous n'avons gardé que nos 4 régions mis bout à bout (Figure 29).

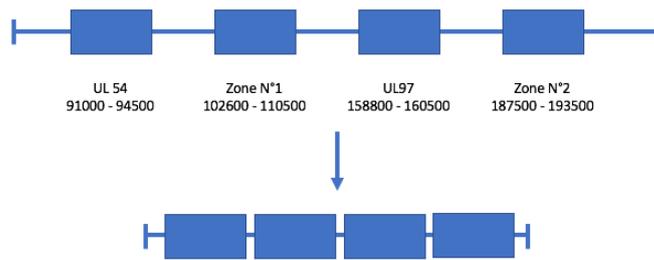


Figure 29 : Schéma de la séquence de référence avec nos 4 régions

Grâce au logiciel CLC genomics de QIAGEN®, nous avons pu traiter les données du séquençage en plusieurs étapes. Dans un premier temps, nous avons retiré les reads de taille inférieure à 100 pnb et retiré les 30 premiers et derniers nucléotides de chaque reads. Ensuite, nous avons réalisé une étape de « mapping » qui consiste à comparer nos reads avec notre séquence de référence préalablement préparée. Cette étape nous permet d'obtenir une séquence consensus, c'est-à-dire la séquence nucléotidique majoritaire à chaque position d'un alignement de séquences.

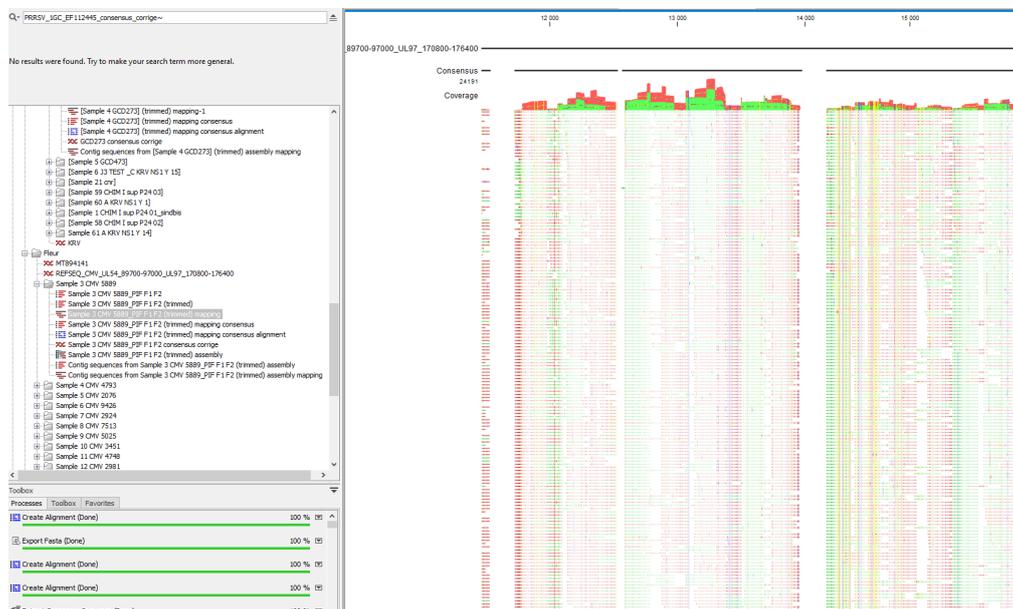


Figure 30 : Mapping des reads avec notre séquence de référence

Cette séquence consensus va être alignée à la séquence de référence afin de les comparer et détecter les mutations ponctuelles, délétions ou insertions, ou encore des erreurs sur la séquence consensus.

