

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

Année 2005n°51

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE :

Par

Yves Cariou
.....

Présentée et soutenue publiquement le 6 Octobre 2005

Infections à Adénovirus chez le sujet greffé de
cellules souches hématopoïétique:

Intérêt potentiel du diagnostic moléculaire

Président : Mme Sylviane BILLAUDEL

Membres du jury : Mme Berthe Marie IMBERT

Mme Marianne COSTE

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique
AdV: Adénovirus
CAR: Coxsakie Adénovirus Récepteur
CD 1, 2, 3...: Clusters de différenciation
CMH: Complexe Majeur de Différenciation
CMV: Cytomégalovirus
CSH: Cellule Souche Hématopoïétique
CSHP: Cellule souche hématopoïétique périphérique
EBV: Epstein Barr Virus
ECP: Effet Cytopathique
FDR: Facteur de Risque
G-CSF: Granulocyte stimulating factor
GM-CSF: Granulocyte and Macrophage Stimulating Factor
GM-CFU: Granulocyte and Macrophage Colony Forming Unit
GVHD et cGVHD: Graft versus Host Disease et chronic Graft versus Host Disease
HLA: Human leucocyte Antigène
HBV: Hépatite B Virus
ICT: Irradiation Corporelle Totale
LFA:
NK: Natural Killer
ORL: Otho Rhino Laryngologie
SCID: Syndrome Combiné d'Immunodéficience Sévère
SDS: Sodium Dodécyl Sulfate
Th1 et Th2:
TGF: Tumor Growth Factor
TNF: Tumor Necrosis Factor
RSV: Rous Sarcoma Virus

Liste des abréviations	2
Introduction.....	6
1 Données générales sur les Adénovirus	9
1.1 Diversité et biologie des Adénovirus.....	9
1.1.1 Caractéristiques structurales des adénovirus.....	9
1.1.1.1 Organisation de la capside adénovirale.....	9
1.1.1.2 Rôle des éléments de la capside	10
1.1.2 Organisation historique et génétique des <i>Adenoviridae</i>	11
1.1.2.1 Organisation en groupes.....	11
1.1.2.2 Organisation en sérotypes	11
1.1.2.3 Organisation génétique des adénovirus.....	12
1.1.3 Organisation du génome adénoviral.....	14
1.1.4 Cycle viral	15
1.1.4.1 Fixation.....	15
1.1.4.2 Internalisation.....	15
Réplication	16
1.1.5 Variantes au cycle viral lytique.....	17
1.2 Pathologies Adénovirales.....	18
1.2.1 Infection et maladie adénovirale : définitions	18
1.2.2 Infection chez les personnes immunocompétentes	18
1.2.2.1 Différents sérotypes pour différents symptômes.....	18
1.2.3 Infection chez les personnes immunodéprimées	20
1.2.3.1 Populations à risque	20
1.2.3.2 Facteurs de risque de la maladie adénovirale.....	21
1.2.3.3 Manifestations cliniques de l'infection adénovirale chez l'immunodéprimé ..	22
2 Adénovirus et greffe de cellules souches hématopoïétiques	24
2.1 La greffe de moelle osseuse.....	24
2.1.1 Le système hématopoïétique.....	24
2.1.1.1 Les cellules sanguines circulantes.....	24
2.1.1.2 La moelle osseuse.....	25
2.1.1.3 Organisation histologique	25
2.1.2 Le système de compatibilité tissulaire	26
2.1.3 Greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	27
2.1.3.1 Principe de l'allogreffe de CSH	27
2.1.3.2 Différents types de greffe.....	28
2.1.4 Réactions immunologiques et allogreffe de CSH	30
2.1.4.1 La réaction du greffon contre l'hôte (GVHD)	31
2.1.4.2 La non-prise et le rejet de greffe (HVG)	34
2.1.4.3 L'effet GVL	35
2.1.5 Traitements conditionnants des transplantations de CSH allogéniques.....	35
2.1.5.1 Les conditionnements myéloablatifs.....	35

2.1.6	Traitements immunosuppresseurs	36
2.1.7	Hémopathies malignes et greffes de moelle.....	36
2.1.7.1	Critères de classification des différentes hémopathies malignes	36
2.1.7.2	Les leucémies myéloïdes chroniques	37
2.1.7.3	Les leucémies aiguës myéloblastiques ou LAM	37
2.1.7.4	Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)	38
2.1.7.5	Les autres hémopathies malignes	38
2.1.7.6	Autres indications de la greffe de moelle.....	39
2.2	Immunité antivirale.....	40
2.2.1	Immunité antivirale chez les patients immunocompétents	40
2.2.1.1	Immunité naturelle	40
2.2.1.2	Immunité humorale	41
2.2.1.3	Immunité cellulaire	41
2.2.1.4	Réponses immunes dirigées contre l'adénovirus.	42
2.2.2	Immunité chez le patient greffé de moelle	42
2.2.2.1	Statut immunologique du patient greffé de moelle	42
2.2.2.2	Risques infectieux liés à la greffe de moelle.....	43
2.3	Infections adénovirales chez les patients allogreffés de moelle	44
2.3.1	Epidémiologie de l'infection adénovirale chez le patient greffé de moelle	44
2.3.2	Les différents facteurs de risque d'infection adénovirale chez les patients greffés de moelle	46
2.4	Prise en charge des complications infectieuses chez le patient greffé de moelle ..	47
2.4.1	Trois stratégies de traitement	47
2.4.1.1	Mesures préventives	47
2.4.1.2	Traitements curatifs.....	48
2.4.1.3	Traitements préemptifs.....	48
2.4.2	Les thérapeutiques anti adénovirales.....	50
2.4.2.1	LA RIBAVIRINE	50
2.4.2.2	Le CIDOFOVIR.....	51
2.4.2.3	Bilan des essais cliniques utilisant les analogues nucléosidiques RIBAVIRINE et CIDOFOVIR.	53
2.5	Evolution des traitements anti-adénoviraux.....	54
2.5.1	Les conditionnements non myéloablatifs.....	54
2.5.2	L'expansion ex vivo des CSH	55
2.5.3	Injection de lymphocytes cytotoxiques totaux et spécifiques d'antigènes viraux : cas de l'EBV, du CMV et de l'AdV.....	55
3	Diagnostic biologique des infections adénovirales	57
3.1	Diagnostic « classique » de l'infection adénovirale	57
3.1.1	Indication.....	57
3.1.2	Culture cellulaire	57
3.1.3	Diagnostic immunologique sur les fluides biologiques	58
3.1.4	Techniques de marquage sur tissus	59
3.2	Approches moléculaires du diagnostic	61
3.2.1	Prétraitement de l'échantillon et principe de marche en avant	61

3.2.2	Principe général de l'amplification génique par PCR.....	61
3.2.3	PCR quantitative en temps réel.....	64
3.2.3.1	Principe de la quantification par PCR.....	64
3.2.3.2	Marquage et détection des amplicons par la technique « rapporteur extincteur » Taq Man*	65
3.2.3.3	Matériel	66
3.2.3.4	Stratégies de quantification d'un ADN viral.....	67
3.2.3.5	Contrôles d'une quantification par PCR temps réel.....	69
3.2.4	PCR quantitative multiplexe	70
3.2.4.1	Différentes stratégies de multiplexage	70
3.2.4.2	Matériel utilisé.....	71
3.2.4.3	Validation de la PCR AdV multiplexe en temps réel.....	73
3.2.5	Etapes post PCR	75
3.2.5.1	Mesure du poids moléculaire du fragment amplifié.....	75
3.2.5.2	Contrôles de la séquence d'ADN du fragment amplifié	75
3.3	Conditions pour la mise en place d'une technique de PCR en temps réel.....	76
3.3.1	Etude de la publication de Leruez ville et al.	76
3.3.1.1	Méthodologie	76
3.3.1.2	Analyse des résultats	77
3.3.2	Développement de la PCR AdV quantitative et multiplexe au laboratoire de virologie de Nantes.....	77
3.3.2.1	Mise au point.....	77
3.3.2.2	Premières utilisations cliniques de la PCR adénovirale consensus au CHU de Nantes	78
3.4	Perspectives de développement de la PCR multiplexe temps réel.....	83
3.4.1	Elargissement de l'utilisation de la PCR multiplexe temps réel	83
3.4.2	Sensibilité de la technique et rapidité de la mise en œuvre de moyens thérapeutiques.....	83
3.4.3	Utilisation de la PCR AdV dans le suivi et la mise en œuvre des thérapeutiques antivirales	84
3.4.4	Spécificité et sélectivité pour l'ensemble des sérotypes adénoviraux détectables	84
3.4.5	Utilisation de la PCR AdV dans l'affinement des connaissances épidémiologiques	85
4	Conclusion.....	86
5	Bibliographie	88
6	Table des figures.....	91
7	Table des tableaux	91
8	Table des images	91

Introduction

L'hématopoïèse est nécessaire à la genèse de l'ensemble des cellules du sang. Les cellules sanguines sont responsables entre autre des fonctions de protection de l'organisme vis-à-vis des agents infectieux. Un défaut de ces cellules engendre de graves symptômes souvent mortels en l'absence de traitement.

Parmi les traitements disponibles, la greffe de moelle permet la restauration de l'hématopoïèse et assure en théorie une récupération des fonctions sanguines. Les principales causes de greffe sont les syndromes prolifératifs des cellules médullaires et/ou sanguines (leucémies et lymphomes)

Pour réaliser une greffe, il est nécessaire de trouver un donneur possédant la plus grande homologie possible au niveau des marqueurs de surface des cellules sanguines. Ces marqueurs constituent le système HLA permettant la reconnaissance entre le soi du receveur et le non soi du donneur.

On distinguera alors des greffes autologues issues d'un donneur géno-identique et donc HLA compatible les greffes allogéniques résultant d'un donneur possédant des différences au niveau du système HLA. Dans le cas des greffes allogéniques, ces différences peuvent aboutir à des réactions immunes délétères.

Il sera alors possible d'observer des réactions immunes du receveur contre le donneur pouvant aboutir au rejet de greffe. A l'inverse, des cellules immunes du donneur peuvent déclencher la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Pour prévenir ces deux éventualités, il sera nécessaire de mettre en oeuvre une chimiothérapie immunosuppressive.

De même, dans le cas de syndromes lympho ou myéloprolifératifs, une chimiothérapie conditionnante souvent myéloablatrice est nécessaire à l'élimination des cellules malignes. Ces traitements auront comme effet secondaire un retard de récupération des fonctions immunes et pourront ainsi être un facteur favorisant l'apparition d'infections opportunistes.

Les maladies opportunistes sont dues à des agents infectieux qui sont le plus souvent bénins chez les personnes immunocompétentes. On distingue des affections fongiques (liées à *Aspergillus* sp, *Candida albicans*...), bactériennes (liées à *Toxoplasma gondii*...) ou bien des atteintes virales (impliquant le Cytomégalovirus ou CMV, l'Herpes simplex virus, l'Epstein Barr Virus.).

L'utilisation de traitement préventifs ou curatifs contre ces divers pathogènes a permis de diminuer leur prévalence et leur gravité chez le patient greffé de moelle allogénique. Il apparaît cependant que de nouveaux pathogènes opportunistes émergent chez ces patients. Parmi ceux-ci, l'adénovirus (AdV) provoque des infections aux complications souvent mortelles.

Il existe en fait différents types d'AdV. On pourra les classer en sérotypes en fonction de leur antigènes de surface (42 sérotypes différents ont été identifiés chez l'Homme) ou de leur potentiel biologique chez l'animal (7 sous groupes ont pour l'instant été identifiés : A,B,C,D,E,F,G). Plusieurs études ([Référence 1](#)) ont sérotypé des AdV détectés chez différents

patients. Elles ont alors mis en évidence une symptomatologie et un potentiel infectieux propre à certains sérotypes ou groupes adénoviraux.

Du point de vue clinique, on distinguera l'étape infectieuse sans signes cliniques de l'étape infectieuse bruyante dite maladie adénovirale. Cette dernière est définie par la combinaison de deux résultats positifs établis par des méthodes de diagnostic « classiques », c'est-à-dire par une culture cellulaire positive d'un prélèvement biologique et par une coupe histologique caractéristique de l'infection adénovirale.

La maladie adénovirale peut alors toucher les tissus pour lesquels l'AdV présente un tropisme naturel (Sphère pulmonaire et digestive principalement) mais peut aussi devenir invasive en touchant d'autres tissus (Rein, foie...). Si l'infection touche plusieurs organes, on parlera alors d'infection disséminée et l'AdV pourra être mis en évidence à partir de prélèvements sanguins. Dans ce dernier cas, le pronostic du patient sera des plus réservés.

Contre le pouvoir pathogène des AdV, différents essais cliniques ont évalués l'efficacité de traitements antiviraux (principalement la RIBAVIRINE et le CIDOFOVIR). Ces molécules antivirales ont été utilisées de façon curative, c'est-à-dire après que l'infection adénovirale ait générée des atteintes cliniques mais aussi de façon préemptive, c'est-à-dire chez des patients pour qui l'infection adénovirale a été diagnostiquée sans pour autant qu'il y ait présence d'une maladie adénovirale.

Même si ces essais n'aboutissent pas encore à des conclusions statistiques sur l'efficacité des différents traitements (essentiellement de par le faible nombre de patients inclus et l'absence de groupes contrôles de patients), ils ont permis de cerner les facteurs de risque (FDR) d'infection par AdV chez les patients greffés de moelle. L'âge des patients et certainement la mémoire immunitaire aux infections par AdV constituent le premier FDR. Le degré de mésappariement du système HLA entre receveur et donneur apparaît être un second FDR. Enfin, le degré de compétence immune lié à un traitement immunosuppresseur ou à un protocole de myéloablation est le dernier facteur impliqué.

Les différents essais cliniques montrent également que les techniques de diagnostic sont essentielles dans la compréhension de la maladie adénovirale et la mise en œuvre d'une thérapeutique efficace. Tout d'abord, la rapidité du diagnostic permet de concentrer la thérapeutique sur l'infection par AdV. La quantification de la charge virale informe également le clinicien sur la gravité de l'infection adénovirale. Enfin, le groupage de l'AdV incriminé permet d'améliorer les connaissances épidémiologiques concernant les différents AdV pathogènes.

Plusieurs techniques diagnostiques sont utilisées en routine pour assurer ces trois fonctions. Les plus courantes sont la culture cellulaire, la mise en évidence des antigènes viraux, ou encore le diagnostic histologique. Cependant, face aux inconvénients liés à ces techniques (délai de mise en œuvre, coût et ou faisabilité), de nouvelles techniques de biologie moléculaire se développent.

L'objet de cette étude est de suivre les conditions de développement d'une technique d'amplification de l'ADN (ou PCR) capable de réaliser de façon simultanée les trois principaux critères diagnostiques. La mise en routine de cette technique dite de **PCR multiplexe en temps réel** doit alors à terme permettre d'améliorer la survie des patients victimes d'infections adénovirales opportunistes.

Pour cela, un type d'échantillon biologique (le sang total dans un premier temps) devra être prélevé chez un patient pour lequel on suspectera une infection par AdV. Sur l'ADN extrait à partir de cet échantillon, la présence d'un adénovirus sera évaluée par amplification d'une partie du génome viral via une technique de PCR (ou polymerisation chain reaction)

La quantification sera ensuite mise en œuvre à l'aide d'une sonde marquée par un système Taq Man. Le signal détecté sera alors proportionnel à la quantité d'ADN amplifié.

Quant au typage du groupe d'AdV incriminé, il sera mis en œuvre par une technique de PCR multiplexe où plusieurs amplifications potentielles peuvent être réalisées simultanément. Des sondes marquées par différents fluorophores discrimineront les principaux groupes adénoviraux (A,B,C,D et F).

Nous verrons ensuite comment cette technique a été mise au point puis a été utilisée pour typer et quantifier des AdV issus du sang total de deux patients greffés de moelle.

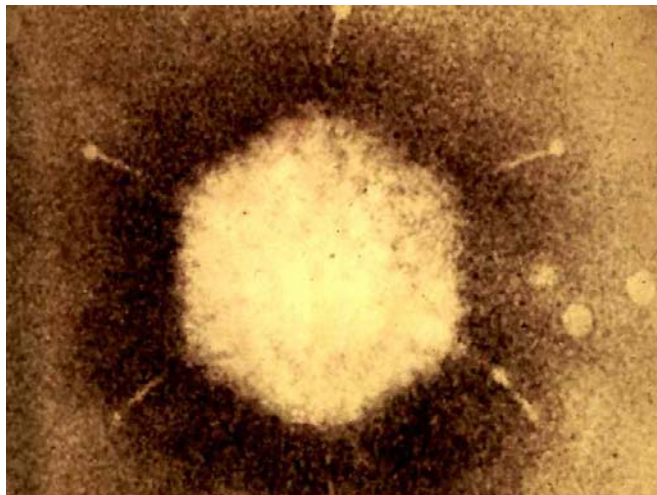
Toutefois, pour bien comprendre les enjeux du développement de cette technique de diagnostic, il est important de s'arrêter dans un premier temps sur la biologie des adénovirus (AdV) et sur leur potentiel pathogène.

1 Données générales sur les Adénovirus

1.1 Diversité et biologie des Adénovirus

Pour mieux comprendre la maladie adénovirale et la mise en œuvre de son diagnostic, il est avant tout nécessaire de s'arrêter sur la biologie des adénovirus.

1.1.1 Caractéristiques structurales des adénovirus.



*Image I : Vue d'un Adénovirus par microscopie électronique
(Image disponible sur le site www.ebola.com)*

1.1.1.1 Organisation de la capside adénovirale

Tous les virus de la famille des *adénoviridae* partagent les mêmes caractéristiques structurales. Ce sont des virus nus, c'est-à-dire qu'ils sont pourvus d'une capside sans enveloppe. D'une taille comprise entre 60 à 90 nm, ils sont formés par une capside de symétrie icosaédrique.

Un icosaèdre est un polyèdre formé de 20 faces égales toutes formées d'un triangle équilatéral. La capside adénovirale possède de ce fait 12 sommets et 30 arêtes. Elle est formée par l'assemblage d'unités morphologiques appelées capsomères. Trois types de capsomères composent la capside adénovirale : les pentons-base, les hexons et la fibre. 240 pentons et 12 hexons forment une capside qui renferme la molécule d'ADN. La fibre quand à elle est rattachée au penton-base et l'ensemble forme le penton. Enfin, la capside renferme une molécule d'ADN qui contient l'information génétique nécessaire à son élaboration. On trouve également des protéines non structurales associées à l'ADN viral.

Cependant, derrière l'apparente complexité de l'organisation structurale de la capside, seules 10 protéines codées par 10 gènes la composent. Le modèle de l'agencement de ces protéines a été proposé par Brown et al en 1975 (Figure I ; [Référence 2](#)).

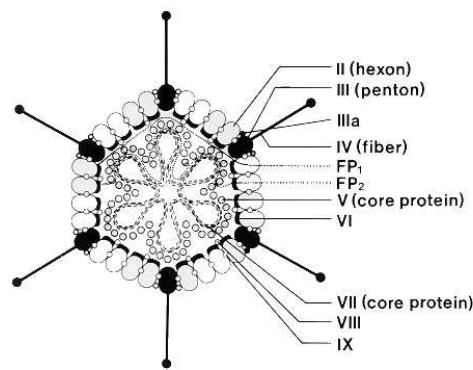


Figure I - Organisation des protéines constituant la capsid adénovirale :

le nom des protéines est proposé en chiffres romains dans l'ordre décroissant de leur poids moléculaire. (Référence 2)

1.1.1.2 Rôle des éléments de la capsid

La capsid a pour fonction principale de protéger l'intérieur du virus vis-à-vis du milieu extérieur. En tant que virus nu (et par opposition aux virus enveloppés), l'AdV est relativement stable dans l'environnement extérieur. La particule virale alors inerte (appelée virion) peut ainsi adopter un mode de transmission indirecte. En effet, elle pourra passer d'individu à individu via une surface extérieure. Il est alors important de savoir que la capsid est résistante à une exposition à l'alcool à 70° mais est sensible à l'action de détergents comme le SDS 0.25% (Sodium dodécyl sulfate) ou encore aux agents oxydants comme l'hypochlorite de sodium 1% (Référence 3).

Au cours du cycle infectieux, d'autres fonctions des éléments de la capsid apparaissent. Au contact d'un organisme, la capsid aura pour rôle la reconnaissance des cibles cellulaires à infecter. C'est la fibre qui assure dans un premier temps le contact virus-cellule. Elle porte à son extrémité une partie qui varie en fonction des types adénoviraux. De cette extrémité dépend le tropisme du virus. Le tropisme est la propriété d'un virus à infecter un type cellulaire particulier. L'extrémité de la fibre apporte en plus l'affinité et la spécificité avec laquelle le virus fixe sa cible cellulaire. Des variations de quelques acides aminés de la fibre suffisent à modifier le tropisme d'un adénovirus.

La base du penton a aussi une activité toxique. Elle est responsable de la destruction des cellules infectées. Ce phénomène est appelé Effet Cythopathique ou ECP et son aspect est caractéristique de l'infection adénovirale. Cette propriété autorise un relargage rapide et massif des particules virales. Un autre aspect de l'infection cellulaire est la visualisation de corps basophiles dans le noyau des cellules infectées. Cette caractéristique utilisée pour le diagnostic est liée au regroupement des protéines de capsid au niveau nucléaire. (Image II et III)

Toutefois, bien que possédant une structure physique commune, la famille des *adénoviridae* regroupe différents types d'adénovirus. Capables d'infecter de nombreuses espèces animales, c'est chez l'homme qu'ils ont été les premiers découverts.

1.1.2 Organisation historique et génétique des *Adenoviridae*

Historiquement, les adénovirus ont pour la première fois été isolés à partir d'organes immunitaires de la sphère ORL : les végétations adénoïdes. Cette découverte relativement récente (1953 ; [Référence 4](#)) a été fortuitement réalisée au cours d'essais d'immortalisation de cellules de l'immunité. L'intérêt pour ces virus a ensuite augmenté puisque les Adénovirus ont été isolés dans d'autres organes humains. C'est à partir de ces découvertes qu'ont été initiées les premières démarches de classification.

1.1.2.1 Organisation en groupes

Les AdV ont alors été répartis en groupes et sérotypes. Un groupe est défini par ses propriétés d'agglutination des hématies et par ses propriétés oncogéniques chez le rongeur ([Tableau I](#)). En effet, les groupes A et B renferment des virus pouvant déclencher des tumeurs chez le rongeur, mais sans que de cas chez l'homme n'aient été rapportés. Cette propriété chez le rongeur semble due à l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire. Cependant il n'y a pas d'explication concernant les différences de potentiel intégratif des AdV entre le rongeur et l'homme.

Les tests d'héماغglutination quant à eux sont liés aux marqueurs d'histocompatibilité présents en surface des globules rouges. Ces tests sont réalisés soit sur des hématies de rat, soit sur des hématies humaines, en prenant alors en compte le système rhésus. L'héماغglutination met en œuvre une reconnaissance de type antigène anticorps capable de faire s'agglomérer les hématies. Cette technique, bien que rapide à mettre en œuvre, ne permet cependant qu'une classification sommaire des AdV. La distinction des AdV en sérotypes permet d'affiner cette classification.

1.1.2.2 Organisation en sérotypes

Chacun des 6 groupes adénoviraux contient plusieurs sérotypes ([Tableau I](#)). Un sérotype est en fait défini par un anticorps neutralisant. Les anticorps neutralisants diminuent le pouvoir infectieux du virus en se fixant sur la partie variable de la fibre. De ce fait, chaque sérotype est capable de générer une réponse immune via la production anticorps qui lui est propre.

Pour produire des anticorps, il est nécessaire chez un animal que le virus arrive au contact des cellules immunitaires. Ce contact aboutira à la libération des anticorps (ou immunoglobulines) dans la circulation sanguine. Lors de prélèvements sanguins, c'est dans la fraction sérique du sang que se trouvent les anticorps. On parlera alors d'antisérum pour un sérum contenant des anticorps neutralisants et on parlera de ce fait de sérotype pour un virus neutralisé par un antisérum.

In vivo, les anticorps permettent, s'ils sont présents en quantité suffisante dans l'antisérum, d'empêcher une réinfection chez l'animal par le même sérotype viral. Le pouvoir neutralisant des antisérums pourra aussi être utilisé in vitro sur des cellules permissives pour un sérotype donné. En mesurant le pouvoir inhibiteur de l'antisérum, il sera possible de typer le virus, dans une perspective de systématisation, mais aussi et surtout dans un but diagnostique. En

effet, chaque sérotype possède une affinité préférentielle pour un tissu, ainsi qu'un potentiel infectieux particulier.

Tableau I : Classification en groupes et sérotypes des adénovirus

Sous-groupe	Sérotypes	Potentiel oncogénique	Hemmaglutination	
			Rhésus	Rat
A	12, 18, 31	Fort	-	+/-
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	Faible	+	-
C	1, 2, 5, 6	Aucun	-	+/-
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47	Aucun	+/-	+
E	4	Aucun	-	+/-
F-G	40,41	?		

C'est la diversité de structure des virus qui est à l'origine de la réponse immune de l'hôte. Cependant la mise en œuvre de la reconnaissance sérologique reste assez lourde, en particulier en regard des techniques d'obtention des antisérums. D'autres critères de classification existent. Liés à l'expansion des techniques de biologie moléculaire, ils permettent de rechercher directement la présence du virus au sein d'un échantillon biologique (Tissus, fluides biologiques...). Ils autorisent alors une classification systématique poussée des adénovirus.

1.1.2.3 Organisation génétique des adénovirus

Pour l'instant, quatre genres d'AdV ont été isolés avec certitude dans la famille des *adénoviridae*. Ces virus peuvent infecter un spectre large d'hôtes chez les vertébrés comme la grenouille, les oiseaux, les rongeurs et l'homme. Les critères de classification se font sur leur organisation génétique, en fonction des homologies et des différences du génome adénoviral. C'est plus particulièrement la région hexonique qui a permis de tracer l'arbre évolutif des adénovirus. En effet, en tant que gène de structure, la région hexonique est très bien conservée au cours de l'évolution des AdV.

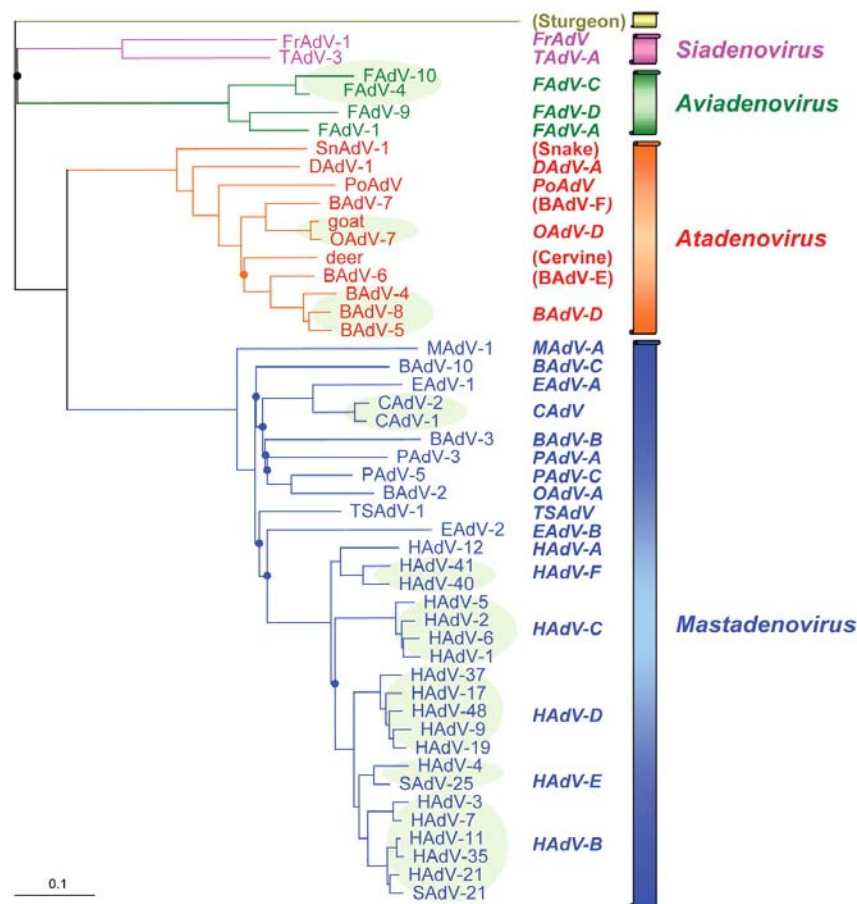


Figure II- Arbre phylogénique établi en fonction des variations du gène de l'hexon de la capsid adénovirale. (Référence 5)

Les membres d'un genre sont indiqués par la même couleur et se rapportent au nom de genre mentionné à l'extrême droite. Ceux qui appartiennent à la même espèce sont regroupés par les ovales de couleur verte. A la fin des branches se trouve indiqué l'abréviation du nom de chacun des virus et le nom des espèces qu'ils infecte est indiqué à leur droite (B, bovin; C, canin; D, canard; E, équin; F, fowl ou volaille; Fr, frog ou grenouille; H, humain; M, murin; O, ovin; P, porc; Po, possum ou opossum; Sn, snake ou serpent; T, turkey ou dinde; et TS, tree shrew ou musaraigne).

Seuls les virus du genre Mastadénovirus ont pour le moment été isolés chez l'homme. En fait, parmi toute la biodiversité des AdV, seuls quelques-uns ont une importance épidémiologique.

Il est également intéressant de constater qu'en fonction de la zone géographique, il existe des variations épidémiologiques en fonction des sérotypes d'AdV. Pour les patients greffés de moelle, les virus du groupe B avec les sérotypes 35, 11 et 34 sont le plus fréquemment isolé aux Etats-Unis alors qu'au Royaume-uni, ce sont les adénovirus du groupe C (sérotype 1, 2 et 5) (Référence 1).

Pour mieux comprendre les différences entre sérotypes adénoviraux ainsi que leur pouvoir pathogène chez l'homme, il est important de se pencher sur l'organisation des gènes adénoviraux.

1.1.3 Organisation du génome adénoviral.

La molécule d'ADN protégé par la capside est d'une taille comprise entre 26000 et 45000 paires de base. Elle se présente sous la forme d'un double brin linéaire avec un brin sens et un brin antisens. Pouvant coder en théorie pour 30 à 40 gènes, l'organisation des gènes dans cette molécule d'ADN est variable entre les groupes adénoviraux. Cependant, il est possible de dégager une organisation schématique du génome adénoviral (Figure III).

On peut regrouper les gènes viraux en fonction de leur ordre de transcription et de l'ordre d'apparition des protéines ainsi produites. On distingue les gènes très précoces (E1A), les gènes précoces ou « early » (E1B, E2A, E2B, E3 et E4) et ensuite les gènes tardifs ou « late » (L1, L2, L3, L4 et L5). Cependant les gènes associés à chaque étape sont répartis tous le long du génome viral et sur les brins sens et antisens.

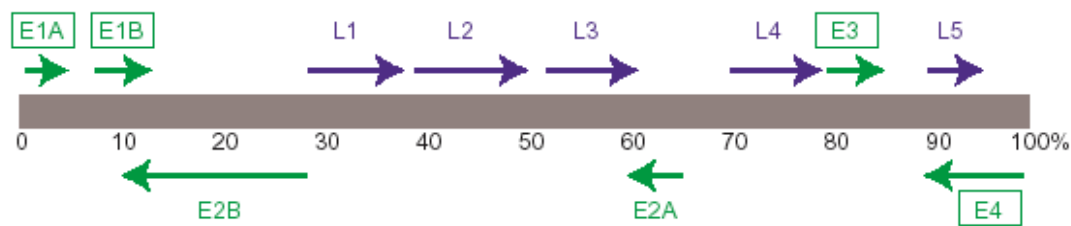


Figure III- Carte représentative du génome adénoviral. (D'après *Expert Review in Molecular Medicine*; 1999; Référence 6).

La taille moyenne des gènes est exprimée en pourcentage de la taille du génome adénoviral. Il est à noter que les gènes E2 et E4 sont transcrits à partir du brin antisens.

Les gènes viraux permettent alors la production directe des particules virales (transcription précoce et tardive, réplication, assemblage des particules virales) mais aussi indirecte en détournant les fonctions cellulaires. Pour cela les gènes viraux (E1B essentiellement) bloquent l'apoptose cellulaire (c'est-à-dire la mort cellulaire programmée) et permettent l'induction de la phase S, phase normalement dédiée à la duplication des gènes cellulaires.

Les gènes viraux peuvent également détourner la réponse immune en provoquant un antagonisme sur les récepteurs cellulaires à l'interféron ou en diminuant l'expression du CMH (ou Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Il est à noter que ce sont les gènes E1A et E1B qui sont responsables du pouvoir oncogènes chez le rongeur, avec en particulier grâce à leur association avec la protéine RB normalement anti-oncogénique et la protéine p53 dont le gène est suppresseur de tumeur. En fait, le cycle viral prend le pas sur le cycle cellulaire.

1.1.4 Cycle viral

Les adénovirus ont besoin comme tous les virus d'une cellule pour se multiplier. Ce parasitisme aboutit le plus souvent à la destruction de la cellule infectée. Au cours de l'infection, pour une particule virale capable d'entrer dans la cellule, plusieurs milliers de virions seront alors produits, capables de réaliser un nouveau cycle. Un cycle viral dure en moyenne 40 heures et chaque étape est contrôlée dans le temps

1.1.4.1 Fixation

Le cycle viral commence par la fixation des particules virales sur leurs cellules cibles (**Figure IV**). Cette étape met en jeu les fibres et la base du penton de la capside avec différents récepteurs cellulaires. Parmi ceux-ci, on peut distinguer les récepteurs CAR (pour Coxsackie-Adénovirus Réceptors) ou le CMH de classe II qui interviennent dans les premiers temps de la fixation virale. Des récepteurs aux intégrines ($\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ entre autres) agissent comme co-récepteurs dans un second temps de la fixation adénovirale. Cette étape d'attachement est une des plus lentes du cycle viral et peut prendre plusieurs heures pour avoir un rendement maximal.

1.1.4.2 Internalisation

Le virus est ensuite internalisé par phagocytose au sein d'une structure cellulaire particulière : l'endosome. Dedicée entre autres à l'élimination des déchets collés à la paroi cellulaire, l'endosome permet l'entrée d'éléments étrangers à la cellule. Des pompes à proton réalisant l'acidification de l'endosome permettent normalement la dégradation de la plupart des éléments qu'ils contiennent. Cependant, l'AdV peut en conditions de pH suffisamment basse dégrader la paroi des endosomes et sortir de la voie endosomale. Une fois libéré dans le cytoplasme, le virus arrive au contact des pores nucléaires. C'est là qu'à lieu le désassemblage de la capside et la libération de l'ADN viral dans le noyau. La réplication virale peut alors commencer.

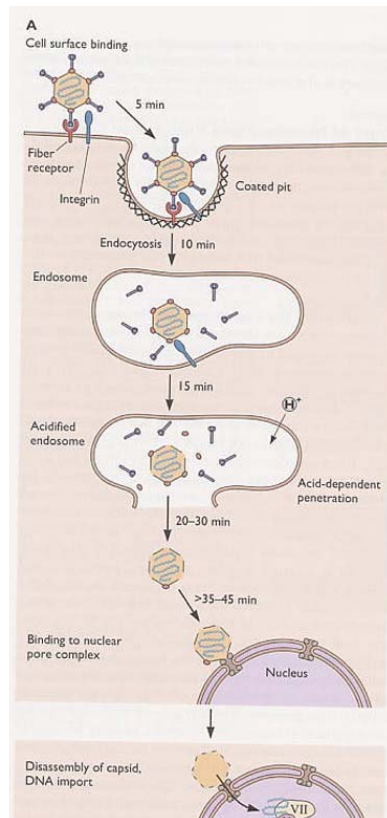


Figure IV: Cinétique de fixation et d'internalisation cellulaire d'un adénovirus.
(Figure disponible sur www.csm.jdu.edu)

Après sa fixation à la surface cellulaire, l'AdV traverse les différents compartiments de cette cellule jusqu'au noyau où il y libère son ADN.

1.1.4.3 Réplication

La réplication concerne des mécanismes similaires pour tous les types adénovirus et a toujours lieu dans l'espace nucléaire. Elle met en jeu les gènes viraux précoces et tardifs, mais aussi les gènes de la cellule infectée. Elle aboutit à la production de l'ensemble des protéines de structure du virus. Une fois l'ADN viral entièrement répliqué, celui-ci est intégré dans les éléments de la capside virale pour former de nouveaux virions qui sont alors libérés au cours de l'ECP.

1.1.4.3.1 Etape précoce

Dès l'entrée du génome viral dans le noyau, la réplication des gènes adénoviraux précoces est initiée. L'ARN polymérase II cellulaire permet en transcrivant les 4 régions précoces (E1, 2, 3 et 4) de générer différents ARN messagers, en fait, chacune de ces régions permet de produire différents ARN. (Richard J. Roberts et Phillip A. Sharp) par un mécanisme d'épissage alternatif. Cette découverte a permis à ses découvreurs un prix Nobel en 1993 ([Référence 7](#))

1.1.4.3.2 Etape intermédiaire

La transcription des gènes précoces permet d'amorcer la réplication de l'ADN viral a proprement parlé. La machinerie de réplication cellulaire est alors détournée vers la production intensive d'ADN viral.

1.1.4.3.3 Etape tardive

Elle est caractérisée par l'arrêt de la production de protéines cellulaires au profit des ARN messagers viraux, qui aboutissent à la genèse des protéines de capsid. Celles-ci s'assemblent dans le cytoplasme de la cellule infectée puis se relocalisent dans le noyau afin de s'associer à l'ADN viral. Sous l'effet toxique des protéines de capsid, les virus sont finalement libérés dans l'environnement extérieur.

1.1.5 Variantes au cycle viral lytique

En fonction du type cellulaire infecté (et plus particulièrement in vitro) d'autres devenir pour le virus existent. On peut ainsi considérer le cycle abortif où l'information génétique virale se retrouve bloquée et aboutit alors à la survie de la cellule infectée. Les mécanismes de cette survie sont mal connus mais semblent impliquer les partenaires cellulaires liés à la réplication virale.

On peut également mentionner le cycle transformant lié à l'intégration stable du génome viral dans le génome cellulaire. Cette propriété utilisée pour la classification en groupes des AdV ne s'observe qu'in vitro et que sur certaines espèces animales (rongeur essentiellement).

1.2 Pathologies Adénovirales

Pour bien comprendre les enjeux du diagnostic par la technique de PCR multiplexe en temps réel ainsi que les différentes stratégies de traitement qui en découlent, il est nécessaire de bien faire la distinction entre infection et maladie adénovirale.

1.2.1 Infection et maladie adénovirale : définitions

Du point de vue biologique, on parle d'**infection adénovirale** quand il est possible d'isoler une souche d'AdV à partir de prélèvements stériles issus d'un patient. Les prélèvements digestifs seront toutefois écartés de cette recherche car ils contiennent potentiellement de façon constitutive des AdV. En effet, nous verrons que l'AdV peut persister de façon latente au niveau de la sphère digestive et ORL.

Du point de vue clinique, l'infection adénovirale n'engendre pas toujours de symptomatologie caractéristique. L'infection pourra alors le plus souvent passer inaperçue ou se limiter à des symptômes modérés. Cependant, chez des personnes possédant une susceptibilité infectieuse accrue, en particulier chez les patients greffés de moelle, les symptômes peuvent devenir très bruyants et mettre en jeu le pronostic vital du malade. Face aux différents pathogènes opportunistes responsables de symptômes infectieux, il sera alors important de pouvoir diagnostiquer la maladie adénovirale.