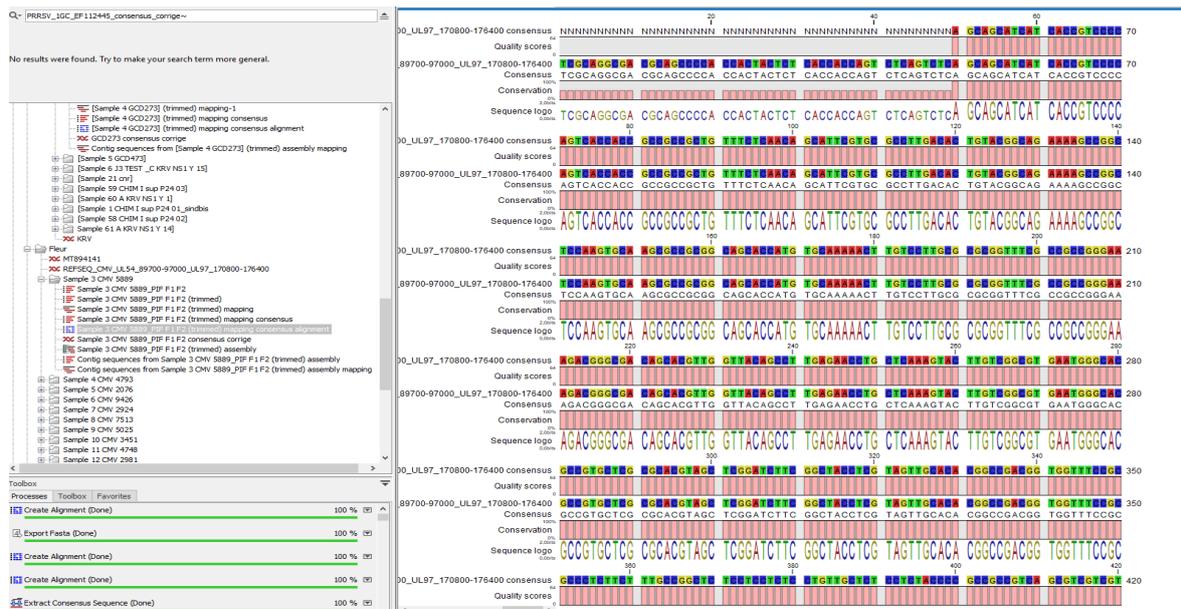


Figure 31 : Correction des erreurs

Enfin, une fois notre séquence consensus corrigée, nous allons la comparer avec une séquence de référence de novo à partir des reads, pour vérifier qu'il n'y ait pas d'erreurs aberrantes sur notre séquence consensus.

C'est à partir des séquences consensus corrigées de chaque échantillon que nous avons pu réaliser un alignement avec nos 39 séquences de références sélectionnées précédemment, sur le logiciel MEGA, afin d'analyser les variabilités et les similarités.

Nous avons remarqué que certains échantillons n'avaient pas été séquencés entièrement. Toutes les séquences consensus possèdent un trou entre la position N°7432 et 9332 de notre alignement, qui correspond à une partie de la région N°1. Le problème peut venir d'une erreur sur une des amorces puisque toutes les séquences sont touchées. Plusieurs trous à des positions différentes, ont été observés sur plusieurs séquences, certaines d'entre elles ont des trous de plus de 10000 nucléotides. Ces séquences correspondent aux échantillons N°0110831605, N°0100736951, N°0110857985, N°0110803041, N°0090593404. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : soit le nombre de reads initial est trop faible, soit notre ADN a été mal amplifié. On peut voir sur le tableau 8, que pour ces 5 échantillons, le nombre de reads utilisé pour le séquençage est correcte (autour de 200 000), mais que les pourcentages de reads qui ont mappé avec la séquence de référence sont faibles (<10%). En regardant de nouveau les aspects des électrophorèses, ces 5 échantillons avaient en effet un signal plus faible que les autres. C'est donc

la qualité de la PCR qui a impacté sur nos résultats de séquençage. Ces 5 échantillons seront éliminés pour la suite de l'analyse. De plus 4 échantillons ont été perdus de vue. Nous avons donc un total de 21 échantillons exploitables.

Numéro d'échantillons	Nombre de reads	Nombre de reads qui ont mappé	Pourcentage
0090615889	551741	515769	93,4%
0090544793	162335	93272	57,4%
9072032076	97831	33640	34,3%
8070899426	588158	499851	84,9%
8050732924	539210	459362	85,1%
8060817513	816993	478818	58,6%
8070855025	655107	419311	64,0%
8060733451	384175	275488	71,7%
9092144748	327290	273982	83,7%
9092192981	452444	443216	97,9%
9092228947	259795	256446	98,7%
9092218272	338946	62672	18,4%
9061911850	1102245	514318	46,6%
9102251494	845016	415412	49,1%
9092182616	258429	27861	10,7%
7100013409	111901	11143	9,96%
0110831605	323667	23287	7,19%
0100736951	475108	14491	3,05%
0110857985	428499	604	0,14%
0110803041	350111	29812	8,52%
0090593404	151034	4542	3,01%
9092161441	651030	590726	90,7%
9102277303	545874	481596	88,2%
9061941243	614289	549021	89,3%
9061900510	551030	474487	86,1%

Tableau 8 : Nombres de reads et nombre de reads mappant avec la séquence de référence

Nous avons, dans un premier temps, réalisé un arbre phylogénétique à partir de l'alignement des 39 séquences de référence et des séquences de nos 21 patients, pour observer la diversité génétique. En effet, nos séquences sont plutôt dispersées sur l'ensemble de l'arbre (Figure 32), montrant une variabilité importante. Plusieurs groupes sont observables, avec des similarités au sein d'un même groupe. Il serait intéressant de connaître l'origine géographique de chacune de nos séquences pour pouvoir mettre en évidence des groupes avec des origines géographiques différentes, ou bien de connaître les manifestations cliniques des patients pour éventuellement trouver des associations génétiques.