Le diagnostic de **maladie adénovirale certaine** sera posé en fonction de deux éléments. Il faut tout d'abord obtenir une culture du virus à partir d'un prélèvement stérile. Il faut également qu'une biopsie du patient permette la mise en évidence d'inclusions nucléaires caractéristiques. Cependant, une biopsie n'étant pas toujours réalisable, on parlera de **maladie adénovirale probable** quand au moins deux prélèvements réalisés à des sites différents permettent de cultiver des AdV, que les symptômes sont compatibles avec cette maladie et qu'il n'existe pas d'autre étiologie évidente ([Référence 8](#)).

Avant de parler de maladie adénovirale, il est nécessaire de savoir que bien que l'infection adénovirale soit très fréquente, elle est peu grave chez les personnes douées d'une immunité compétente.

1.2.2 Infection chez les personnes immunocompétentes

Même chez une personne capable de générer une réponse immune adaptée à l'infection adénovirale, les adénovirus peuvent produire différentes symptomatologies variables en fonction du sérotype incriminé.

1.2.2.1 Différents sérotypes pour différents symptômes

C'est principalement lors de la primo-infection, et de ce fait chez l'enfant que l'infection adénovirale est la plus bruyante.

1.2.2.1.1 Primo-infection chez l'enfant

Les adénovirus sont des virus courants dans la population générale puisque la majorité de la population présente une immunité anti-adénovirale avant l'âge de 10 ans. En effet, la

susceptibilité maximale aux adénovirus se trouve être comprise chez l'homme entre 6 mois et 2 ans. Dans la première année d'un individu, le taux d'infection a alors été calculé à 40.8 % (Référence 9).

Si les adénovirus touchent ainsi les jeunes enfants, c'est parce que ceux-ci n'ont jamais été en contact avec le virus. On parlera alors de primo-infection. Cette infection conduira ensuite à la mise en place de défenses immunitaires adaptées, empêchant la réinfection par un virus du même sérotype. Ainsi, l'enfant de moins de 10 ans ne présente plus qu'un taux d'infection de 14.4 % par année (Référence 9). Chez l'enfant, ce sont les sérotypes 2, 1, 3, 5, 7 et 6 dans l'ordre qui sont les plus fréquemment isolés, générant le plus souvent des manifestations pauci-symptomatiques.

1.2.2.1.2 Des pathologies bénignes...

De transmission de personnes à personnes, les AdV peuvent générer le plus souvent des infections bénignes de la sphère ORL. Il a été montré qu'environ 10 % des maladies respiratoires de l'enfant étaient dues à des AdV, le plus souvent sous la forme de trachéites ou de pharyngites. D'autres types d'atteintes bénignes ont également été décrites, comme des conjonctivites ou des gastro-entérites. En fait chaque sérotype adénoviral possède un tropisme préférentiel pour un tissu cible. (Tableau II).

Tableau II: Différents sérotypes pour différentes pathologies chez le patient immunocompétent

Groupe	sérotype	Manifestation clinique
C	1, 2, 5	Infections respiratoires de l'enfant
B	7, 11, 14	Infections urinaires
D	8, 17, 19, 37	Keratoconjunctivites
F	40, 41	Infections gastro-intestinales

1.2.2.1.3 ...et des infections compliquées

Des infections plus graves peuvent aussi survenir chez le patient immunocompétent, comme des hépatites, des kératoconjunctivites, des néphrites, des méningo-encéphalites et des pneumonies. Ces manifestations sont liées à une primo-infection par un sérotype particulièrement virulent. Ces pathologies sont, dans le cas des infections respiratoires, responsables de 8% des pneumonies de l'enfant (sérotypes 3, 4 et 21) (Référence 10)

De par les quantités de virus générées par un individu, ces infections peuvent alors engendrer de véritables épidémies. Parmi les infections de l'adulte, les adénovirus ont été particulièrement étudiés chez les militaires. Population à risque de par la promiscuité des individus, elle a permis de nombreuses études concernant le diagnostic et l'identification des sérotypes infectieux chez l'adulte. Il semble que pour cette population les sérotypes 3, 4 et 7 soient impliqués dans des cas de maladies respiratoires aiguës pouvant aboutir à des cas de pneumonie. (Référence 11)

1.2.2.1.4 Devenir des virus produits : transmission ou latence

L'infection adénovirale peut passer par différentes voies de transmission, la plus souvent respiratoire et oro-fécale. L'incubation virale peut aller de 2 jours à 2 semaines en fonction des sérotypes. Les virus peuvent ensuite être excrétés sur des périodes allant de quelques jours voir à plus de 6 semaines. Le virus peut aussi rester latent dans les tissus infectés comme les végétations adénoïdes et les ganglions mésentériques. Cela exclura donc les prélèvements issus de ces tissus pour établir le diagnostic biologique.

En fait, différents mécanismes de défense immunitaire permettent le plus souvent de faire disparaître les symptômes de la maladie adénovirale.

1.2.3 Infection chez les personnes immunodéprimées

1.2.3.1 Populations à risque

Une personne immunodéprimée est quelqu'un pour qui la réponse immunitaire à long terme est insuffisante à contenir une infection virale, bactérienne ou parasitaire. Cette déficience touche le plus souvent l'ensemble des mécanismes de défense immunitaire.

1.2.3.1.1 Déficits primaires

Il existe plusieurs causes pour cette déficience. Tout d'abord, une anomalie génétique peut rendre inopérants des gènes de l'immunité. La transmission d'anomalies génétiques peut dans certains cas être responsable de graves syndromes. Il s'agira alors d'individus présentant très tôt au cours de leur enfance un Déficit Immunitaire Combiné Sévère (SCID). Les enfants touchés par des mutations touchant les gènes essentiels de l'immunité devront vivre dans un environnement confiné en attendant une éventuelle greffe de moelle.

1.2.3.1.2 Patients greffés et/ou immunosupprimés

Les syndromes lympho-prolifératifs, en diminuant la diversité des cellules de l'immunité, peuvent aussi aboutir à une susceptibilité infectieuse accrue. Un des traitements de ces maladies, la greffe de cellules de la moelle osseuse peut également avoir comme conséquence indirecte la perte de vigilance immunitaire. En effet, le traitement immunosuppresseur destiné à l'amélioration de la tolérance de la greffe fragilise les individus greffés. En fait, toutes les personnes greffées sont en théorie soumises à un traitement immunosuppresseur. Ces populations seront donc à risque vis-à-vis de l'infection adénovirale, que ce soit dans le cas de greffes de cellules ou bien dans le cas de greffe d'organes. L'atteinte adénovirale et les facteurs de risque de cette maladie chez les patients greffés de moelle seront évoqués dans la partie « Greffe de moelle ».

1.2.3.1.3 Patients séropositifs

Enfin, les patients séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), de par le tropisme du VIH pour les lymphocytes, sont aussi des personnes pour qui une infection adénovirale pourra mettre en jeu le pronostic vital. Chez ces malades, il ne semble pas y avoir de sérotype d'AdV plus opportuniste qu'un autre. De plus, l'AdV n'est pas la première cause d'infection opportuniste.

Cependant , plusieurs cas s'atteintes gastro-intestinales ont été décrites, parfois asymptomatiques.

Pour l'ensemble de ces patients, on peut isoler des facteurs de risque, liés principalement à l'immunosuppression, qu'elle soit liée à la maladie, ou bien qu'elle soit iatrogène, c'est-à-dire lié à un traitement médicamenteux.

1.2.3.2 Facteurs de risque de la maladie adénovirale

La maladie adénovirale touche essentiellement les patients immunodéprimés. Parmi ceux-ci, il semble que ce soient les patients greffés de moelle qui présentent le plus fort risque. Cependant, la maladie adénovirale est une complication émergente pour l'ensemble des patients greffés et/ou immunosupprimés.

1.2.3.2.1 Implication du traitement immunosuppresseur

Pour les greffes solides (rein, foie, poumon...) l'infection adénovirale est décrite au cas par cas, sans que de réelles études épidémiologiques n'aient été réalisées. Il est alors possible d'expliquer l'apparente faible incidence de l'infection adénovirale par plusieurs facteurs.

Tout d'abord, les greffes solides ,à l'inverse des greffes de moelle, ne requièrent pas de myéloablation préalable mais juste un traitement immunosuppresseur. De plus, ce type de greffe nécessite des stratégies immunosuppressives moins lourdes que dans le cas de greffe de moelle de par la faible présence de cellules immunitaires issues du greffon.

En fait, il semble évident que le degré d'immunosuppression soit associé au risque de maladie adénovirale. Cependant, cela concerne l'ensemble des maladies opportunistes chez ce type de malades. C'est le cas des infections virales par le Cytomégalo virus (CMV), l'Epstein-Barr Virus (EBV) ou d'infections bactériennes comme la Toxoplasmose chez le patient sidéen.

1.2.3.2.2 Statut immunologique du receveur

Chez le patient sidéen, on pourra corrélérer le risque d'infection par un pathogène opportuniste au taux de lymphocytes T marqués par l'antigène de différenciation CD4 car plus l'infection est active, plus ces cellules sont détruites.

Il en sera de même au cours de déficits immuns primitifs, le risque d'infection opportuniste sera corrélé au nombre et à la qualité des cellules immunes.

1.2.3.2.3 Statut sérologique du donneur?

Enfin, il existe un dernier risque controversé concernant le passage du virus du donneur vers le receveur. Nous avons abordé précédemment le risque de latence de l'AdV dans certains

organes. On pourra alors se demander quel est le risque d'infection adénovirale lié directement à la greffe.

Un élément de réponse peut résider dans le typage sérologique des AdV potentiellement présents chez le receveur. Il pourra aussi être envisageable d'utiliser des techniques de biologie moléculaire pour rechercher la présence d'ADN adénoviral au sein de la greffe.

Dans les deux cas, si le receveur développe une infection adénovirale, une homologie entre la souche du donneur et celle du receveur pourrait incriminer la greffe dans la transmission de l'infection.

Il pourrait même être envisageable, en fonction du génotype adénoviral isolé, d'anticiper le type d'atteinte clinique.

1.2.3.3 Manifestations cliniques de l'infection adénovirale chez l'immunodéprimé

L'infection adénovirale peut aboutir à différents types de manifestations chez le patient immunodéprimé. On distingue en plus du type de tissu touché, différents grades d'atteintes en fonction d'une infection localisée, invasive ou disséminée.

1.2.3.3.1 Infections localisées et invasives

Quatre grands symptômes infectieux sont aujourd'hui rapportés. Au niveau du tractus digestif, des sérotypes du groupe B et C (**Tableau III**) ont été isolés chez des patients souffrant de diarrhées et de colites hémorragiques. Il s'agit ici de sérotypes différents de ceux provoquant des manifestations digestives chez les patients immunocompétents (issus groupe F).

Des infections du tractus respiratoire peuvent aussi, avec des tableaux de pneumonie avoir de graves conséquences. Des sérotypes des groupes A, B et C sont ici impliqués (**Tableau III**).

Au niveau rénal, l'infection adénovirale se traduit souvent par un tableau de cystite hémorragique pouvant parfois se compliquer d'insuffisance rénale aiguë due à une néphrite nécrotique tubulo-intersticielle et à une uropathie obstructive, le plus souvent fatales.

Enfin, des hépatites parfois fulminantes ont pu être reliées à une infection par des adénovirus du groupe C.

Le développement d'une infection adénovirale sur les voies respiratoires ou digestives (qui sont les sites les plus fréquents) peut être du à une primo-infection par une souche adénovirale particulière ou bien être dus à une réactivation. On parlera alors d'***infection localisée***.

Dans les deux dernières localisations, il est possible de qualifier l'***infection adénovirale d'invasive***. Par cela est entendue toute infection adénovirale touchant un seul organe autre que le tractus respiratoire supérieur ou les intestins.

Tableau III- Différents sérotypes pour différents tropismes tissulaires chez le patient immunodéprimé

Groupe	Sérotipe	Organes impliqués
A	31	Poumon, tractus digestif
B	3, 7, 16	Poumon, tractus digestif
B	14, 11, 34, 34, 35	Tractus urinaire, Foie
C	1, 2, 5	Poumon, tractus digestif, Foie

En plus d'une relation entre sérotipe et localisation tissulaire, certains auteurs ont constaté une plus forte prévalence de l'infection sur des sites en relation avec la greffe. Ainsi des cystites chez les patients greffés de rein, des hépatites chez les patients greffés de foie ont été détectées. Une explication possible pourrait résider dans le fait qu'une inflammation de ces tissus favorise l'implantation d'un AdV.

Dans les cas les plus graves, il est possible que la maladie adénovirale touche plusieurs organes. On parlera alors d'infection disséminée

1.2.3.3.2 Infections disséminées

L'infection adénovirale disséminée implique une perte totale de régulation immune et est associée à un passage sanguin des virus, responsable de chocs septiques mortels. Le décès pourra aussi être du à la perte de fonction de plusieurs organes touchés par l'infection. La détection du virus dans le sang total du patient paraît alors être la façon la plus rapide pour diagnostiquer une infection adénovirale disséminée

Il a été montré dans plusieurs études que le degré de gravité de la maladie adénovirale (i.e. une évolution vers une forme invasive ou disséminée de la maladie) était corrélé au degré de lymphocytopénie des malades (**Référence 12**). La perte de vigilance immune est ainsi le facteur de risque clé du risque vital associé à la maladie adénovirale. Ce point développé dans la partie concernant les facteurs de risque des patients atteints par l'infection adénovirale.

Même si la fréquence des infections adénovirales reste faible par rapport à d'autres pathologies opportunistes, l'infection chez le patient immunocompromis aboutit fréquemment à une évolution fatale de la maladie (jusqu'à 64% de décès chez les patients infectés (**Figure VIII**))

En parallèle des informations apportées par la symptomatologie, des techniques de diagnostic rapides doivent être mises en œuvre afin d'adapter au plus vite la prise en charge thérapeutique. Pour ce faire différentes techniques peuvent être mises en œuvre. Nous nous concentrerons alors sur le développement d'une technique de biologie moléculaire appliquée au dépistage de l'infection adénovirale chez le patient greffé de moelle.

Il est alors ici important de s'arrêter sur les causes de la greffe de moelle ainsi que sur les différentes stratégies thérapeutiques associées à la prise en charge des patients greffés de moelle.

2 Adénovirus et greffe de cellules souches hématopoïétiques

2.1 La greffe de moelle osseuse

Le système lympho-hématopoïétique est chez l'homme le seul organe capable d'entièrement se renouveler. Située principalement dans les os plats, la moelle hématopoïétique permet de générer l'ensemble des lignées sanguines. Pour différentes raisons, il peut être nécessaire de remplacer le système hématopoïétique. Pour cela sera réalisé une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

2.1.1 Le système hématopoïétique.

La notion de système hématopoïétique fait en fait référence à deux compartiments différents. La moelle où a lieu l'hématopoïèse à proprement parler, et le système sanguin où les cellules sanguines circulantes assurent différentes fonctions.

2.1.1.1 Les cellules sanguines circulantes

Dans l'organisme humain, le sang contient différents éléments figurés ou cellules. On considère ainsi :

- les globules rouges ou érythrocytes assurant la diffusion de l'oxygène dans l'organisme,
- Les globules blancs ou leucocytes responsables de la mise en œuvre des mécanismes de défense immunitaire,
- Les plaquettes ou thrombocytes dont le rôle est la coagulation des plaies vasculaires.

2.1.1.1.1 Erythrocytes

Présentes entre 4 et 5 millions de cellules par mm^3 de sang, les érythrocytes ou globules rouges sont des cellules sans noyau de forme discoïde contenant un pigment : l'hémoglobine. D'une taille moyenne de $7\ \mu\text{m}$ par 9 , elles occupent un volume moyen de $90\ \mu\text{m}^3$.

Les globules rouges sont fabriqués au cours de l'érythropoïèse et des anomalies de l'hématocrite ou du taux d'hémoglobine signalent le plus souvent un désordre périphérique (au niveau du sang circulant) que central (au niveau de la moelle).

2.1.1.1.2 Les globules blancs

Entre 5 et 10000 par mm^3 de sang, les leucocytes (ou globules blancs), à l'inverse des érythrocytes possèdent un noyau. Leur taille est aussi plus importante : de 9 à $10\ \mu\text{m}^3$.

On distingue parmi eux les polynucléaires (55 à 70% des cellules blanches) divisés en polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles. Ils sont responsables entre autre de mécanismes de défense immuno-allergiques.

Les lymphocytes qui représentent 20 à 30 % de la population des leucocytes permettent la reconnaissance des antigènes ainsi qu'une réponse antigène spécifique.

Les monocytes (4 à 8 % de la population leucocytaire) permettent eux aussi la défense immune par des réactions de phagocytose, c'est-à-dire la digestion de débris immunogènes dans l'organisme.

2.1.1.1.3 Les plaquettes

Entre 200000 à 400000 par mm³ de sang, les plaquettes sont des cellules sans noyau d'une taille comprise entre 2 et 3 microns. Elles procèdent du fractionnement d'une cellule plus primitive : le mégacaryocytes. D'une durée de vie normale entre 8 et 10 jours, elles assurent principalement des fonctions hémostatiques en cas de saignement.

2.1.1.2 La moelle osseuse

2.1.1.3 Organisation histologique

La moelle osseuse est un tissu semi fluide gélatineux qui est enfermé dans les os en plus ou moins grande quantité. Son rôle d'hématopoïèse permet de générer les cellules décrites ci-dessus. Retrouvée au départ dans tous les os du squelette chez l'enfant, elle ne se retrouve plus présente chez l'adulte que dans les os plats (os du crâne et os du tronc principalement).

A l'intérieur des os, la moelle active est constituée de trois éléments. Une trame de soutien tendue entre les vaisseaux qui traversent la moelle, les cellules de graisse ou adipocytes qui occupent les mailles de la trame de soutien et enfin les cellules réellement hématopoïétiques.

Le tissu médullaire est nourri par de petites artères. Des capillaires dilatés, les sinus, lui permettent de communiquer avec le système vasculaire. C'est par ces sinus que les cellules matures de la moelle osseuse passent dans la circulation sanguine.

2.1.1.3.1 Hématopoïèse

L'hématopoïèse, c'est la production et la mise en circulation de cellules sanguines. Les cellules sanguines circulantes, malgré leurs différents potentiels, proviennent toutes de la même cellule souche totipotente. Cette cellule dite cellule souche hématopoïétique (CSH), sous l'action de facteurs de croissance spécifiques, va ainsi générer les trois grandes lignées sanguines.

présent sur la plupart des cellules de l'organisme. C'est ce dernier auquel nous nous intéresserons principalement.

Entre deux individus sans lien de parenté, on observe le plus souvent une grande différence du soi à la surface des cellules. Il existe en fait un très fort polymorphisme du système HLA, lié à un très grand nombre de combinaisons possibles pour l'expression de ces gènes en surface des cellules.

Le système HLA obéit aux lois Mendéliennes de transmission génétique à la descendance, c'est à dire que chaque individu hérite à la naissance de la moitié des marqueurs de sa mère et la moitié de ceux de son père.

Des jumeaux homozygotes sont ainsi totalement identiques pour l'ensemble des marqueurs HLA. Des frères et sœur auront une chance sur quatre d'être totalement identiques, une chance sur deux d'être à moitié identiques et une chance sur quatre d'être totalement différents.

Lors d'une greffe, il est nécessaire, afin d'éviter le rejet, d'obtenir le maximum de compatibilité entre le système du donneur et celui du receveur. Ainsi, au cours de la recherche de donneurs compatibles en vue d'une greffe, les chances de trouver deux individus histocompatibles dans la population sont très faibles. Cependant, de par la transmission mendélienne de ces gènes, ces chances sont fortement augmentées si l'on effectue la recherche au sein de la famille.

Pour ce faire, le groupage HLA d'un individu devra alors préciser l'identité des deux marqueurs HLA (issus de la mère et du père) exprimés à la surface des cellules. On les recherche en pratique à la surface des lymphocytes. Ainsi, un typage HLA exprimera pour les 10 groupes HLA le gène qui est exprimé.

Cependant, de par l'existence de mécanismes de recombinaisons assurant la diversification de l'expression des marqueurs de surface et également de par la présence d'antigènes mineurs d'histocompatibilité encore peu connus, il sera très rare, même au sein d'une même famille, de pouvoir observer deux individus géno-identiques.

De ce fait, la plupart des greffes se feront dans un contexte allotypique, c'est-à-dire greffe entre deux individus de même espèce avec persistance de différences entre marqueurs cellulaires de surface. Nous verrons cependant par la suite que ces différences peuvent dans le cas de greffe de CSH avoir des conséquences positives.

2.1.3 Greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Lors d'une perturbation grave de l'hématopoïèse, une transfusion de cellules hématopoïétiques est nécessaire à la restauration des fonctions sanguines. De plus, la présence de CSH parmi ces cellules permet la production de nouvelles cellules différenciées dans le premier mois après la greffe..

2.1.3.1 Principe de l'allogreffe de CSH

En cas d'aplasie médullaire (anomalie ou absence de cellules de la moelle aboutissant à la perte de fonction des 3 lignées sanguines), la greffe peut permettre de recoloniser la moelle

osseuse pour former de nouveaux îlots d'hématopoïèse et ainsi induire la prolifération et la différenciation de nouvelles cellules circulantes.

La greffe peut aussi assurer, de par la présence de cellules différenciées issues du greffon, la protection du receveur vis-à-vis d'éventuelles infections pendant le délai nécessaire à la production de cellules différenciées issues des CSH.

Dans le cas d'hémopathies malignes, un traitement préalable myéloablatif (ou traitement conditionnant) est nécessaire pour éradiquer les cellules malignes et favoriser la prise de greffe. En fait, la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) constitue un traitement curatif utilisé principalement dans les hémopathies malignes. Il a alors pour but l'éradication du clone malin grâce au conflit immunologique inhérent à l'installation des CSH du donneur chez le receveur.

La greffe de CSH peut également être mise en œuvre au cours de déficits médullaires primitifs ou palier des états d'aplasie médullaire induits par des chimiothérapies au cours de cancers. Nous nous concentrerons dans cette étude sur les greffes liées aux hémopathies.

2.1.3.2 Différents types de greffe

Pour bien identifier les différents facteurs de risque de maladie infectieuse adénovirale chez le patient greffé de moelle, il est nécessaire de cerner les différentes stratégies de greffes possibles, en fonction de la nature du tissu greffé, mais aussi en fonction de la nature du système HLA du receveur.

2.1.3.2.1 En fonction du donneur

Greffes syngéniques et autologues

On distingue premièrement les greffe syngéniques où le donneur est le jumeau homozygote du receveur est se trouve alors géno-identique pour le système HLA. Ce cas idéal en terme d'histocompatibilité est par définition très rare et d'autres types de greffes sont alors être mis en oeuvre.

Des greffes autologues peuvent aussi être réalisées. Il s'agit de réaliser un prélèvement de moelle d'un patient et de les lui réinjecter dans un second temps. En pratique, au cours d'hémopathies malignes, le prélèvement est réalisé durant une période de rémission puis est reperfusé en cas de rechute. Ce type de greffe également idéal en terme de risque de rejet présente cependant le risque qu'au sein du prélèvement se trouve, malgré l'état de rémission du patient, quelques cellules malignes capables de réactiver la maladie.

Greffes allogéniques

En l'absence de donneur géno-identique, des greffes à partir d'un donneur allogénique mais non géno-identique peuvent être envisagées dans certains cas. Ces greffes seront donc réalisées dans des situations où le donneur sera HLA identique au niveau des antigènes majeurs d'histocompatibilité mais présentera des différences au sein des antigènes mineurs.

Dans cette situation, le risque de réaction immune du greffon et de l'hôte sont majeurs et le traitement conditionnant devra alors être renforcé, ce qui majorera le risque d'infections opportunistes.

Le donneur sera alors le plus souvent un parent du premier degré mais le greffon pourra également provenir d'un prélèvement de moelle issu d'une banque de donneur. Les fichiers de donneurs volontaires comptent actuellement plus de 6 millions de donneurs. La généralisation des typages en biologie moléculaire a permis un meilleur appariement entre donneur et receveur et une amélioration du taux de survie des patients.

2.1.3.2.2 En fonction du prélèvement

Greffons de moelle osseuse

Aujourd'hui, la principale source de CSH est la moelle osseuse. Le prélèvement du greffon médullaire se réalise sous anesthésie générale en conditions stériles, le plus souvent par aspirations multiples de moelle au niveau des crêtes. Il sera alors possible de collecter 10 à 15 ml de moelle par kg chez le donneur iliaques afin d'assurer l'injection de $2 \text{ à } 3 \times 10^8$ cellules nucléées par kilo du poids du receveur.

Afin d'éviter le risque d'hémolyse en cas d'incompatibilité au niveau du système ABO Rhésus entre le donneur et le receveur et en cas d'allo immunisation du receveur dans un autre système de groupe, on effectue une manipulation *ex vivo* du greffon conduisant à sa desérythrocytation ou à sa déplasmatisation. D'autre part, afin d'éviter le risque de GVHD post-transfusionnelle (Cf partie 3 4), tous les produits sanguins labiles (susceptibles d'être contaminés par des lymphocytes) doivent impérativement être irradiés avant d'être infusés au receveur.

La moelle peut ensuite être infusée au receveur ou bien subir d'autres modifications comme la purge des lymphocytes T. Cependant, de par le caractère invasif de cette technique, d'autres sources de CSH ont été développées.

Les Cellules souches hématopoïétiques périphériques (CSHP)

Il est également possible d'obtenir des CSH à partir du sang périphériques par cytophérèse après injection de G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor). Les cellules souches hématopoïétiques périphériques (CSHP) sont ensuite purifiées via le marqueur de surface CD34+.

L'utilisation des CSHP a remplacé les greffons médullaires dans le domaine de l'autogreffe. En revanche, l'allogreffe de CSHP se heurte à deux problèmes principaux, d'une part la nécessité d'injecter à un sujet sain du G-CSF recombinant pour mobiliser les CSH et, d'autre part, le risque théoriquement plus élevé de GVHD qu'après greffe de moelle. En effet, un greffon de CSHP contient en moyenne dix fois plus de lymphocytes T qu'un greffon médullaire. L'utilisation d'un greffon de CSHP présente cependant des avantages dans certaines circonstances. Ce type de greffon contenant en moyenne quatre fois plus de cellules CD34⁺ qu'un greffon médullaire, il permet, après greffe, une reconstitution hématopoïétique plus rapide et une meilleure prise de greffe.

Cette propriété peut être intéressante dans les situations où il existe un risque important de non prise ou de rejet, en particulier dans les greffes avec conditionnement non myéloablatif, les greffes avec déplétion T du greffon ex vivo et, enfin, les greffes réalisées en situation d'incompatibilité HLA partielle.

La greffe à partir de sang placentaire

Il existe actuellement un développement des greffes réalisées à partir de sang placentaire soit d'un donneur apparenté géno-identique, soit surtout à partir d'un donneur non apparenté. Malgré la richesse en cellules souches d'un greffon de sang placentaire, de telles greffes ne peuvent, cependant, en général être réalisées que chez des enfants, le poids du receveur étant limitant. Par ailleurs, les lymphocytes présents dans le greffon placentaire possèdent des propriétés différentes de celles des lymphocytes contenus dans les greffons médullaires ou de CSHP.

Plus particulièrement, leur faible immunogénicité permet la réalisation de greffes dans des situations d'incompatibilité partielle HLA. En revanche, la reconstitution hématologique est plus longue et le risque de rejet est supérieur pour le greffon placentaire, mais le taux de GVHD aiguë ou chronique est moindre. C'est pourquoi il est justifié d'envisager une greffe de sang placentaire en situation non apparentée chez l'enfant.

La déplétion du greffon en cellules T

Il est actuellement possible d'éliminer des greffons les cellules T. Cette technique, améliore la tolérance du greffon par le receveur (de par une immunogénicité du greffon moins importante) mais fragilise aussi ponctuellement le receveur face aux microorganismes opportunistes tel que l'adénovirus.

La déplétion en cellules T était auparavant réalisée par anticorps monoclonaux anti-T et faisait le plus souvent appel soit à un système de lyse par le complément, soit à une immunotoxine. Actuellement, la déplétion en lymphocytes T se fait le plus souvent par sélection positive des cellules CD34⁺. Cette technique est principalement utilisée dans les greffes à haut risque de GVHD.

L'utilisation de techniques de déplétion T présente trois inconvénients principaux : une incidence de rechute plus élevée, l'abolition de la GVHD s'accompagnant d'une abolition de l'effet GVL, une augmentation de non-prise ou de rejet et une aggravation du déficit immunitaire postgreffe.

On voit alors ici qu'en fonction du type de greffe, le risque infectieux n'est pas le même. En fait, le travail du clinicien repose sur l'établissement d'un équilibre entre risque infectieux et réactions immunologiques entre receveur et donneur.

2.1.4 Réactions immunologiques et allogreffe de CSH

Un greffon hématopoïétique comprend des cellules souches capables de reconstituer de façon durable l'hématopoïèse. Il comprend également des cellules immunocompétentes susceptibles de reconnaître l'hôte comme étranger.

Cette réactivité allogénique est responsable d'une complication importante dont la morbidité et la mortalité demeurent élevées : la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). De plus, les lymphocytes T du donneur contenus dans le greffon jouent un rôle important dans la prévention du rejet de greffe (HVG), en participant à la destruction du système immunitaire de l'hôte, et contribuent de façon significative à l'effet antitumoral associé à la greffe : l'effet du greffon contre la leucémie (GVL). Par ailleurs, le transfert au cours de la greffe de cellules immunocompétentes du donneur permet la reconstitution après la greffe d'un système immunitaire chez le receveur.

2.1.4.1 La réaction du greffon contre l'hôte (GVHD)

2.1.4.1.1 Physiopathologie

La physiopathologie de la GVHD est complexe et encore imparfaitement connue. Elle fait intervenir l'immunité cellulaire, humorale et des phénomènes inflammatoires, avec de nombreuses interactions entre ces différents types.

Trois conditions sont nécessaires au développement d'une GVHD. Il faut que le greffon contienne des cellules immunocompétentes, que l'hôte présente, avec le donneur, des différences au niveau d'antigènes majeurs ou mineurs d'histocompatibilité capables d'être reconnus comme étrangers par le système immunitaire du donneur et que l'hôte soit suffisamment immunodéprimé pour être incapable de rejeter le donneur .
de réactions.

On distinguera en fonction du délai d'apparition des symptômes différents types de GVH.

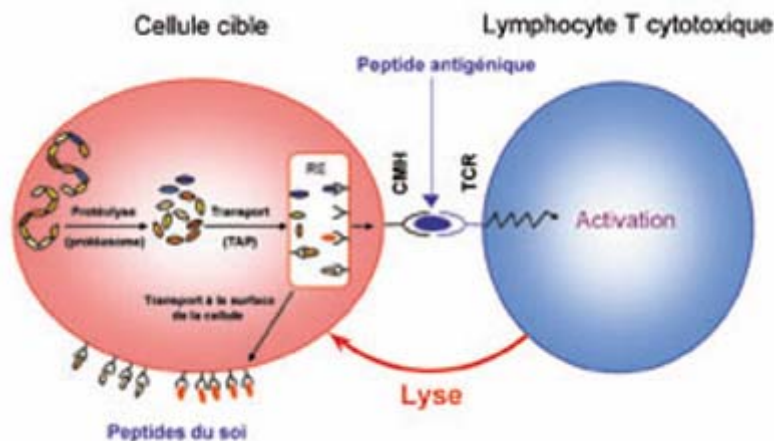


Figure VI : Mécanisme cellulaire de présentation du CMH de classe I responsable de la GVHD (Figure disponible sur le site : www.cnrs.fr)

2.1.4.1.2 La GVHD aiguë

Mécanismes moléculaires

Les cellules du donneur s'activent non seulement vis-à-vis d'allo antigènes du receveur, mais aussi de manière non spécifique. Cela aboutit à l'activation et à la prolifération de cellules de l'inflammation, à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion, de cytokines et de molécules de surface. La physiopathologie de la GVHD aiguë peut se décomposer en trois phases

La première phase débute avant la greffe, au moment du conditionnement. Celui-ci est responsable de lésions tissulaires de l'épithélium et de l'endothélium aboutissant à la sécrétion, par les cellules de l'hôte, de cytokines de l'inflammation (TNF α et IL1), de GM-CSF et de TGF α . Les cytokines de l'inflammation entraînent une surexpression des molécules d'adhésion et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) responsables de la reconnaissance des antigènes mineurs ou majeurs de l'hôte par les cellules immunitaires du greffon. Cela explique que la fréquence de la GVHD augmente avec la lourdeur du conditionnement et que le risque d'induire une GVHD est moins important lorsque les lymphocytes du donneur sont injectés à distance du conditionnement (après 30 à 45 jours).

Après la greffe, l'activation des lymphocytes T du donneur inclut la présentation de l'antigène, l'activation propre des lymphocytes, leur prolifération et leur différenciation en cellules activées. Les antigènes présentés par des molécules de classe I stimulent la différenciation des lymphocytes CD8, les antigènes présentés par des molécules de classe II stimulent la différenciation des lymphocytes CD4. Avec le premier contact antigène/récepteur du lymphocyte T, les molécules de stimulation et d'adhésion jouent un rôle important dans le phénomène d'activation lymphocytaire. Les cytokines produites en réponse à une stimulation par des alloantigènes sont principalement de type Th1 (IFN γ , IL2). Elles jouent un rôle central dans l'activation, la prolifération et l'induction de la cytotoxicité T, dans la réponse NK et dans l'activation des cellules phagocytaires de l'hôte et du donneur.

La troisième phase est la plus complexe et la moins bien connue. Les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK induisent l'apoptose des cellules cibles. Les cellules phagocytaires, stimulées par les cytokines de type Th1 ou par des lipopolysaccharides libérés par les muqueuses intestinales de l'hôte lésées par le conditionnement, sécrètent des cytokines de l'inflammation (IL1 et de TNF α). Le TNF α peut induire directement la nécrose des cellules cibles ou intervenir dans les phénomènes d'apoptose.. La mort des cellules cibles fait intervenir trois mécanismes principaux : la voie granzyme-perforine, la voie Fas-Fas ligand et la toxicité directe des cytokines. Cette lyse cellulaire peut se manifester sur le plan clinique par différents symptômes.

Manifestations cliniques et épidémiologie

La fréquence de la GVHD aiguë est maximale entre les 2^e et 4^e semaines après la greffe, mais elle peut se déclarer pendant les trois premiers mois après la greffe. En fonction du nombre et de la sévérité des localisations de la maladie, on classera la GVHD aiguë en quatre grades. Elle peut se manifester par des signes généraux (fièvre, cachexie), par une hépatosplénomégalie, par des diarrhées, un ictère, des signes cutanés ou encore par une anémie. Elle est en fait liée à la présence de cellules immunocompétentes issues du greffon et capables d'attaquer différents tissus du receveur

Avec les techniques classiques de prévention de la GVHD et selon les séries, 25 à 75 % des patients allogreffés à partir d'un donneur apparenté HLA identiques présentent une GVHD aiguë. Environ 1 malade atteint sur 3 meurt des conséquences directes ou indirectes de la GVHD. Le taux de mortalité des GVHD de grades III ou IV peut atteindre 90 % (**Référence 15**).

Certains facteurs favorisent la survenue d'une GVHD aigue:

- l'âge élevé du receveur,
- les donneurs féminins (surtout en cas de grossesses antérieures et si le receveur est un homme),
- les greffes réalisées alors que la maladie hématologique est évolutive,
- l'utilisation d'un conditionnement renforcé, l'infection après la greffe (les réactivations à CMV sont corrélées à une augmentation de l'incidence de la GVHD),
- la disparité HLA (cela explique la plus grande incidence de GVHD dans des greffes non apparentées) et
- le type de greffon : les greffes réalisées à partir de sang placentaire s'accompagnent moins fréquemment de GVHD que les greffes réalisées à partir de la moelle ou de CSHP. Cela peut être expliqué par l'immaturité du système immunitaire des greffons de sang placentaire.

2.1.4.1.3 La réaction chronique du greffon contre l'hôte (cGVHD)

Mécanismes moléculaires

La GVHD chronique est souvent considérée comme une maladie auto-immune. Dans des modèles animaux, il a été montré que, si les lymphocytes T impliqués dans la GVHD aiguë étaient spécifiques d'alloantigènes, ceux impliqués dans la GVHD chronique reconnaissent des antigènes publics du CMH de classe II. Ces lymphocytes T produisent des cytokines de type Th2 (IL4 et IL10). Ces cytokines peuvent stimuler la production de collagène par les

fibroblastes, qui apparaît en règle à partir du troisième mois mais parfois plus tôt. Les formes précoces, voire subaiguës intermédiaires, ne sont pas exceptionnelles.

Manifestations cliniques et épidémiologie

En raison de la multiplicité des organes cibles possibles, le tableau clinique est d'un grand polymorphisme. La symptomatologie est celle d'une maladie de type auto-immun : lésions cutanées, hépatite chronique, alopecie... Généralement, la GVHD chronique est précédée d'une GVHD aiguë mais peut apparaître de novo. Elle est attendue chez 25 % de receveurs de greffes allogéniques géno-identiques. Le tableau clinique de GVHD chronique est voisin de pathologies auto-immunes décrites en dehors de la greffe de moelle.

Sur le plan biologique, une hyperéosinophilie est fréquente. Plusieurs types d'anticorps anti-tissus ont été décrits : anticorps anti-noyaux, anti-muscles lisses, anti-mitochondries, anti-thyroïdiens et, plus rarement, anti-récepteurs de l'acétylcholine. Il existe une hypo- ou une hyperglobulinémie, avec fréquemment un profond et durable déficit en IgA associé à un déficit en IgG2 et IgG4, et parfois une dysglobulinémie. L'immunopathologie des lésions cutanées ou labiales révèle des dépôts d'IgM et de complément le long des membranes basales.

Trente-trois pour cent des patients greffés avec un donneur géno-identique et 49 % des patients greffés avec un donneur non apparenté et survivant plus de 150 jours après la greffe sont atteints de cGVHD ([Référence 15](#)). Les facteurs favorisants sont l'âge et la préexistence d'une GVHD aiguë.

2.1.4.2 La non-prise et le rejet de greffe (HVG)

Le rejet (HVG) est dû à la persistance, après le conditionnement, de lymphocytes T de l'hôte, capables de s'activer et de rejeter le greffon. La non-prise de greffe est l'absence d'implantation de l'hématopoïèse du donneur. Celle-ci peut être liée à un rejet aigu ou à une inhibition de l'hématopoïèse toxique ou virale. La non-prise de greffe et l'HVG sont des complications très rares (moins de 2 %) après greffe de moelle géno-identique utilisant un conditionnement myéloablatif et en l'absence de manipulation ex vivo du greffon.

Ces complications sont favorisées par la disparité HLA entre donneur et receveur, l'utilisation d'un conditionnement non myéloablatif ou d'un greffon pauvre en cellules CD34⁺ et la déplétion en cellules T du greffon.

Dans les situations à haut risque d'HVG, différentes techniques de prévention sont utilisées :

- modifications du conditionnement le rendant plus immunosuppresseur afin de détruire les lymphocytes T résiduels de l'hôte (utilisation de SAL ou d'anticorps monoclonaux anti-T) ;
- augmentation du nombre de cellules souches CD34⁺ contenues dans le greffon par l'utilisation d'un greffon de cellules souches périphériques plus riche en cellules CD34⁺ qu'un greffon médullaire.

Lors de la survenue d'HVG, quelques secondes greffes ont été réalisées avec succès. Il paraît alors préférable de choisir un greffon de CSHP, plus riche en CSH plutôt qu'un greffon médullaire.

2.1.4.3 L'effet GVL

L'effet GVL a été initialement suggéré dans des modèles murins, puis par différentes observations cliniques (**Référence 16**). La première observation a été faite dans les greffes syngéniques, pour lesquelles il était constaté un taux de rechute plus important que pour une greffe géno-identique. Plus tard, plusieurs équipes ont également constaté que la rechute était plus fréquente pour les greffes T déplétées. En revanche, chez les patients présentant une GVHD aiguë ou chronique, le risque de rechute était moindre.