Ensuite, nous avons regardé le nombre de nucléotides différents entre toutes les séquences. Les séquences les plus proches ont seulement 1 nucléotide de différence et correspondent à 6 patients. Alors que les séquences les plus éloignées possèdent 178 nucléotides différents. Ce qui représente un maximum de 0,93% de différences entre les séquences, sachant que la taille de nos séquences était de 19 100 nucléotides. Ce qui nous montre que la séquence du génome du CMV est très conservée. Le fait d'avoir travaillé sur des régions assez grandes, nous a permis d'avoir suffisamment de variabilité entre les séquences, rendant le génotypage intéressant.

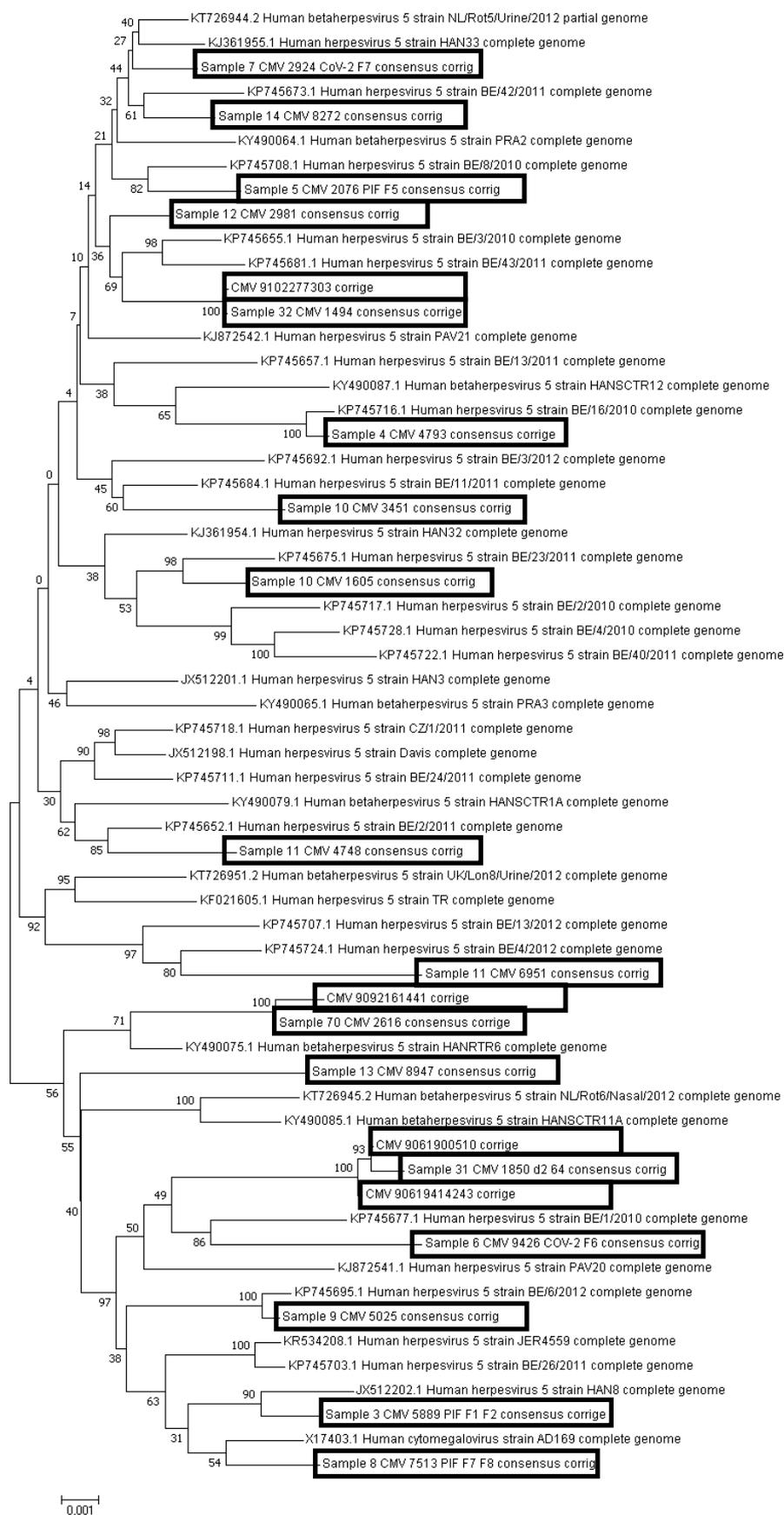


Figure 32 : Arbre phylogénétique avec les séquences de référence et nos échantillons