Afin de traiter les hémopathies et de prévenir certaines réactions immunologiques (HVG entre autres), différents traitements conditionnants plus ou moins myéloablatifs doivent être mis en œuvre préalablement à la greffe.

2.1.5 Traitements conditionnants des transplantations de CSH allogéniques

2.1.5.1 Les conditionnements myéloablatifs

Le conditionnement myéloablatif obéit théoriquement à deux objectifs :

- l'immunosuppression de l'hôte nécessaire à la prise du greffon
- la destruction de cellules hématopoïétiques de l'hôte permettant d'assurer la vacuité médullaire hématologique avec destruction d'un éventuel clone malin.

La soumission à ces impératifs n'a pas la même importance selon les indications de la greffe et selon le degré de compatibilité HLA entre le donneur et le receveur. Dans le cas de greffes allogéniques, la prévention des réactions immunes délétères obligera le clinicien à utiliser des protocoles potentiellement plus toxiques que lors d'autres types de greffes.

2.1.5.1.1 Conditionnements par irradiation et ou chimiothérapie

Ce conditionnement peut associer une Irradiation Corporelle Totale (ICT) et une chimiothérapie ou peut être exclusivement chimiothérapique, associant par exemple CYCLOPHOSPHAMIDE et BUSULFAN.

Le choix des paramètres d'irradiation peut avoir des conséquences sur l'efficacité de l'ICT en ce qui concerne son pouvoir de réduction tumorale, son pouvoir immunosuppresseur et son action au niveau des cellules médullaires non tumorales.

Le conditionnement de référence a longtemps été constitué par l'association d'une ICT délivrée en dose unique à 10 Gray et de CYCLOPHOSPHAMIDE (60 mg/kg/j pendant 2 jours). De nombreuses modulations sont ensuite intervenues pour diminuer la toxicité (en

particulier pulmonaire et hépatique) de cette association radio-chimiothérapique et augmenter son activité anti-leucémique, ces deux impératifs étant souvent contradictoires.

2.1.6 Traitements immunosuppresseurs

La fréquence et la gravité des symptômes de la GVHD aiguë imposent un traitement préventif systématique. Habituellement, le traitement préventif consiste à utiliser un traitement immunosuppresseur après la greffe.

L'association de CICLOSPORINE A et de MÉTHOTREXATE est, depuis plus de 15 ans, considérée comme la prophylaxie de référence. Une corticothérapie peut y être associée ou remplacer le MÉTHOTREXATE. Plus récemment, l'intérêt du TACROLIMUS (FK 506) a été évalué en place de la CICLOSPORINE .

Par ailleurs, le sérum anti-lymphocytaire (ou SAL) utilisé au moment du conditionnement de greffe pour prévenir le rejet joue également un rôle dans la prévention de la GVHD en raison de sa durée de vie responsable d'une déplétion T *in vivo*. Il a été prouvé que l'élimination des lymphocytes T du greffon était un moyen très efficace de prévention de la GVHD aiguë et chronique.

De plus, un traitement immunosuppresseur curatif est indiqué pour les GVHD de grades supérieurs à I. Les corticoïdes sont initialement employés à la dose de 2 mg/kg/j de méthylprednisolone puis en cas de non-réponse à des doses massives et brèves pouvant atteindre 20 mg/kg/j. En cas d'échec de la corticothérapie, le SAL ou le sérum antithymocytaire (SAT) peuvent être efficaces à des doses cependant difficiles à définir.

Cependant, de par leurs effets anti-inflammatoires, les corticoïdes augmentent les risques infectieux et modifient la symptomatologie des infections, rendant leur diagnostic clinique plus difficile.

Ces traitements peuvent entraîner en plus des effets toxiques propres à chaque médicament, un déficit immunitaire iatrogène lorsqu'ils sont intensifs ou très prolongés et ainsi favoriser la survenue d'infections par des pathogènes opportunistes. D'une façon générale, l'utilisation de traitements conditionnants et immunosuppresseurs devra être évalué en fonction des délais de récupération hématologique et immunologique.

Après avoir vu les différentes sources de CSH, le principe des greffes de CSH et les mécanismes qui rentrent en jeu lors de la réaction immunitaire du greffon contre l'hôte, il est important de cerner les principales indications des allogreffes

2.1.7 Hémopathies malignes et greffes de moelle

2.1.7.1 Critères de classification des différentes hémopathies malignes

Les hémopathies malignes peuvent être classées en hémopathies chroniques et hémopathies aiguës :

- les hémopathies aiguës sont caractérisées par une évolution rapide de la maladie. L'apparition de cellules issues d'un clone immature (ou blastique) et

leur prolifération empêche les autres cellules du sang d'assurer normalement leur fonction.

- Dans le cas des hémopathies chroniques, les blastes se forment plus lentement et donc occasionnent moins de symptômes.

On réalisera également une distinction en fonction de la lignées hématopoïétiques impliquées:

- Prolifération d'un clone de la lignée lymphoïde (B ou T)
- Prolifération d'un clone de la lignée myéloïde.

Seront aussi distingués :

- les syndromes myéloprolifératifs caractérisés par des anomalies quantitatives et
- les syndromes myélodysplasiques définis par des anomalies qualitatives.

Enfin une classification sera établie selon le site où se développe la maladie :

- Les leucémie où le foyer de prolifération du clone est la moelle osseuse
- Le lymphome où le foyer est un ganglions lymphatiques; envahissement secondaire: moelle et sang.

La cytologie et l'anatomo-pathologie, la cytogénétique et l'immunologie, permettent de classifier ces différentes entités.

2.1.7.2 Les leucémies myéloïdes chroniques

La Leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif caractérisé par une anomalies quantitatives des lignées myéloïdes. Il s'agit d'un processus monoclonal malin impliquant une cellule hématopoïétique pluripotente. Son incidence est de 1/100000 et elle touche essentiellement les patients d'âge moyen (entre 25 et 45 ans).

Les signes cliniques et biologiques associés sont :

splénomégalie, hyperleucocytose forte, basophilie, cellules immatures circulantes (myélémie), phosphatase alcaline leucocytaire effondrée, myélogramme riche en particulier de cellules de la lignée granuleuse.

2.1.7.3 Les leucémies aiguës myéloblastiques ou LAM

Il s'agit d'une prolifération massive de précurseurs myéloïdes, avec aspect de hiatus dans la pyramide de maturation et passage dans le sang périphérique de cellules immatures. On distingue 7 LAM différentes en fonction de la lignée myéloïde atteinte :

- LAM1 : myéloblastique sans maturation
- LAM2 : myéloblastique avec maturation
- LAM3 : promyélocytaire
- LAM4 : myélomonocytaire
- LAM5 : monocytaire
- LAM6 : érythroleucémie

- LAM7 : mégacaryocytaire

Les symptômes sont d'en l'ensemble peu caractéristiques, mis à part les signes cliniques de l'insuffisance médullaire.

2.1.7.4 Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

Les LAL sont dues à la prolifération massive de précurseurs lymphoïdes, B ou T. D'une symptomatologie proche des LAM, l'incidence de ces deux types de leucémie aiguë est de 4/100000.

L'immunophénotypage du clone (Identification de clusters de différenciation et/ou d'immunoglobulines) permet de reconnaître la lignée impliquée et le degré de maturation de la cellule maligne. De plus, la cytologie permet de différencier LAL1 et 2 d'une part, et LAL3 à grandes cellules de type Burkitt d'autre part. En fait, une classification MIC (morphologie - immunologie - cytogénétique) permet de définir des entités auxquelles sont liées des pronostics différents. D'une façon générale, les LAL touchent en majorité l'enfant.

2.1.7.5 Les autres hémopathies malignes

·On peut les classer en de nombreuses catégories selon l'aspect cytologique des cellules isolées.

2.1.7.5.1 La leucémie lymphoïde chronique (LLC)

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est considérée par les hématologues comme une leucémie et par les anatomo-pathologistes comme un lymphome de bas grade. La LLC est un processus d'évolution souvent lente (10-15 ans) mais peut parfois être beaucoup plus rapidement évolutif.

La LLC est caractérisée par une accumulation de lymphocytes immuno-incompétents dans le sang, la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques. Il s'agit dans 95% des cas d'une prolifération de lymphocytes B. D'une incidence de 2 à 3/100000 habitants par an, elle touche plus souvent les hommes et de préférence à un âge avancé (> 80 ans)

Dans les leucémies lymphoïdes chroniques, l'allogreffe de CSH reste encore expérimentale et doit faire l'objet de protocoles d'évaluation. Néanmoins, il s'agit également pour cette maladie de la seule stratégie qui permet la guérison au prix effectivement d'une mortalité encore trop importante.

2.1.7.5.2 Les lymphomes non hodgkiniens (LNH)

Il s'agit ici de néoplasies lymphatiques malignes caractérisé sur le plan clinique par la présence de gros ganglions lymphatiques.

2.1.7.5.3 Les plasmocytomes

Les plasmocytomes ou myélome multiple des os sont des lymphomes non hodgkiniens de bas grade de malignité. Ils sont caractérisés par la prolifération monoclonale d'un clone plasmocytaire (cellule se différenciant en lymphocyte B) responsable de la production d'une protéine monoclonale de type immunoglobuline.

De cause inconnue, leur incidence est de 3/100000 habitants et touche principalement les personnes âgées. Il persiste dans cette pathologie une très grande toxicité de l'allogreffe, malgré la possibilité de guérison grâce à l'allogreffe, et des programmes thérapeutiques associant une autogreffe suivie d'une allogreffe après conditionnement non myéloablatif sont intéressants et prometteurs.

2.1.7.5.4 Les myélodysplasies

Les syndromes myélodysplasiques (ou SMD) sont des affections des CSH impliquant un trouble de la différenciation et de la différenciation des trois lignées hématopoïétiques. Bien que la moelle soit normo ou hyper cellulaire, il résulte une anémie, une leucopénie et une thrombopénie.

Les autres indications potentielles d'allogreffe de CSH en hématologie sont rares et doivent obligatoirement appartenir à des protocoles prospectifs d'évaluation.

2.1.7.6 Autres indications de la greffe de moelle

Il est possible d'envisager la greffe de moelle pour d'autres indications que les hémopathies malignes, principalement au cours d'anomalies sanguines graves ou bien à la suite d'une iatrogénie induite par les chimiothérapies cytostatiques.

Sans rentrer dans les détails, la greffe est envisageable dans pour les anémies aplasiques graves, les thalassémies majeures, les déficits immunitaires congénitaux graves, les maladies de stockage (type mucopolysaccharidose ou maladie de Gaucher) et dans les tumeurs solides non hématologiques (cancer du sein, carcinome bronchique à petite cellule, mélanome malin...)

Pour cerner les risques infectieux liés à la greffe de moelle, il faut avant tout comprendre les mécanismes immunitaires rentrant en jeu chez la personne saine et comprendre comment se restaure la fonction immune chez une personne greffée de moelle.

2.2 Immunité antivirale

Afin de mieux comprendre l'impact d'une infection adénovirale chez un patient greffé de moelle, il est nécessaire de se pencher sur les mécanismes immunitaires mis en œuvre par les patients immunocompétents et par les patients greffés de moelle à la suite à une infection virale.

2.2.1 Immunité antivirale chez les patients immunocompétents

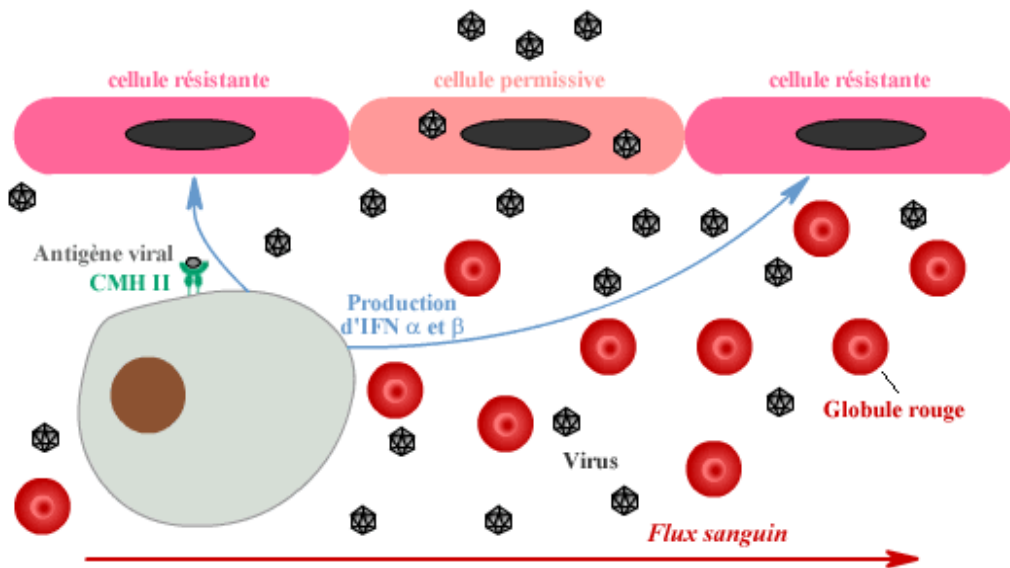
L'immunité antivirale met en jeu trois types de réponse immune : l'immunité non spécifique ou naturelle, l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. Cette réponse permet, sinon l'éradication du virus, du moins la régulation de l'infection virale.

2.2.1.1 Immunité naturelle

Dans le cadre de l'immunité non antigène spécifique ou naturelle, les cellules dites « éboueuses » de l'immunité (monocytes et macrophages ou Mo-Ma) sont les premières au contact des virus. En internalisant par phagocytose les éléments étrangers comme les virus, ces cellules participent à la dégradation des AdV. Ces cellules assurent dans un second temps la présentation des antigènes de la capsid à leur surface.. De ce fait elles permettent l'initiation d'une réponse immune spécifique.,

Les adénovirus peuvent malgré la phagocytose éviter leur destruction. Il existe alors une autre forme d'immunité liée à la notion de résistance et de permissivité à l'infection. De par son mode de transmission, l'infection adénovirale touche fréquemment dans un premier temps les muqueuses (nasales, oculaires, pulmonaires...) où les Mo-Ma sont très présents. Ces cellules pourront alors être permissives ou résistantes à la réplication virale en fonction du contexte cytokinique dans lequel elles se trouvent.

Les cytokines (interférons de type I : α et β) sont alors les premières à limiter l'infection virale (**Figure VII**). Ces cytokines sont générées par des cellules "nulles" (non T, non B, non adhérentes, et sans marqueur spécifique connu, mais porteurs d'antigènes HLA, de classe II).



FigureVII -Mise en jeu de l'immunité non spécifique (D'après Louis VIRELIZIER, Unité d'Immunologie Virale, Institut Pasteur, Paris.)

La production de cytokines (interféron α et β) par des cellules « nulles » suite à la reconnaissance d'un antigène viral permet d'induire une résistance à l'infection virale.

En complément de l'immunité innée, d'autres mécanismes de défense immunitaire peuvent être mis en jeu.

2.2.1.2 Immunité humorale

Lors de l'immunité humorale, la présence d'anticorps spécifiques d'un sérotype adénoviral permet une protection en empêchant dans la circulation sanguine le virus d'arriver jusqu'à sa cible. Cependant, les anticorps apparaissant de façon tardive après l'infection, ils n'ont donc pas la possibilité d'agir dans les premiers temps de l'infection. Ils ont cependant leur rôle à jouer si l'infection se poursuit sur une longue période ou bien lors d'une réinfection par le même sérotype.

Pour produire des anticorps neutralisants, il faut que des lymphocytes B reconnaissent un antigène viral. Via un lymphocyte T auxiliaire, ces cellules B évoluent en plasmocytes qui génèrent alors des anticorps capables de différentes fonctions : agglutination, neutralisation mais aussi cytotoxicité envers les cellules infectées. Cette cytotoxicité vient se surajouter à celle induite par l'immunité cellulaire.

2.2.1.3 Immunité cellulaire

En ce qui concerne l'immunité cellulaire, ce sont les cellules lymphocytaires T (L_T) qui agissent de façon directe et indirecte sur l'infection. De façon directe par la destruction des cellules infectées (cytotoxicité) et de façon indirecte par l'augmentation de la présentation

antigénique (surexpression du complexe majeur d'histocompatibilité : CMH de classe II) et l'expression de cytokines de type II (Interféron γ).

Cependant, l'activité antivirale des lymphocytes n'est maximale que quand les L_T sont activés. Le délai d'activation laisse alors le plus souvent le temps au virus de se répliquer en très grand nombre. De ce fait, même si l'infection virale se retrouve finalement stoppée, de nombreuses particules virales auront finalement pu disséminer dans l'environnement et ainsi étendre le risque infectieux à d'autres individus pour poursuivre un nouveau cycle infectieux.

En plus d'une immunité dirigée contre l'ensemble des virus, certains auteurs ont pu montrer qu'il existait des réponses ciblées sur l'infection adénovirale

2.2.1.4 Réponses immune dirigée contre l'adénovirus.

En ce qui concerne les adénovirus, il a été montré par des tests de lymphoprolifération ([Référence 20](#)) qu'il existait des cellules T spécifiques capables de proliférer au contact de l'adénovirus de type 2 chez le patient sain. Selon Smith et al ([Référence 18](#)), il s'agirait à la fois de lymphocytes CD4 et CD8+ capables de répondre aux antigènes de capsid.

De plus, l'apparition d'anticorps spécifiques d'un sérotype adénoviral protège des réinfections pour ce sérotype (voir partie I sur les Adénovirus).

Normalement rapidement maîtrisée par le système immunitaire, l'infection adénovirale est le plus souvent bénigne. Cependant, lors d'une déficience du système immunitaire, le virus peut se répandre dans tout l'organisme du patient infecté. Chez ces personnes immunodéprimées, la maladie adénovirale débouche alors le plus souvent sur des complications mortelles.

2.2.2 Immunité chez le patient greffé de moelle

Il apparaît que les patients greffés de moelle osseuse sont particulièrement à risque pour les infections opportunistes. Cela est dû aux modifications de leur système immunitaire.

2.2.2.1 Statut immunologique du patient greffé de moelle

Après la greffe de CSH, l'ensemble des fonctions immunitaires est altérée. Le risque infectieux sera alors associé à la période de récupération des fonctions hématopoïétiques et immunologiques. La récupération dépendra à la fois du statut immunitaire du donneur et des qualités propres au greffon, mais aussi des différentes expositions du receveur aux antigènes adénoviraux.

Une période à haut risque pour les infections existe juste après la greffe, liée à un état de granulocytopénie (moins de 500 granulocytes par microlitres de sang). En effet, les cellules du donneur ne prolifèrent pas encore alors que les cellules endogènes du receveur sont détruites ou en déclin. Lors d'une greffe de moelle, les granulocytes réapparaissent entre 12 jours et jusqu'à parfois plus de 3 semaines après la greffe. La greffe d'une moelle déplétée en cellules T ou de cellules issues de sang de cordon peut également accroître ce délai. L'utilisation de G-CSF ou de GM-CSF pourra alors raccourcir le délai de récupération et ainsi diminuer le risque d'infection associé.

En ce qui concerne les lymphocytes B et la production d'anticorps, la sécrétion d'IgG peut prendre 3 mois à 2 ans pour retourner à la normale en fonction de l'origine des CSH. La récupération des CD4 et CD8 peut elle prendre de 1 à 3 mois, avec une réponse proliférative pour des antigènes courants se normalisant entre 1 et 5 ans.

Il apparaît donc que le risque infectieux chez les patients greffés de moelle est lié au niveau de récupération des fonctions immunitaires, cette récupération étant en fait conditionnée par différents facteurs.

2.2.2.2 Risques infectieux liés à la greffe de moelle

D'une façon générale, les complications infectieuses de la greffe de moelle allogénique sont liées à plusieurs facteurs:

- La maladie préexistante,
- L'interaction entre les cellules du donneur et celles du receveur et son traitement,
- Le traitement conditionnant

On distinguera dans un premier temps les risques infectieux précoces. Cette étape est liée au fait que tous les patients greffés passent par une étapes de pancytopenie (c'est à dire atteinte de l'ensemble des lignées sanguines) plus ou moins transitoire pouvant durer parfois plus d'un mois (d'après Transplant infections second edition , [Référence 19](#)).

Dans un second temps, la prophylaxie de la GVHD par l'administration d'agents immunosuppresseurs peut aboutir au développement d'autres pathologies infectieuses.

2.2.2.2.1 Les complications infectieuses précoces

Pendant les premières semaines post-greffe, c'est-à-dire pendant la période d'aplasie, le risque est celui d'infections bactériennes et fongiques. Durant cette période, la neutropénie, l'altération de la barrière digestive secondaire au traitement de chimio- et de radiothérapie et l'utilisation de cathéters centraux sont autant de facteurs contribuant au risque infectieux.

En aplasie, la symptomatologie d'une infection est souvent pauvre, du fait de l'absence de signes inflammatoires, la fièvre étant souvent le seul stigmate d'infection. Les infections survenant précocement après le début de l'aplasie sont principalement des infections bactériennes alors que les infections fongiques sont plus tardives.

2.2.2.2.2 Les complications infectieuses tardives

Le déficit de l'immunité spécifique se traduit par une fréquence élevée des infections virales des virus du groupe Herpès.

Les infections à cytomégalo virus (CMV) surviennent chez 60 % des patients séropositifs avant la greffe et chez 30 % des patients séronégatifs greffés à partir d'un donneur séropositif.

Quant aux autres infections tardives non virales, elles sont essentiellement dues au Pneumocoque, Pneumocystis carinii et à Toxoplasma gondii.

Des néoplasies secondaires ont également été décrits après allogreffe de CSH. Il s'agit des lymphoproliférations en rapport avec le virus d'Epstein Barr (EBV) et des tumeurs solides. Cependant, la majorité des syndromes lymphoprolifératifs après la greffe sont associés à l'EBV.

Enfin, des pneumopathies interstitielles non bactériennes et non fongiques constituent une complication fréquente et sévère des allogreffes de CSH. Cependant, le lavage broncho alvéolaire permet d'identifier l'agent infectieux responsable (virus du groupe herpès, adénovirus, virus respiratoire syncytial ou *Pneumocystis carinii*).

Lorsque aucun agent pathogène n'est retrouvé, on parle de pneumopathie interstitielle idiopathique dont la pathogénie reste discutée. Les pneumopathies interstitielles idiopathiques compliquent 7 à 18 % des allogreffes avec une médiane de survenue dans les deuxième et troisième semaines. Leur taux de mortalité excède 60 %.

En fait, les infections adénovirales et en particulier chez le patient greffé de moelle sont fréquemment mortelles

2.3 Infections adénovirales chez les patients allogreffés de moelle

Selon certains auteurs, la fréquence de l'infection adénovirale pourrait atteindre jusqu'à 57% des patients greffés dans certaines études prospectives ([Référence 29](#), voir [Tableau V](#)). Cependant, le faible nombre de patients inclus dans ces études rendent une évaluation épidémiologique difficile. De plus, l'inclusion dans ces études de patients associés à divers facteurs de risque rend les résultats entre études très disparates.

2.3.1 Epidémiologie de l'infection adénovirale chez le patient greffé de moelle

En plus de quantifier la prévalence des infections adénovirales chez les patients greffés de moelle, certaines études épidémiologiques recherchent le sérotype ou le groupe adénoviral incriminé.

Cette recherche est un élément clé dans l'analyse du mode de transmission du virus. Elle permet en particulier de suspecter des transmissions de malade à malade et donc de prendre les précautions nécessaires en cas d'apparition d'un cas infectieux. Voici un tableau qui récapitule les différentes études recherchant une infection par AdV chez le patient greffé de moelle.

Tableau IV: Etudes rétrospectives de l'infection adénovirale chez des patients greffés de moelle (d'après Chakrabarti et al.; Référence I)

Etude	Nombre total de patients	% d'infection adénovirale	Dont % de maladie adénovirale	Dont % de mortalité adénovirale associée	Sérotypes et groupe isolés
Shields et al. Référence 21	1051	4,9%	20%	12%	11/34/35 (B) 1/2/5 (C)
Flomenberg et al. Référence 17	201	20,9%	31%	16.6%	11/34/35(B) 1(C)
Blanke et al. Référence 23	74	13,5%	50%	50%	11 (B) 1(C)
Howard et al. Référence 24	532	12%	64%	26.8%	Non déterminé
Baldwin et al. Référence 22	572	17%	Non déterminé	6%	7/14 1/2/5 (C)
La rosa et al. Référence 25	2889	3%	89%	26%	Non déterminé
Bruno et al. Référence 26	5233	8,5%	9,3%	Non déterminé	Non déterminé

Tableau V: Etudes prospectives sur la survenue d'infections adénovirales (d'après Chakrabarti et al.; Référence I)

Etude	Nombre total de patients	% d'infection adénovirale	Dont % de maladie adénovirale	Et % de mortalité adénovirale associée	Sérotypes et/ou groupes isolés
Chakrabarti et al. Référence 27	76	19,7%	40%	30%	2(C)
Lion et al. Référence 28	132	27%	41 ,6%	22%	C/B
Lankester et al. Référence 29	141	57%	26,8%	5%	Non déterminé

Ces différentes études, qu'elles soient prospectives ou rétrospectives montrent avant tout de grandes variations entre pourcentage d'infection (de 3 à 57%), pourcentage de maladie

adénovirale associée à l'infection adénovirale (9.3 à 89%) et pourcentage de mortalité lié à l'infection adénovirale (5 à 50%).

Ces variations entre études s'expliquent par plusieurs éléments :

- Le type d'étude (prospectif versus rétrospectif) et le nombre de patients inclus dans ces études
- Le type adénoviral isolé, son tropisme tissulaire et son potentiel de dissémination (évoqués dans la première partie)
- Enfin, le type de patients inclus dans ces études et les différents facteurs de risque qui leur sont associés.

2.3.2 Les différents facteurs de risque d'infection adénovirale chez les patients greffés de moelle

Tout d'abord, la greffe allogénique (entre individus issus de même espèce) présente plus de risques infectieux associés par rapport à une greffe autologue (du même individu). Cela peut s'expliquer par le fait que plus il existe de variations d'histocompatibilité entre le donneur et le receveur, plus le risque de GVHD et de HVG est fort et ainsi plus le traitement immunosuppresseur associé doit être fort.

Il est aussi possible d'envisager que la GVHD par elle-même, en induisant une réaction inflammatoire au niveau vasculaire favorise le passage d'AdV dans la circulation. Il est alors normal que l'incidence des infections adénovirale soit corrélé de façon inverse au degré d'homologie du système HLA entre donneur et receveur.

*Tableau VI- Pourcentage d'isolation d'adénovirus en fonction du type de greffe de moelle.
(Chakrabarti et al. **Référence 1**)*

Type de greffe	Pourcentage d'isolation adénovirale
Autologue	2 à 12 %
Appariée dans la fratrie	12 à 19 %
Mésappariée	16 à 30 %

Le jeune âge du patient greffé a été montré dans plusieurs études comme un facteur majorant par plus de fois les risques infectieux liés à l'adénovirus. Cette différence peut être expliquée par l'absence de « mémoire immunitaire » chez les jeunes greffés. En effet, chez les malades plus âgés, des lymphocytes B mémoires et des anticorps anti-adénovirus peuvent persister après l'irradiation de la moelle. Une autre explication possible peut résider dans le fait que les jeunes receveurs obtiennent des greffes de donneurs également jeunes qui ont été de ce fait peu exposés aux AdV.

Il est de plus intéressant de noter que dans l'étude menée à Milwaukee que le délai d'apparition de la maladie adénovirale n'était pas le même chez l'enfant et l'adulte. Une plus grande précocité (dans les 30 premiers jours de la greffe) observée chez l'enfant allant en faveur d'une primo infection .

On peut alors résumer les facteurs de risque de la maladie et de l'infection adénovirale :

- Degré de mésappariement entre système HLA du donneur et du receveur,
- Traitement immunosuppresseur associé à la greffe
- Age du patient et exposition précédente aux différentes souches adénovirales

Ainsi, du point de vue clinique, face au risque infectieux adénoviral, il existe une marge d'action étroite entre GVHD et traitement de celle-ci par l'immunosuppression. Pour augmenter la marge de manœuvre du clinicien, différentes stratégies de prise en charge des complications infectieuses adénovirales de la greffe de moelle sont en développement.

2.4 Prise en charge des complications infectieuses chez le patient greffé de moelle

Nous avons vu que l'infection adénovirale était une cause croissante de mortalité chez le patient greffés de moelle. L'évolution des techniques de diagnostic a permis à plusieurs essais cliniques d'établir des stratégies de prise en charge thérapeutique. Malgré une difficile superposition des conclusions de ces études, de nouvelles pratiques thérapeutiques semblent émerger.

2.4.1 Trois stratégies de traitement

Parmi les patients inclus dans ces études, nous avons vu que tous n'étaient pas atteints au même degré par l'infection adénovirale. Il sera alors important de discerner les patients atteints de la maladie adénovirale, les patients infectés par le virus et les patients à risque pour l'AdV. On distinguera alors pour ces trois types de patients trois conduites thérapeutiques distinctes.

2.4.1.1 Mesures préventives

Tout d'abord, pendant la période de granulopénie qui suit la greffe, des mesures préventives comme la décontamination gastro-intestinale ou le placement en chambre stérile peuvent diminuer la fréquence des infections et réduire la durée des épisodes fébriles.

L'injection de facteurs de croissance comme le G-CSF ou le GM-CSF (granulocytes and macrophage stimulating factor) permettent de diminuer la susceptibilité aux infections en accélérant la régénération de la lignée granuleuse.

L'utilisation de traitements antibiotiques, antifongiques ou antiviraux à titre préventif peut aussi être envisagée tout en prenant en compte les risques d'effets secondaires induits par ces thérapies (par exemple la toxicité médullaire potentielle du GANCICLOVIR.)

Voici un guide de prophylaxie chez les patients greffés de moelle édité par la blood and marrow transplantation american society ([Référence 19](#)).

Tableau VII: différentes stratégies de traitement préventif des infections opportunistes chez le patient greffé de moelle (D'après la société américaine blood and marrow transplantation)

Organisme	Prophylaxie de première intention	Prophylaxie de seconde intention
HSV	ACICLOVIR (Du régime conditionnant à la greffe)	VALACICLOVIR, FAMCICLOVIR
Candida sp.	FLUCONAZOLE (Du régime conditionnant à la greffe)	Autres azolés par voie orale
CMV	GANCICLOVIR (Du régime conditionnant à 100 jours post greffe)	FOSCARNET, VALACICLOVIR, FAMCICLOVIR
Pneumocystose	TRIMETHOPRIM-SULFOMETHOXAZOLE (jusqu'à 3 à 6 mois après la greffe)	DAPSONE, ATOVAQUONE, PENTAMIDINE

L'utilisation d'un traitement préventif pour différentes pathologies opportunistes est selon certains auteurs une des causes de l'émergence des infections adénovirales. En effet, la meilleure prise en charge de certaines infections opportunistes (bactériennes et fongiques en particulier) libère une niche pour d'autres pathogènes comme l'AdV.

Toutefois, il a été constaté que le traitement antiviral préventif par GANCICLOVIR du CMV pouvait diminuer le risque d'infections adénovirales ([Référence 32](#)).

Face aux risques associés aux différents traitements anti-infectieux, l'indication principale de ces traitements reste la maladie adénovirale, quelle soit certaine ou probable. On parlera alors de traitement curatif.

2.4.1.2 Traitements curatifs

Plusieurs essais cliniques ont évalué ou évaluent l'efficacité de traitements adénoviraux sur des patients greffés de moelle. Le traitement curatif concerne les patients dont la maladie adénovirale est certaine ou probable. Ces essais incluent l'utilisation de RIBAVIRINE, de CIDOFOVIR et ou l'infusion de lymphocytes du donneur (ou DLI, que nous évoquerons en perspective) sont pour l'instant les principales molécules ou stratégies antivirales utilisées.

Grâce à l'avancée des techniques de dépistage, la mise en œuvre du traitement peut être envisagée de façon plus précoce. Ainsi, les essais cliniques incluent des patients porteurs de la maladie adénovirale, mais aussi des patients pour lesquels une infection adénovirale sans symptômes a pu être mise en évidence. Avant de voir, les possibilités thérapeutiques, il est nécessaire de comprendre pourquoi traiter ce dernier type de patients, avec une stratégie dite préemptive.

2.4.1.3 Traitements préemptifs

2.4.1.3.1 Rationnel du traitement préemptif

Un traitement préemptif est un traitement anticipé quand un microorganisme potentiellement pathogène est détecté chez un malade sans pour autant déclencher de signes cliniques spécifiques. La question d'un traitement préemptif se pose chez les malades sous surveillance biologique systématique, en particulier chez les patients greffés de moelle.

Dans le cas des infections virales par CMV, la détection des réactivations par antigénémie ou PCR permet un diagnostic précoce et le traitement préemptif de ces réactivations (par GANCICLOVIR ou FOSCARNET) s'accompagne d'une diminution importante de la morbidité et de la mortalité ([Référence 12](#))

Cependant, au même titre que le traitement préventif, le choix d'instaurer un traitement préemptif doit être pesé en fonction du bénéfice risque lié à l'utilisation de molécules potentiellement toxiques. Il est également nécessaire d'évaluer le risque de résistances induites par des traitements préventifs ou préemptifs et ce d'autant plus pour des microorganismes à multiplication rapide comme les virus.

Afin de réaliser un traitement préemptif efficace, il est nécessaire de détecter le plus tôt possible la présence d'AdV dans le sang d'un patient. Pour cela, il est important d'avoir une technique diagnostic la plus sensible possible.

De plus, toutes les infections par adénovirus n'étant pas systématiquement symptomatiques, et toutes n'évoluant pas en maladie adénovirale, il est nécessaire de cibler les individus présentant des facteurs de risque.

Nous verrons par la suite que la disparité des populations incluses dans les différents essais clinique évaluant l'efficacité de traitements préemptifs rendent difficilement interprétables l'efficacité de cette stratégie de traitement

2.4.1.3.2 Modalités de mise en œuvre de traitements préemptifs

Une des conditions nécessaires à la mise en œuvre du traitement préemptif est la détection de l'infection adénovirale. Pour cela, des techniques rapides de détection doivent être mises en œuvre. Cependant, ces techniques restent coûteuses en temps et en argent. Il est donc nécessaire de fixer une fréquence de suivi chez les patients à risque, et plus particulièrement les patients greffés de moelle. Même s'il n'existe pas de consensus, certains auteurs évoquent une recherche hebdomadaire ou bimensuelle ([Référence 1](#)).

Pour les mêmes impératifs, la période durant laquelle s'effectuera cette recherche devra être fixée. Il semble alors raisonnable de réaliser cette recherche sur la période de susceptibilité maximale aux infections opportunistes ; c'est-à-dire jusqu'à environ trois mois après la greffe. Cependant, nous verrons deux cas cliniques où les patients développent une maladie adénovirale à plus de trois mois post-greffe.

Une autre question important réside dans le choix des fluides biologiques qui seront testés pour la présence du virus. Certains échantillons comme la salive, les urines ou les fèces sont les fluides naturels dans lesquels le virus est excrété. Ils sont donc à même de montrer une infection sur un site naturel de tropisme adénoviral. L'analyse de ces fluides biologiques pourra alors permettre d'identifier plus rapidement une infection adénovirale. D'une façon

générale, le choix d'un échantillon biologique doit être corrélé avec les signes cliniques évoquant un état infectieux.

Pour certains individus avec des facteurs de risque associés, ou quand un des fluides précédemment cité est positif, il sera possible de réaliser une surveillance renforcée en recherchant la présence de virus dans le sang. La fréquence de cette recherche sera alors variable entre une et deux semaines. On pourra alors envisager de mettre en œuvre une thérapie préemptive dès la première détection d'ADV dans le sang du patient.

Que ce soit pour des patients greffés de moelle atteints de maladie adénovirale ou juste infectés par l'AdV, plusieurs thérapeutiques ont été évaluées au cours d'essais cliniques.

2.4.2 Les thérapeutiques anti adénovirales.

Parmi les outils thérapeutiques disponibles en clinique, les analogues nucléotidiques (RIBAVIRINE et CIDOFOVIR) sont les plus anciennement utilisés. Plusieurs essais cliniques ont utilisés ces molécules et permettent d'évaluer leur efficacité

2.4.2.1 LA RIBAVIRINE

Différentes molécules ont été étudiées chez des patients greffés de moelle présentant une infection adénovirale. Parmi celles-ci se distingue la RIBAVIRINE ([Référence 31](#)). Molécule antivirale à large spectre (elle est active sur les virus à ARN et à ADN), la RIBAVIRINE est utilisée dans différentes infections virales (RSV, Influenzae A et B, Parainfluenzae, Virus Syncytial Respiratoire, Virus de la fièvre de Lassa; Hépatite C..).

La RIBAVIRINE est un analogue de la guanosine qui est une base nucléotidique composant normalement la molécule d'ADN. En tant que nucléotide monophosphaté, la RIBAVIRINE est active pharmacologiquement lors de l'étape de réplication de l'ADN cellulaire et viral. Elle cible la progression virale en bloquant plus sélectivement la DNA polymérase virale.

Différentes études ont utilisé la RIBAVIRINE en intra veineuse seule ou en association. Du point de vue de la tolérance, il a été montré qu'elle pouvait provoquer une anémie réversible à l'arrêt du traitement. Des cas de bronchospasmes et de conjonctivites ont également été décrits.

Voici pour avoir un aperçu de l'efficacité de la RIBAVIRINE un tableau récapitulant les principaux essais cliniques utilisant la RIBAVIRINE chez les patients greffés de moelle.

Tableau VIII: Essais cliniques utilisant la RIBAVIRINE chez les patients greffés de moelle

Etudes	Nombre d'individus traités	Devenir	Remarques
La Rosa et al. Référence 26	12	Amélioration des symptômes pour 2 patients	Pas de différences de survie avec le groupe non traité
Howard et al. Référence 24	13	Amélioration des symptômes pour 4 patients	Utilisation associée d'immunoglobulines pour trois patients
Hale et al. Référence 33	4	Mort des 4 Patients	
Bordigoni et al. Référence 32	13	Survie de 3 patients	
Miyamura et al. Référence 34	9	8 patients répondeurs	5 malades ont présenté des rechutes et 4 sont décédés
Samarasinghe et al. Référence 35	25	Survie de 23 patients	Tous les malades présentaient une maladie adénovirale définie par détection PCR du virus dans le sang ou dans plus d'un site

En fait, après revue de la littérature, l'utilisation de la RIBAVIRINE seule au cours de maladies adénovirales n'apparaît pas comme étant significativement efficace, et ce d'autant plus qu'il existe des cas de résolution spontanée de l'infection adénovirale (Référence 34). Cependant, son association à d'autres stratégies de traitement (en particulier la thérapie cellulaire) apparaît comme étant une stratégie thérapeutique prometteuse.

D'autre part, de nouveaux analogue nucléosidiques comme le CIDOFOVIR sont en cours d'évaluation dans le traitement des infections adénovirales.

2.4.2.2 Le CIDOFOVIR

Le CIDOFOVIR est un analogue de la cytosine. Après pénétration dans la cellule, le CIDOFOVIR est phosphorylé en métabolite capable d'inhiber la réplication virale en bloquant la synthèse de l'ADN (Référence 31). Il agit comme la RIBAVIRINE en inhibant de manière compétitive et sélective l'ADN polymérase virale.

Après avoir démontré une activité *in vivo* et *in vitro* sur différents virus herpétiques, ainsi que sur certaines souches de CMV résistantes au GANCICLOVIR et au FOSCARNET, le CIDOFOVIR a été remarqué pour ses propriétés antiadénovirales *in vitro*. Plusieurs essais cliniques de phase I et II ont ensuite été initiés. Même si la taille réduite des groupes de malades inclus dans ces études ne permet pas toujours de conclure de façon statistique à un bénéfice, les premiers résultats sont très encourageants.