DISCUSSION

Le CMV est un agent pathogène ubiquitaire responsable la plupart du temps d'infections asymptomatiques mais pouvant provoquer des maladies graves chez les patients immunodéprimés. En effet, le CMV reste une cause majeure de morbidité et de mortalité chez les patients transplantés et un pathogène opportuniste chez les patients VIH au stade SIDA. Il est aussi la première cause d'infection congénitale d'origine virale. Sa prise en charge représente donc un intérêt au niveau de la santé publique. Le diagnostic clinique du CMV peut être rapidement confirmé en laboratoire, ce qui facilite l'instauration précoce d'un traitement visant à réduire les effets de la maladie. Les traitements actuellement disponibles, peu nombreux mais efficaces, sont des inhibiteurs de l'UL54 codant pour la polymérase virale. Ils ont pour inconvénients de présenter des toxicités non négligeables, tels que l'hématotoxicité et la néphrotoxicité, et leur utilisation prolongée peut être responsable d'émergence de mutations de résistance. D'autres facteurs peuvent être mis en cause dans le développement de résistance aux traitements comme une immunodépression sévère, des épisodes multiples de réactivation du CMV, des charges virales élevées ou des concentrations plasmatiques d'antiviraux sous-optimales en raison d'une mauvaise observance ou d'une faible absorption des médicaments.

Devant la non-réponse aux traitements, la recherche de ces résistances aura un réel impact sur l'adaptation de la stratégie thérapeutique du patient. Selon le contexte et les mutations retrouvées, il sera nécessaire soit d'augmenter les doses, soit de changer de molécules antivirales. Tous les médicaments disponibles contre le CMV ciblent l'UL54, cependant, le GCV et le VGCV nécessitent également une phosphorylation par l'UL97 pour être actifs. Ainsi, des mutations aux niveaux des gènes UL97 et UL54 peuvent conférer une résistance au GCV et au VGCV, tandis que les résistances au CDV et au FOS sont associées uniquement à des mutations sur l'UL54. De nouvelles cibles antivirales ont d'ailleurs été développées devant l'émergence de ces résistances (comme le letermovir, le maribavir...). Il est possible de détecter des résistances par une approche phénotypique en réalisant une culture virale et en interprétant la CI50. Mais le CMV étant un virus complexe, de grande taille et difficile à cultiver, le phénotypage a été remplacé par des techniques de génotypage de l'ADN viral, plus précise et plus sensible. Les principales régions ciblées pour le génotypage sont les codons de 300 à 1000 de l'UL54 et les codons de 450 à 650 de l'UL97, puisque

ce sont les deux régions où de nombreuses résistances ont été décrites. Mais dans de récentes études, il est conseillé de séquencer l'ensemble des codons de l'UL97 et UL54, ainsi que l'UL27 pour le MBV et l'ensemble des codons de l'UL56, UL89 et UL51 pour les inhibiteurs de terminase (Ietermovir), ce qui permettrait d'apporter davantage de renseignement sur le génotype.

Notre travail a été de mettre au point une technique combinée de génotypage et de recherche de mutations de résistance pour le CMV, réalisable en routine, sur des extraits d'ADN issus de prélèvements biologiques. Il a fallu dans un premier temps développer une technique de PCR spécifique du CMV, afin d'amplifier des séquences d'ADN qui seront ensuite séquencées par une technique NGS (Ion Torrent™). Enfin ces séquences ont été analysées à l'aide d'outils bio-informatiques.

Pour mettre au point notre PCR Multiplex, il a fallu sélectionner des zones d'intérêt à amplifier pour la suite de notre travail. Nous avons choisi des régions codant pour les deux principaux gènes impliqués dans les résistances aux traitements : l'UL54 et l'UL97 dans leur intégralité. Mais nous avons également sélectionné deux régions hypervariables, qui conservent tout de même une homologie, puisque les variations ne dépassent pas 1%. Ceci nous a permis d'avoir suffisamment de diversité génétique pour réaliser notre génotypage.

Ensuite, une fois le séquençage par NGS réalisé, nous avons pu analyser les séquences consensus en les comparant entre elles et avec des séquences de référence préalablement sélectionnées, et permettant d'identifier des groupes plus ou moins proches au niveau génétique. Les séquences obtenues vont permettre également de détecter les mutations de résistance, à partir des données bibliographiques répertoriant toutes les mutations et leur position au sein du génome. La technique Ion Torrent™ utilisée permet un séquençage rapide à haut débit et d'avoir une importante profondeur. Le séquençage du génome entier reste fastidieux et difficilement applicable en routine mais permettrait de comprendre davantage l'association entre la diversité génétique et la pathogénicité virale.