Dans l'étude menée par Legrand et al. à l'hôpital de Caen en 2001 ([Référence 21](#)), 7 enfants d'une moyenne d'âge de 7 ans ont subi une greffe de moelle liée à des leucémies (6 LAL et 1 LAM). Toutes les greffes étaient sans lien de parenté. Le traitement par CIDOFOVIR (5mg/kg une fois par semaine) a été initié dès que l'infection adénovirale a pu être mise en évidence sur différentes biopsies. Cinq malades ont vu une amélioration des symptômes liés à l'infection (diarrhée, fièvre ou cystite), un est décédé des suites d'une infection par aspergillus et un est décédé des suites de la dissémination adénovirale après l'arrêt du CIDOFOVIR.

D'autres études ont également utilisé avec succès sur de petits nombres de patients greffés de moelle le CIDOFOVIR (Voir [Tableau IX](#)). La posologie de ce traitement reste cependant à définir et ce de par la présence d'effets secondaires potentiellement toxiques.

Il apparaît en fait qu'une des limites de l'utilisation du CIDOFOVIR est sa potentielle toxicité rénale, et ce d'autant plus qu'il peut se retrouver associé avec des traitements immunosuppresseurs eux aussi associés à un risque de néphrotoxicité (de type CYCLOSPORINE A ou AMPHOTÉRICINE B), même si cette toxicité peut être réduite en majorant l'hydratation ([Référence 35](#)). Cependant, d'autres effets indésirables ont été évoqués parmi lesquels : Protéinurie, syndrome de Fanconi, uvéite, neutropénie, nausée, vomissement, fièvre et prurit voir un effet potentiellement cancérigène ;

Voici un tableau qui reprend la plupart des essais cliniques curatifs concernant des patients greffés de moelle infectés par l'adénovirus et traités par Cidofovir.

Tableau IX: Essais cliniques utilisant le CIDOFOVIR chez les patients greffés de moelle

Etudes	Nombre d'individus traités	Devenir	Remarques
Ljungmann et al. Référence 36	16*	13 survivent	* :Maladie adénovirale certaine
	13*	10 survivent	* :Maladie adénovirale probable
	16*	14 survivent	* :Traitement préemptif
Legrand et al. Référence 37	7	5 survivent	Maladie adénovirale probable
Bordigoni et al. Référence 32	3	2 Survivent	/
Hoffmann et al. Référence 30	3	2 éliminent le virus	/
Hamel et al Référence 38	8	8 décèdent	/

2.4.2.3 Bilan des essais cliniques utilisant les analogues nucléosidiques RIBAVIRINE et CIDOFOVIR.

On voit donc pour ces différentes études que la part de patients qui améliorent leur symptômes, qui éliminent le virus ou qui survivent à l'infection adénovirale est plus importante lors de l'utilisation de CIDOFOVIR que lors de l'utilisation de RIBAVIRINE.

Cependant, le faible nombre de patients inclus dans ces études ainsi que l'absence fréquente d'un groupe contrôle ne permettent pas de répondre significativement à l'efficacité d'un traitement par rapport à un autre. La disparité des groupes de patients inclus en terme d'âge, d'état d'avancement de l'infection adénovirale reste aussi un biais important dans l'analyse des résultats.

Toutefois, parmi les résultats statistiquement significatifs des études relatives à la RIBAVIRINE et au CIDOFOVIR, il apparaît que l'échec du traitement était corrélé à la présence de facteurs de risques chez les patients traités, et plus particulièrement au grade de GVHD.

De plus, résultats parfois contradictoires des essais cliniques évoqués ci-dessus ne permettent pas à mon sens de définir si un traitement préemptif est plus efficace qu'un traitement curatif.

Il apparaît face à ces différentes études que la technique de diagnostic de l'infection adénovirale est essentielle dans le travail des cliniciens, que ce soit dans l'évaluation de l'efficacité des différentes thérapies ou encore dans le recrutement des patients à inclure au sein d'un essai clinique.

La mise en œuvre de nouveaux essais reste en fait corrélée aux techniques diagnostic, en particulier à des techniques de dépistage rapide tel la technique de PCR multiplexe en temps réel.

2.5 Evolution des traitements anti-adénoviraux

Il apparaît avant tout que l'amélioration des fonctions immunes chez les patients greffés de moelle est le point le plus important à développer pour prévenir l'infection adénovirale. Nous avons déjà vu qu'il était possible d'accélérer l'hématopoïèse en utilisant des facteurs de croissance (G-CSF et GM-CSF entre autres). Il semble tout aussi important d'optimiser au mieux les stratégies thérapeutiques afin de réduire le plus possible l'état d'immunodéficience.

Un des premiers points important à considérer est l'utilisation de traitements conditionnants moins traumatisants pour le système immunitaire du receveur, comme en particulier les conditionnements non myéloablatifs.

2.5.1 Les conditionnements non myéloablatifs

La notion de conditionnement non myéloablatif repose sur les principes suivants :

l'effet antitumoral observé après l'allogreffe est plus en rapport avec l'effet GVL qu'avec le conditionnement chimio- et/ou radiothérapique ;

la vacuité médullaire n'est pas indispensable à la prise de greffe ; celle-ci serait au moins autant assurée par les lymphocytes du donneur que par le conditionnement de greffe.

Selon cette théorie, le conditionnement a pour fonction principale de prévenir le rejet de greffe en détruisant le système immunitaire du receveur. Ce conditionnement doit, de ce fait, être plus immunosuppresseur que myéloablatif. Il comporte habituellement du cyclophosphamide, du busulfan ou une ICT à des doses plus faibles que celles utilisées dans les conditionnements classiques associés à des drogues immunosuppressives.

L'allègement du conditionnement s'accompagne d'une diminution de la fréquence de la GVHD qui, nous l'avons vu est un des principaux facteurs de risque de la maladie adénovirale. Par ailleurs, ce type de stratégie d'allogreffe associée au conditionnement non myéloablatif une immunomodulation après greffe qui permet d'augmenter l'effet GVL grâce à la diminution ou à l'arrêt de l'immunosuppression

Une autre perspective intéressante pour améliorer la survie des patients greffés de moelle osseuse consiste à diminuer l'immunodépression liée à la greffe. Pour ce faire, différentes possibilités sont en cours d'étude, comme en particulier diminuer la période de fragilité aux infections.

2.5.2 L'expansion ex vivo des CSH

L'expansion ex vivo des CSH serait dans un premier temps une réponse intéressante aux problèmes du manque de donneur. Elle devrait aussi dans le cas des greffes de sang placentaire, permettre d'étendre les indications de greffe aux adultes et d'accélérer la reconstitution hématopoïétique.

Ces techniques consistent en pratique à cultiver ex vivo les progéniteurs hématopoïétiques en présence de cytokines. Jusqu'à présent, les essais cliniques n'ont été réalisés qu'en situation autologue.

Certaines études montrent qu'après expansion ex vivo du greffon la remontée des polynucléaires après greffe est plus rapide et qu'il existe une augmentation du taux de cellules nucléées ou de GM-CFU (granulocyte and macrophage colony forming unit) dans le greffon.

Ainsi, cette technique de greffe permettrait de diminuer la durée de fragilité aux infections précoces (Cf. chapitre 2.3.). Toutefois, d'autres techniques permettent d'améliorer de façon plus spécifique l'immunité adénovirale.

2.5.3 Injection de lymphocytes cytotoxiques totaux et spécifiques d'antigènes viraux : cas de l'EBV, du CMV et de l'AdV

Le déficit de l'immunité spécifique après greffe expose les patients à des complications infectieuses principalement virales. Ces complications sont particulièrement fréquentes après les greffes déplétées ex vivo en cellules T, chez les patients présentant une GVHD sévère nécessitant un lourd traitement immunosuppresseur ou après greffes réalisées en situation de compatibilité HLA imparfaite.

Nous avons vu que les lymphocytes T cytotoxiques jouaient un rôle primordial dans le contrôle de l'infection virale. Il a été montré que l'injection de lymphocytes totaux du donneur (ou DLI pour donor lymphocytes infusion) permettait de traiter les syndromes lymphoprolifératifs liés à l'EBV (Référence 41).

Cependant cette thérapie peut être génératrice d'une GVHD sévère. Pour cette raison, plusieurs équipes ont cherché à générer in vitro des CTL spécifiques de l'EBV. Il a été montré que l'injection de ces CTL était efficace à la fois pour prévenir et traiter des syndromes lymphoprolifératifs postgreffe liés à l'EBV (Référence 42).

De même, le transfert de clones de CTL spécifiques du CMV peut permettre de prévenir des maladies à CMV sans générer de GVHD. On peut alors envisager d'utiliser des lymphocytes T spécifiques d'adénovirus.

Cependant, face à la diversité des épitopes adénoviraux, on peut se demander s'il sera possible de générer des CTL spécifiques du sérotype adénoviral responsable de l'infection pour un patient donné. C'est pourquoi une analyse épidémiologique plus fine des groupes et sérotypes adénoviraux infectieux permettrait d'orienter la synthèse de CTL vers les virus les plus fréquemment infectieux.

Dans l'optique de mieux connaître les groupes et sérotypes adénoviraux responsables d'infections opportunistes chez le patient greffé de moelle, différentes techniques de

diagnostic biologique peuvent être mises en œuvre. Parmi celles-ci, l'utilisation de la PCR multiplexe en temps réel devrait ouvrir la voie à une meilleure prise en charge des patients infectés par l'AdV.

3 Diagnostic biologique des infections adénovirales

Comme nous le verrons au cours de deux cas cliniques, le diagnostic d'infection adénovirale se fait essentiellement grâce à des examens biologiques. Nous distinguerons alors les techniques de diagnostic classique et celles plus innovantes utilisant une approche moléculaire.

3.1 Diagnostic « classique » de l'infection adénovirale

3.1.1 Indication

La recherche d'adénovirus est recommandée lors de l'observation de signes cliniques évoquant ce type d'infection.

C'est le cas lors d'atteintes oculaires, d'hospitalisations pour broncho-pneumopathies ou dans le cadre de syndrome infectieux avec une atteinte respiratoire et ou intestinale, hépatique et urinaire chez le patient immunodéprimé (voir la partie pathologies adénovirales).

Il est aussi important, chez le patient immunodéprimé présentant un tableau infectieux (et plus particulièrement chez le patient greffé de moelle), de rechercher des causes infectieuses virales pour lesquelles les AdV représentent une fraction croissante. A cette fin, différentes techniques sont disponibles.

3.1.2 Culture cellulaire

Il existe différentes techniques pour diagnostiquer une infection adénovirale chez un patient. La technique de référence est la recherche d'un ECP caractéristique sur culture cellulaire.

Pour cela, on recherche la présence d'AdV dans différents fluides biologiques (Sérum, urines, selles, salive, sécrétions nasales ou lacrymales). Par simple contact du fluide avec une lignée cellulaire permissive à l'infection, il est possible d'observer :

- Un effet cytopathique (ou ECP) caractéristique
- Des inclusions nucléaires basophiles en grappe.

Plusieurs types de cellules peuvent être utilisés. On préférera aux cellules dites primaires des cellules immortalisées (ou lignées cellulaires) capables de se diviser un grand nombre de fois (20 et 30 doublements de la population cellulaire sont alors possibles).

On distingue principalement les cellules A549 qui sont des lignées cellulaires de carcinome de poumon humain, les cellules HEK qui sont issues de rein embryonnaire ainsi que la lignée cellulaire épithéliale Hep-2.

Cependant, des cellules primaires comme les fibroblastes, peuvent aussi être utilisés pour mettre en évidence l'effet cytopathique lié à l'adénovirus.

De plus, certains AdV ne sont pas à même de pousser sur cellule. Il sera alors de contourner ce problème en utilisant des lignées cellulaires possédant des gènes adénoviraux capables de compléter le cycle viral in vitro. C'est le cas des cellules HEK 293 qui apportent le gène E1 de l'AdV de sérotype 5. Ces cellules permettront alors de cultiver les sérotypes AdV 40 et 41 responsables de gastro-entérites.

La culture cellulaire, bien que technique de référence, possède cependant de nombreux handicaps. Tout d'abord, il existe une variabilité de sensibilité des types cellulaires à l'infection adénovirale. Il peut alors être difficile de mettre en évidence certains sérotypes sur des cellules classiques. De plus, certains AdV peuvent se révéler qu'après plus de 3 semaines de culture. Ce délai est alors incompatible avec la prise de décision clinique. D'autres techniques diagnostique doivent alors être mises en œuvre.

3.1.3 Diagnostic immunologique sur les fluides biologiques

Pour pallier les délais imposés par la technique de culture cellulaire, d'autres techniques peuvent être mises en œuvre en parallèle. Il est alors possible de rechercher la présence d'antigènes adénoviraux. Cette recherche pourra être réalisée sur les fluides biologiques (lavage bronchique, sérum, urine..) qui sont d'obtention facile

Il existe des techniques directes de mise en évidence des antigènes (Immunofluorescence, tests immunoenzymatiques) qui permettent une aide au diagnostic sans traitement préalable des échantillons biologiques récoltés.

Ces techniques qui ont l'avantage de leur rapidité et de leur facilité de mise en œuvre (présentation sous forme de bandelettes) ont comme inconvénient une faible fiabilité. En effet, les anticorps utilisés pour la reconnaissance antigénique n'ont pas une affinité égale pour tous les sérotypes. De plus, le milieu de détection (c'est-à-dire le type de prélèvement biologique) peut inhiber la réaction de reconnaissance. Cette technique en association à la culture cellulaire est aujourd'hui couramment utilisée au laboratoire de virologie du CHU de Nantes.

Enfin, il est possible d'utiliser des antisérums pour typer l'AdV pathogène. Ces sérums s'utilisent dans un second temps du diagnostique, c'est à dire après qu'une première méthode aie détecté la présence d'AdV. Le typage permet entre autres avantages de :

- Affiner les connaissances épidémiologiques concernant les différents sérotypes.
- Apprécier, en fonction du sérotype détecté, la gravité de l'infection adénovirale.
- Apporter au clinicien des informations aidant à la prise en charge thérapeutique.

Cependant, la lourdeur d'obtention des antisérums ne permet pas d'avoir à disposition l'ensemble des sérums correspondant aux 52 sérotypes pathogènes de l'homme. Il en va de même de l'utilisation d'anticorps issus de ces antisérums. De plus, ces anticorps issus d'antisérums peuvent être dirigés contre des sites de la capside communs entre différents sérotypes. Ces anticorps dirigés contre plusieurs sites antigéniques peuvent alors induire la détection de faux positifs (i.e. déclarer un échantillon positif pour un sérotype donné alors qu'il ne l'est pas)

Aujourd'hui se développent de nouveaux outils : les anticorps monoclonaux. Dirigés contre un unique site antigénique (épitope) du virus, ils permettent d'éviter au maximum les risques de faux positifs. Cependant, le coût de ces anticorps est très élevé et posséder l'ensemble des 51 anticorps devient alors prohibitif.

Si la recherche d'antigènes viraux dans les fluides permet de poser le diagnostic d'infection adénovirale, il est nécessaire de réaliser un marquage sur biopsies de tissus pour poser le diagnostic de maladie adénovirale certaine.

3.1.4 Techniques de marquage sur tissus

Dans le cas de la maladie adénovirale, le diagnostic peut être apporté par la présence sur une biopsie d'inclusions nucléaires caractéristiques. Un marquage à l'éosine permet alors de mettre en évidence ces inclusions.

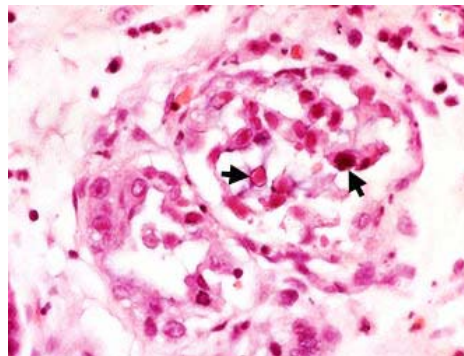


Image II : Coupe de tissu bronchique avec inclusions nucléaires basophiles (x160)

Sur cette coupe de tissu épithélial bronchique, les inclusions basophiles indiquées par les flèches noires sont mises en évidence par une coloration à l'éosine. : (Référence 43)

Il est également envisageable, à partir de coupes fines de tissus, de réaliser un marquage à l'aide d'anticorps. Cette technique immuno-histologique dite d'hybridation in situ permettra alors de diagnostiquer une infection (Image III) voir de typer le sérotype responsable de l'infection. Il faudra cependant que le virus soit dans son étape tardive de réplication et qu'il produise les éléments constitutifs de sa capside lors de la réalisation de la biopsie. Cette technique bien que sensible est lourde à mettre en œuvre et retarde donc la prise de décision clinique. Elle permet cependant de poser avec certitude le diagnostic de maladie adénovirale (Cf. chapitre définitions).

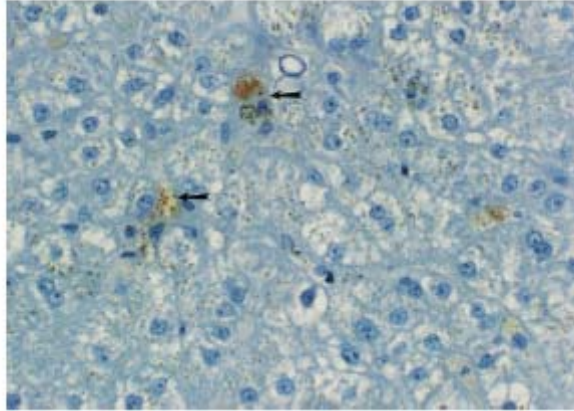


Image III : Marquage immuno-histochimique sur biopsies de foie (x160)

Les hépatocytes marqués en brun (colorés par la fixation d'un anticorps marqué à l'aide d'une peroxydase) sont infectés par l'adénovirus (**Référence 43**)

Pour palier aux inconvénients des techniques de diagnostic évoquées ci-dessus, de nouvelles alternatives de biologie moléculaire apparaissent

3.2 Approches moléculaires du diagnostic

Nous avons vu au cours de la première partie étude de cette que l'on pouvait identifier les adénovirus à la fois selon leurs caractéristiques de surface (selon leurs épitopes) mais aussi selon la séquence d'ADN qui les définit. Ainsi, dans une volonté d'identification de souches d'AdV, il sera nécessaire dans un premier temps d'isoler leur matériel génétique. Pour obtenir l'ADN viral, il sera nécessaire de réaliser un prétraitement des échantillons biologiques pour lesquels l'on suspecte la présence d'AdV.

3.2.1 Prétraitement de l'échantillon et principe de marche en avant

Une première étape d'extraction permet de séparer les acides nucléiques des autres composants de la matrice comme les lipides et les protéines. Cette étape est réalisée dans une pièce du CHU qui est entièrement consacrée à cette fonction.

En effet, la séparation géographique des locaux dédiés aux différentes étapes de l'analyse des échantillons biologiques est un point important car elle permet de limiter au maximum les risques de contamination. De plus, chaque échantillon suivra le principe de marche en avant, c'est-à-dire qu'il n'est pas possible de déplacer physiquement un échantillon vers une étape d'analyse antérieure. Le principe de marche en avant s'appliquera alors à l'ensemble des étapes d'analyse, c'est-à-dire aux étapes de pré-PCR et de PCR. Ce principe s'inscrit dans le cadre d'un référentiel GBEA (ou guide de bonne exécution des analyses).

Il existe différentes techniques pour extraire l'ADN. Les plus courantes utilisent des solvants composés d'un mélange de phénol et de chloroforme ou encore des colonnes d'extraction à base de silice. Ce sont ces dernières qui ont été retenues pour l'extraction de l'ADN adénoviral (Kit MACHEREY NAGEL). Elles sont composées d'un filtre de silice qui permet de retenir l'ADN viral en fonction de son poids moléculaire. L'adjonction de différents solvants permet d'éliminer les composants de la matrice biologique non désirés (lipides et protéines). Ainsi l'ajout d'un solvant d'élution permet de récupérer l'ADN purifié.