Notre technique a montré un taux de réussite important mais nécessite encore d'être optimisée. En effet, nous avons rencontré quelques échecs de PCR, liés à des charges virales basses aux alentours de 10 000 copies/mL (obtenue avec la technique ARGENE®). Il serait intéressant de tester davantage d'échantillons, en modifiant certaines conditions de la PCR, tels que la température, la durée des cycles d'amplification, le mix, le nombre d'amorces pour chacune de nos régions, afin de trouver les conditions optimales pour rendre notre technique la plus sensible

possible. L'analyse des électrophorèses a montré un grand intérêt puisque à posteriori, nous nous sommes rendu compte que certains échantillons mal séquencés, présentaient une plus faible fluorescence à l'électrophorèse que les autres échantillons. C'est donc un élément à prendre davantage en considération pour juger de la qualité des PCR. En revanche l'analyse bio-informatique des résultats de séquençage NGS nécessite une expertise particulière et présente beaucoup d'étapes manuelles. Pour la suite, il serait nécessaire de développer un outil répertoriant toutes les mutations de résistance afin de faciliter la recherche des mutations sur nos séquences consensus.

Ce travail m'a permis de développer une méthode sensible de génotypage du CMV. Le génotypage a un intérêt épidémiologique, puisqu'il permet de mettre en évidence des groupes de populations, qui pourrait potentiellement avoir des similitudes au niveau des séquences du virus infectant. Il présente également l'avantage de pouvoir suivre chez le même patient l'évolution au niveau de ces séquences, en fonction du mode de transmission, des formes cliniques qu'il présente ou des mutations qu'il peut développer.

L'élaboration de cette technique de génotypage est le travail préliminaire qui nous permettra, lors d'un futur travail, de rechercher des mutations de résistance. En effet, le but sera de tester notre technique en recherchant les mutations sur des échantillons de patients résistants pour lesquels nous connaissons la mutation en cause (documentée par le CNR des Herpesvirus à Limoges). Cela nous permettra de vérifier si notre technique est capable de mettre en évidence les mêmes résistances et peut être d'autres mutations au sein des régions hypervariables.

Cette technique combinée apportera un réel service puisque son application en pratique clinique au laboratoire de l'IHU Méditerranée Infection à Marseille, permettra d'améliorer la prise en charge des patients en échec des premières lignes de traitements, en diminuant le temps de rendu des résultats et en ayant un suivi sur l'ensemble des prélèvements du patient. En plus d'apporter un service clinique, cette technique permet aussi d'avoir des informations concernant l'épidémiologie, associée ou non à une gravité clinique.

Les données issues des études de séquençage par NGS sur la résistance du CMV pourraient à terme contribuer au développement de bases de données et de systèmes d'interprétation génotypique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol.* juin 2008;197(2):65-73.
2. Vonglahn WC, Pappenheimer AM. Intranuclear Inclusions in Visceral Disease. *Am J Pathol.* sept 1925;1(5):445-466.3.
3. Farber S, Wolbach SB. Intranuclear and Cytoplasmic Inclusions (« Protozoan-Like Bodies ») in the Salivary Glands and Other Organs of Infants. *Am J Pathol.* mars 1932;8(2):123-136.3.
4. Wyatt JP, Saxton J. Generalized cytomegalic inclusion disease. *J Pediatr.* mars 1950;36(3):271-94, illust.
5. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* janv 2009;22(1):76-98, Table of Contents.
6. E. Pilly. *Maladies infectieuses et tropicales Edition 2020 - CMIT*, Catherine Chirouze, Olivier Epaulard, Rozenn Le Berre.
7. CNR Limoges <https://www.unilim.fr/cnr-cytomegalovirus/>.
8. Scrivano L, Sinzger C, Nitschko H, Koszinowski UH, Adler B. HCMV spread and cell tropism are determined by distinct virus populations. *PLoS Pathog.* 13 janv 2011;7(1):e1001256.
9. Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology.* 1996;39(5-6):401-12.
10. Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* juin 2008;72(2):249-65, table of contents.
11. Tomtishen JP 3rd. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology.* 17 janv 2012;9:22.
12. Britt B. Maturation and egress. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., éditeurs. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
13. Sijmons S, Van Ranst M, Maes P. Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. *Viruses.* 5 mars 2014;6(3):1049-72.
14. Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25 nov 2003;100(24):14223-8.
15. Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;154:125-69.
16. Compton T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol.* janv 2004;14(1):5-8.
17. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* juin 2003;98(3):269-97.
18. Khaiboullina SF, Maciejewski JP, Crapnell K, Spallone PA, Dean Stock A, Pari GS, et al. Human cytomegalovirus persists in myeloid progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form. *Br J Haematol.* août 2004;126(3):410-7.

19. Reeves MB, Coleman H, Chadderton J, Goddard M, Sissons JGP, Sinclair JH. Vascular endothelial and smooth muscle cells are unlikely to be major sites of latency of human cytomegalovirus in vivo. *J Gen Virol.* nov 2004;85(Pt 11):3337-41.
20. Bactériologie et virologie pratique. De Boeck Supérieur <https://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782807306493-bacteriologie-et-virologie-pratique> (2020).
21. Dioverti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiol Spectr.* août 2016;4(4).
22. Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EMM, van Lier RAW, ten Berge IJM. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 27 févr 2005;79(4):381-6.
23. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol.* avr 1995;76 (Pt 4):741-50.
24. Hebart H, Jahn G, Sinzger C, Kanz L, Einsele H. CMV Infection in Bone Marrow and Solid Organ Transplant Patients in the Era of Antiviral Prophylaxis. *Herpes.* févr 2000;7(1):13-7.
25. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* août 2007;17(4):253-76.
26. Lanzieri TM, Dollard SC, Bialek SR, Grosse SD. Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *Int J Infect Dis.* mai 2014;22:44-8.
27. Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA.* 10 oct 1986;256(14):1904-8.
28. Référentiel en microbiologie Médicale - Société Française de Microbiologie - 6ème édition 2018.
29. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol.* févr 2006;35(2):216-20.
30. Mise à jour sur l'infection congénitale à cytomégalovirus : la prévention prénatale, le diagnostic néonatal et la prise en charge [Internet]. Disponible sur: <https://www.cps.ca/fr/documents/position/mise-a-jour-sur-linfection-congenitale-a-cytomegalovirus-la-prevention-prenatale-le-diagnostic-neonatal-et-la-prise-en-charge>
31. Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol.* mars 2002;40(3):746-52.
32. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets.* oct 2011;11(5):466-74.
33. <https://www.bioutils.ch/protocoles/14-le-test-elisa>.
34. Mesure de l'avidité des immunoglobulines g spécifiques au cytomégalovirus par dosage immunologique microparticulaire en chimiluminescence (référence – 2015.02.001) [Internet]. Disponible sur: https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Fevrier_2016/INESSS-Avis_analyses_bm-fev16_Mesure_avidite_immunoglobulinesG.pdf
35. Fiche Platelia™ CMV IgG AVIDITY Biorad [Internet]. Disponible sur: http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/fr/881171_2015_01_FR.pdf

36. Eckart P, Brouard J, Vabret A, Freymuth F, Guillot M, Ryckelynck JP, et al. Detection of human cytomegalovirus in renal transplantation: comparison of four diagnostic methods: DNA in sera by polymerase chain reaction (PCR), DNA in leukocyte by PCR, pp65 leukocytic antigenemia, and viremia. *Transplant Proc.* août 1997;29(5):2387-9.
37. Image Culture cellulaire [Internet]. Disponible sur: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/VIRUS_CYTOMEGALOVIRUS.pdf
38. Ducancelle A. Quantification sanguine du cytomégalovirus humain, XIXème Colloque de Virologie de Versailles.
39. Gouarin S, Vabret A, Scieux C, Agbalika F, Cherot J, Mengelle C, et al. Multicentric evaluation of a new commercial cytomegalovirus real-time PCR quantitation assay. *J Virol Methods.* déc 2007;146(1-2):147-54.
40. Diagnostic par sérologie et/ou par recherche du génome viral de l'infection congénitale à cytomégalovirus [Internet]. 2015. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-11/argumentaire_cm_v_me_vd.pdf
41. Mazon MC, Alain S, Leruez-Ville M, Schnepf N. Infections à cytomégalovirus. *Encycl Med Chir* 2009;(8-052-C- 10).
42. Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Polymerase chain reaction. *Natl Med J India.* juin 1992;5(3):115-9.
43. Elyse Poitras et Alain Houde. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11;
44. Mhiri L, Boyer B, Goudard M, Mazon MC, Leruez-Ville M, Slim A, et al. Diversité des méthodes utilisées par les laboratoires français pour la surveillance des infections à cytomégalovirus humain. *Pathologie Biologie.* 2012;60(6):352-6.
45. Poitras É, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. In 2002.
46. Mills AM, Guo FP, Copland AP, Pai RK, Pinsky BA. A comparison of CMV detection in gastrointestinal mucosal biopsies using immunohistochemistry and PCR performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Am J Surg Pathol.* juill 2013;37(7):995-1000.
47. Alain S, Andouard D, Garnier F, Hantz S. Dépistage de l'infection congénitale à CMV, de la conception, naturelle ou médicalement assistée, aux premières années de vie. *Ref Gynecol Obstet* 2014;16:1-10.
48. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn.* mai 2001;21(5):362-77.
49. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis.* déc 1988;158(6):1177-84.
50. Rawlinson WD, Boppana SB, Fowler KB, Kimberlin DW, Lazzarotto T, Alain S, et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect Dis.* juin 2017;17(6):e177-88.
51. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation.* juin 2018;102(6):900-31.
52. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, et al. Guidelines

for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis.* août 2019;19(8):e260-72.

53. Base de données publiques des médicaments [Internet]. Disponible sur: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=67147922&typedoc=R>
54. Vidal Ganciclovir [Internet]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/ganciclovir-6922.html>
55. Hantz S. Traitement des infections à cytomégalo­virus humain (CMV). 15 sept 2009;
56. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis.* déc 2004;4(12):725-38.
57. Boutolleau D, Burrell S. Prise en charge thérapeutique des infections à herpès­virus : traitements actuels et futurs. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2016;2016(487):55-64.
58. Pescovitz MD, Ettenger RB, Strife CF, Sherbotie JR, Thomas SE, McDiarmid S, et al. Pharmacokinetics of oral valganciclovir solution and intravenous ganciclovir in pediatric renal and liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* juin 2010;12(3):195-203.
59. Scott JC, Partovi N, Ensom MHH. Ganciclovir in solid organ transplant recipients: is there a role for clinical pharmacokinetic monitoring? *Ther Drug Monit.* févr 2004;26(1):68-77.
60. Abdul-Aziz MH, Alffenaar J-WC, Bassetti M, Bracht H, Dimopoulos G, Marriott D, et al. Antimicrobial therapeutic drug monitoring in critically ill adult patients: a Position Paper(). *Intensive Care Med.* juin 2020;46(6):1127-53.
61. Résumé des caractéristiques du produit [Internet]. 2017. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0299711.htm>
62. Hostetler KY. Synthesis and early development of hexadecyloxypropyl­cidofovir: an oral antipoxvirus nucleoside phosphonate. *Viruses.* oct 2010;2(10):2213-25.
63. Marty FM, Winston DJ, Chemaly RF, Mullane KM, Shore TB, Papanicolaou GA, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Trial of Oral Brincidofovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* févr 2019;25(2):369-81.
64. Vidal Cidofovir [Internet]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/actualites/14039-vistide-cidofovir-retrait-d-amm-a-la-demande-du-laboratoire.html>
65. Marty FM, Winston DJ, Chemaly RF, Mullane KM, Shore TB, Papanicolaou GA, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Trial of Oral Brincidofovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* févr 2019;25(2):369-81.
66. Britt WJ, Prichard MN. New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res.* nov 2018;159:153-74.
67. Ligat G, Muller C, Alain S, Hantz S. [The terminase complex, a relevant target for the treatment of HCMV infection]. *Med Sci (Paris).* avr 2020;36(4):367-75.
68. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 21 déc 2017;377(25):2433-44.
69. Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S, Richard MP, Bornhäuser M, Groth C, et al. Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 8

mai 2014;370(19):1781-9.

70. Biron KK, Harvey RJ, Chamberlain SC, Good SS, Smith AA 3rd, Davis MG, et al. Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-ribose with a unique mode of action. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2002;46(8):2365-72.
71. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 29 sept 2005;353(13):1350-62.
72. Evaluation de la mesure de la charge virale du cytomégalovirus par amplification génique chez les receveurs d'allogreffes [Internet]. 2015. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-08/argumentaire_cm_vd.pdf
73. Rapport annuel d'activité 2019 - Centre de national de référence des Herpesvirus.
74. Chou S. Antiviral drug resistance in human cytomegalovirus. *Transpl Infect Dis.* juin 1999;1(2):105-14.
75. Landry ML, Stanat S, Biron K, Brambilla D, Britt W, Jokela J, et al. A standardized plaque reduction assay for determination of drug susceptibilities of cytomegalovirus clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2000;44(3):688-92.
76. Chou S, Marousek GI, Van Wechel LC, Li S, Weinberg A. Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase region III mutations observed in clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2007;51(11):4160-2.
77. Gilbert C, Boivin G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2005;49(3):873-83.
78. Sahoo MK, Lefterova MI, Yamamoto F, Waggoner JJ, Chou S, Holmes SP, et al. Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations by next-generation sequencing. *J Clin Microbiol.* nov 2013;51(11):3700-10.
79. Chou S, Erice A, Jordan MC, Vercellotti GM, Michels KR, Talarico CL, et al. Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. *J Infect Dis.* mars 1995;171(3):576-83.
80. Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* oct 2010;23(4):689-712.
81. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1977;74(12):5463-7.
82. Ameziane N, Bogard M, Lamoril J. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. 2006. (Elsevier).
83. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* avr 2018;122(1):e59.
84. Biron KK, Fyfe JA, Stanat SC, Leslie LK, Sorrell JB, Lambe CU, et al. A human cytomegalovirus mutant resistant to the nucleoside analog 9-([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine (BW B759U) induces reduced levels of BW B759U triphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* nov 1986;83(22):8769-73.
85. Talarico CL, Burnette TC, Miller WH, Smith SL, Davis MG, Stanat SC, et al. Acyclovir is phosphorylated by the human cytomegalovirus UL97 protein. *Antimicrob Agents Chemother.* août 1999;43(8):1941-6.
86. Kleiboeker S, Nutt J, Schindel B, Dannehl J, Hester J. Cytomegalovirus antiviral resistance: characterization of results from clinical specimens. *Transpl Infect Dis.* août 2014;16(4):561-7.

87. Chou S. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral Res.* avr 2020;176:104711.
88. Chou S. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis.* août 2015;28(4):293-9.
89. Hakki M, Chou S. The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Curr Opin Infect Dis.* déc 2011;24(6):605-11.
90. Chou S, Ercolani RJ, Marousek G, Bowlin TL. Cytomegalovirus UL97 kinase catalytic domain mutations that confer multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2013;57(7):3375-9.
91. Chou S, Wu J, Song K, Bo T. Novel UL97 drug resistance mutations identified at baseline in a clinical trial of maribavir for resistant or refractory cytomegalovirus infection. *Antiviral Res.* déc 2019;172:104616.
92. Houldcroft CJ, Bryant JM, Depledge DP, Margetts BK, Simmonds J, Nicolaou S, et al. Detection of Low Frequency Multi-Drug Resistance and Novel Putative Maribavir Resistance in Immunocompromised Pediatric Patients with Cytomegalovirus. *Front Microbiol.* 2016;7:1317.
93. Sullivan V, Biron KK, Talarico C, Stanat SC, Davis M, Pozzi LM, et al. A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 1993;37(1):19-25.
94. Chemaly RF, Chou S, Einsele H, Griffiths P, Avery R, Razonable RR, et al. Definitions of Resistant and Refractory Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients for Use in Clinical Trials. *Clin Infect Dis.* 8 avr 2019;68(8):1420-6.
95. El Chaer F, Shah DP, Chemaly RF. How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood.* 8 déc 2016;128(23):2624-36.
96. Gagermeier JP, Rusinak JD, Lurain NS, Alex CG, Dilling DF, Wigfield CH, et al. Subtherapeutic ganciclovir (GCV) levels and GCV-resistant cytomegalovirus in lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* déc 2014;16(6):941-50.
97. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* janv 2013;41(Database issue):D36-42.
98. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* avr 2013;30(4):772-80.
99. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc.* juin 2017;12(6):1261-76.
100. Interprétation des réglementations relatives aux études liées aux DMDIV nécessitant la collecte d'échantillons d'origine humaine; Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé; 30 July 2013.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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

Résumé

Le cytomégalovirus (CMV) est un virus ubiquitaire, dont l'infection est la plupart du temps asymptomatique chez les individus immunocompétents, mais pouvant être responsable d'infections sévères chez les patients immunodéprimés.

Des molécules antivirales existent et ont montré leur efficacité contre le CMV, mais leur utilisation prolongée peut être responsable d'apparition de mutations conférant des résistances aux traitements, notamment au niveau de l'UL97 qui code pour la thymidine kinase virale et l'UL54 qui code pour l'ADN polymérase. L'approche génotypique est la méthode de référence actuellement utilisée pour documenter les résistances et aider à la prise en charge thérapeutique.

Le but de ce travail a été de mettre au point une technique combinée de génotypage et de recherche des résistances afin d'analyser les différents génotypes et d'établir un lien avec la présence de certaines résistances. L'intérêt du génotypage des virus est multiple puisqu'il permet de faire des études épidémiologiques, de rechercher des résistances aux antiviraux et potentiellement d'expliquer les transmissibilités et la pathogénicité spécifique d'un génotype.

Nous avons développé un système de PCR (Polymerase Chain Reaction) multiplex basé sur l'amplification des gènes UL97, UL54 et des zones hypervariables du génome du CMV présélectionnées. Pour cela, nous avons dû d'abord réaliser un travail bio-informatique pour sélectionner les régions d'intérêt et dessiner les amorces dans chacune des régions. Une fois les échantillons amplifiés, nous les avons séquencés par NGS (Next Generation Sequencing). Les séquences consensus obtenues ont été analysées, comparées entre elles et avec des séquences de référence. Néanmoins, cette technique nécessite d'être améliorée, notamment en optimisant l'étape d'amplification et en établissant une banque de séquences.

Ce travail a ainsi permis de développer une technique de génotypage, qui permettra la recherche rapide des mutations de résistance. Le but final est de mettre en place cette technique au laboratoire pour apporter des informations épidémiologiques et améliorer la prise en charge des patients suivis pour des infections à CMV.