Toutefois, il sera possible d'extraire en plus de l'ADN viral de l'ADN génomique issu de l'individu chez qui le prélèvement a été effectué ou bien encore l'ADN d'autres micro-organismes présents au sein de l'échantillon. Parmi toutes ces séquences d'ADN, la technique d'amplification par PCR (Polymerisation Chain Reaction) permet non seulement d'affirmer la présence d'AdV, mais aussi d'effectuer son groupage.

3.2.2 Principe général de l'amplification génique par PCR

L'ADN est constitué de paires de bases nucléosidiques dont l'enchaînement constitue une information génétique. La structure de l'ADN en double hélice (**Figure VII**), est liée à l'existence de deux brins complémentaires se faisant face. La complémentarité des bases permet à partir de la séquence d'un ADN simple brin (brin sens) d'obtenir la séquence d'ADN du brin complémentaire (ou anti-sens)

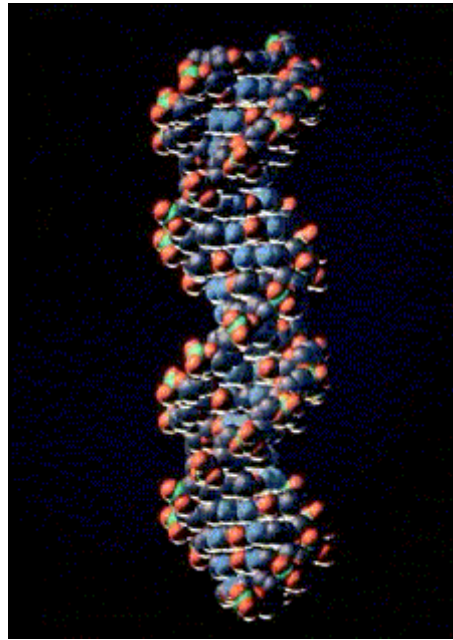


Figure VIII : Représentation de la structure atomique d'une double hélice d'ADN .

Le principe de la PCR utilise une propriété de l'ADN à pouvoir passer à partir d'une température critique (appelée température de dénaturation ou T_m) d'un état double brin à un état simple brin.

Lors de l'état simple brin, une baisse de la température permet à une amorce d'ADN de se fixer de façon complémentaire et spécifique sur une séquence de nucléotides. Cette amorce sert de point de départ à une polymérase pour répliquer le brin d'ADN et ainsi générer un ADN double brin à partir d'un ADN simple brin. En fait, la polymérase permet d'ajouter à l'amorce la séquence complémentaire du brin copié. L'utilisation d'un couple d'amorce permet alors d'amplifier les deux brins d'une séquence d'ADN comprise entre environ 100 à 5000 paires de base (Figure IX).

Dans le cadre de la PCR adénovirus, c'est sur la région hexonique très conservée entre les différents groupes qu'est choisi le couple d'amorces.

C'est un thermocycler qui permet de fixer les trois températures pour effectuer un cycle de PCR (figure X). On distingue trois températures différentes au sein d'un cycle de PCR :

- Température de dénaturation de l'ADN
- Température de ré-appariement ou hybridation de l'ADN avec le couple d'amorces
- Température d'élongation ou de synthèse de l'ADN

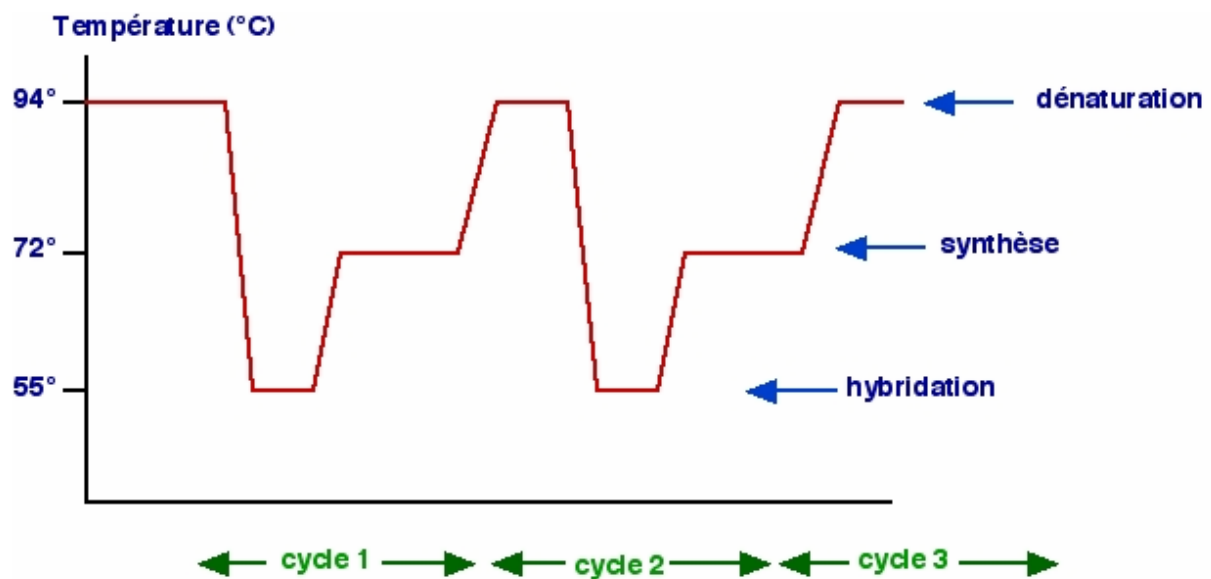


Figure IX : Représentation pour 3 cycles d'amplification des différentes températures nécessaires à l'amplification d'une séquence d'ADN par PCR.

Le nombre de cycles de PCR effectué permettra d'amplifier de façon exponentielle la ou les séquences d'intérêt potentiellement présentes dans l'échantillon. En effet, à chaque cycle le nombre de séquences d'intérêt est multiplié par deux (Figure XVIII). A la fin de la réaction d'amplification, on obtient comme nombre de séquences amplifiées 2^n avec n le nombre de cycles effectués. Ainsi, la séquence d'ADN incluse entre les deux amorces, une fois amplifiée, pourra être facilement analysable.

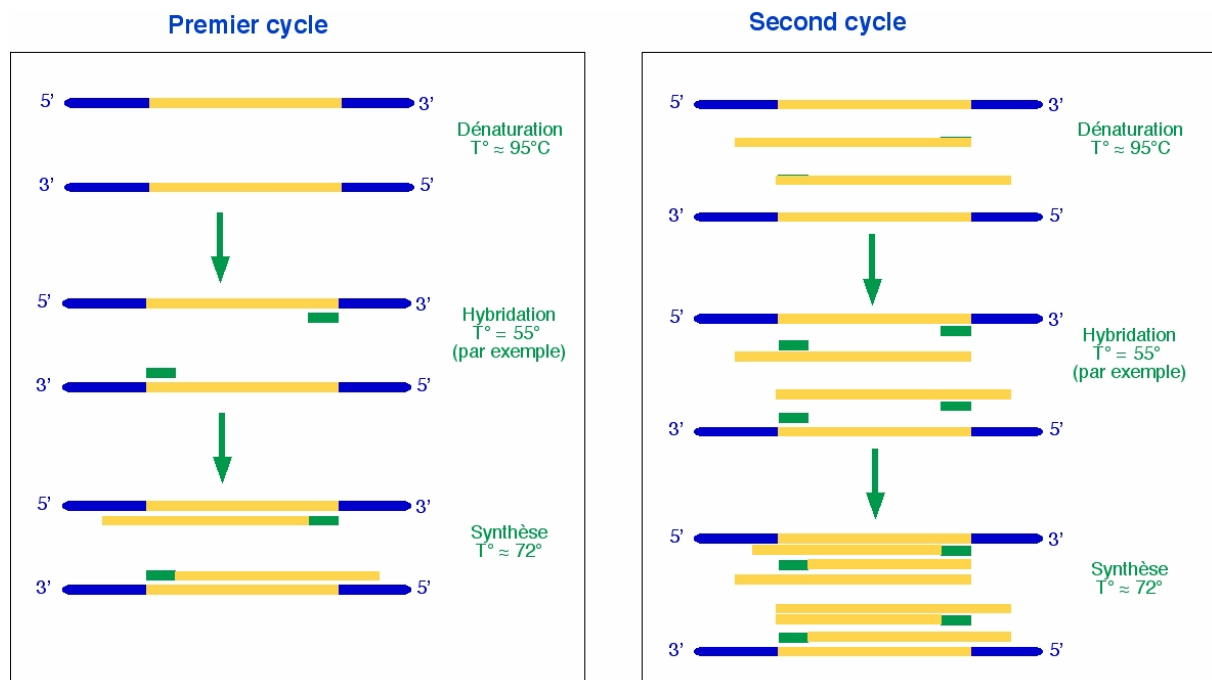


Figure X : Production des amplicons à partir des deux brins d'ADN matrice.

Le choix des amorces (en vert) permet ici d'amplifier spécifiquement la région d'intérêt (en jaune)

Il est ici important de noter que le choix du couple d'amorce est crucial dans la détection de l'AdV. C'est le choix de leur séquence nucléotidique qui apporte à la fois sensibilité de détection et spécificité entre le virus recherché et d'autres virus potentiellement détectables. En fait, en fonction de la séquence d'ADN du couple d'amorce choisi, une température d'hybridation est définie.

L'utilisation d'amorces se fixant au sein de régions spécifiques d'un groupe adénoviral pourra permettre une analyse plus fine du groupe adénoviral incriminé. Malheureusement, la différence entre groupes et sous groupes adénoviraux ne s'exprimant parfois que par des différences de quelques paires de base, la technique de PCR « classique » atteint alors sa limite de sélectivité. D'autres techniques sont alors nécessaires pour mettre en œuvre des différences entre groupes adénoviraux.

3.2.3 PCR quantitative en temps réel.

En plus d'une très bonne sensibilité, la PCR temps réel permet la quantification de la charge virale en ADN contenue dans un échantillon biologique.

3.2.3.1 Principe de la quantification par PCR

3.2.3.1.1 Détermination du seuil d'amplification (ouCt)

La PCR quantitative permet de déterminer le nombre de copies d'ADN présent dans une cellule. Pour cela, elle amplifie un gène rapporteur en parallèle de la séquence d'ADN d'intérêt. Elle peut aussi évaluer une quantité relative entre deux échantillons par la détermination du seuil cycle ou Ct

On distingue deux étapes lors de la cinétique d'amplification : une étape d'amplification linéaire et une étape de plateau correspondant à l'épuisement des réactifs. Pour les PCR quantitatives conventionnelles, durant la phase linéaire, il existe une relation entre la quantité d'ADN produite au cycle n (X_n) et la quantité d'ADN initialement présente (X_0) de façon proportionnelle au rendement d'amplification. Dans le cas de la PCR temps réel, le Ct permet d'évaluer la quantité d'ADN amplifiée.

Les premiers cycles permettent de calculer un Ct qui constitue la ligne de base de l'analyse (Figure XI). Suivra ensuite le point d'inflexion marquant le début de l'amplification.

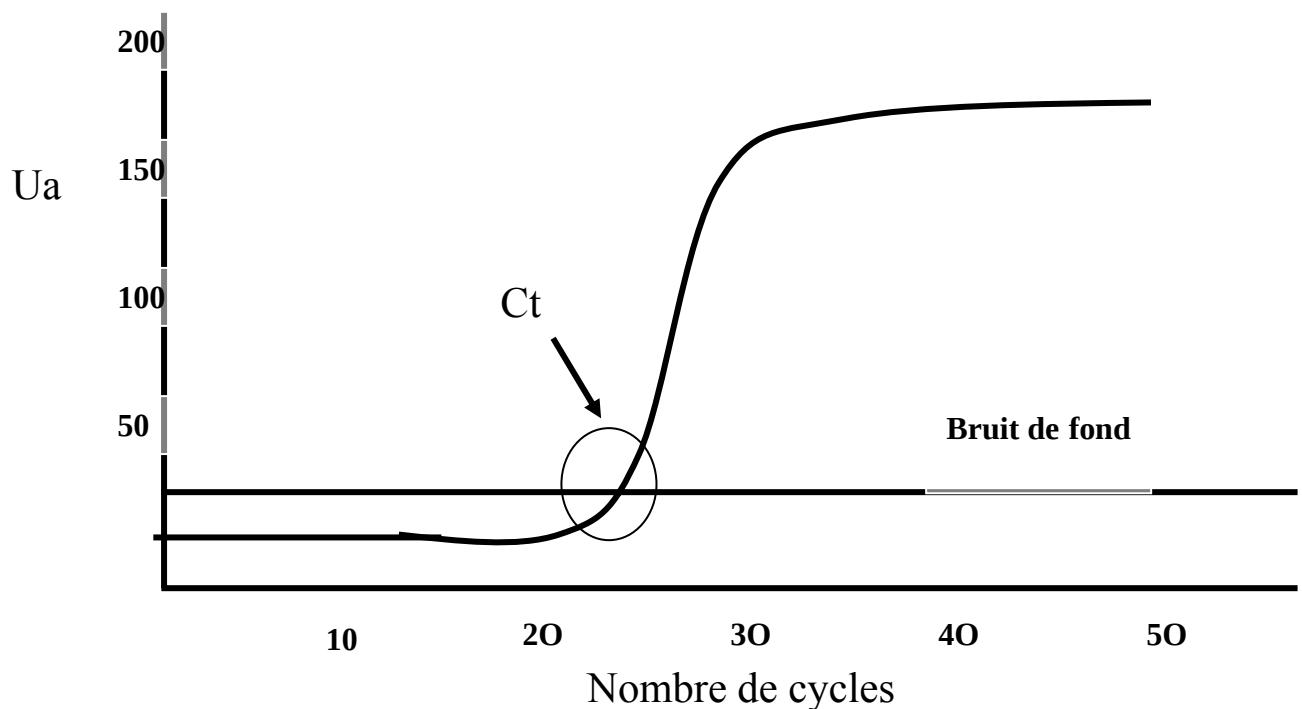


Figure XI : Tracé schématique de la courbe d'amplification d'une séquence d'intérêt par PCR quantitative :

Au cours de l'amplification, la valeur du C_t est déterminée dans la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne de bruit de fond avec la courbe de fluorescence. En abscisse se trouve le nombre de cycles d'amplification et en ordonnée l'intensité de fluorescence émise (U_a)

3.2.3.1.2 Condition de validité du C_t

Pour valider la mesure du C_t , il est nécessaire que la courbe d'amplification possède un domaine de linéarité. En effet, la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon à tester peut faire apparaître la courbe linéaire alors qu'elle ne l'est pas. Il sera alors important de réaliser des dilutions décimales de l'échantillon à tester pour s'assurer que le C_t augmente de façon linéaire. En effet, plus la quantité d'ADN à amplifier est importante au sein de l'échantillon à tester, plus la partie linéaire de la courbe apparaîtra tôt au cours de l'analyse et de ce fait plus le C_t sera faible.

3.2.3.2 Marquage et détection des amplicons par la technique « rapporteur extincteur » Taq Man*

Lors de la préparation du mélange nécessaire à la réalisation de la PCR, en plus des amorces nécessaires à la synthèse des amplicons, une sonde marquée est apportée au mélange de la réaction de PCR.

Cette sonde d'une trentaine de paires de base est marquée en 5' par un fluorophore rapporteur (fréquemment TAM) et en 3' par un fluorophore « quencher » ou extincteur (classiquement Tamra).

En l'absence d'amplicons, de par la petite taille de la sonde, le rapporteur est en contact avec l'extincteur et de ce fait émet à une longueur d'onde particulière. En présence d'amplicons, la sonde s'hybride et le fluorophore rapporteur se détache de la sonde pour émettre à une longueur d'onde qui lui est propre. C'est cette longueur d'onde d'émission qui sera alors quantifiée. En effet, plus il y aura d'amplicons produits, plus il y aura de rapporteurs libérés et plus l'intensité du signal pour une longueur d'onde donnée sera forte. (Fig XI)

C'est la mesure de l'intensité d'émission du fluorophore qui permet d'effectuer la quantification de l'ADN viral.

3.2.3.3 Matériel

En plus d'un thermocycler assurant la réaction de PCR proprement dite, un analyseur permet de mesurer un signal lumineux lié à la production des amplicons. Un logiciel permet l'analyse des résultats.

Dans le cas du Rotorgène (thermocycler utilisé au laboratoire de virologie de Nantes), 72 amplifications peuvent être analysées simultanément.

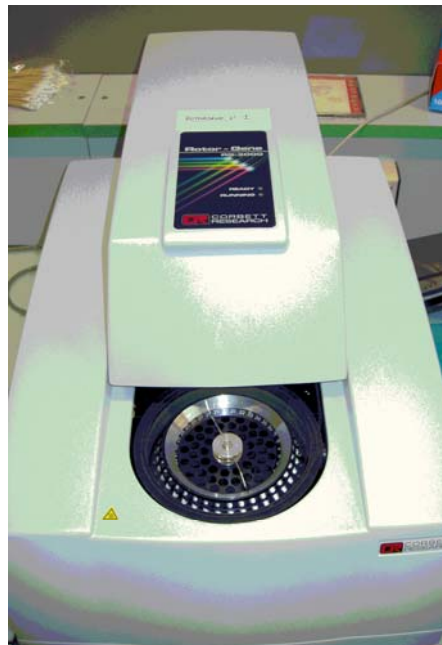


Image IV: Appareil de PCR quantitative ROTORGENE utilisé au laboratoire de virologie du CHU de Nantes

Au sein du carrousel (au centre de l'image) 36 puits de 0.2ml ou 72 puits de 72 ml peuvent être analysés simultanément. (Un schéma est également présenté en figure XIII)

Les conditions d'une PCR quantitative ont déjà été adaptées au laboratoire de virologie. Ces conditions sont décrites ci-dessous.

**Virus recherché: ADENOVIRUS par PCR Spécifique en temps réel
(Rotorgène)**

Référence: PCR sur la région hexon

Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR

Albert Heim, Carmen Ebnet, Gabi Harste, and Patricia Pring-Akerblom

Institute for virology Hannover Medical School, Germany

Journal of Medical Virology 70:228-239 (2003)

Adaptée au laboratoire le 15/12/2004

Composition des primers:

Nom: AQ1

Séquence: 5'-3' GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT

Nom: AQ2

Séquence: 5'-3' GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C

Sonde ADVS FAM-TAMRA

Nom : ADVS

Séquence 5'-3' Fam- TGC ACC AGA CCC GGG CTC AGG TAC TCC GA - Tamra

Composition du mix PCR qsp25 µl

Hot start taq Qbiogene

	Concentration initiale		volume	100tubes	Concent. finale
eau distillée			10µl	1000µl	
Buffer 10X Qbiogene	10	X	2,5µl	250µl	1 X
MgCl2 Qbiogene	25	mM	4µl	400µl	4 mM
dNTP AUCG	2.5	mM	2µl	200µl	0.2 mM
primer ADVQ1	20	µM	0,625µl	62.5µl	0.5 µM
primer ADVQ2	20	µM	0,625µl	62.5µl	0.5 µM
sonde ADVS	20	µM	0,125µl	12.5µl	0.1 µM
HotprimeTaq	5	UI	0,125µl		
DNA			5µl		

Cycles d'amplification sur le ROTORGENE 3000 : CMV HSV VZV ADV

Température	temps	Nombre de cycles
50°C	300 secondes	1
95°C	600 secondes	1
94°C	15 secondes	45
57°C	20 secondes	
72°C	20 secondes	

témoins positifs : 5 µl de l'extrait Qiagen dilué à 10^{-5} d'un surnageant de culture ADV C
5 µl de l'extrait Qiagen dilué à 10^{-6} d'un surnageant de culture ADV C

témoin d'extraction 5 µl

Mise à jour le 12/05/2005

Figure XII : Protocole d'amplification par PCR en temps réel utilisé au laboratoire de virologie de Nantes permettant la mise en évidence d'AdV sur des extractions de fluides biologiques.

3.2.3.4 Stratégies de quantification d'un ADN viral

Il y a deux façons de quantifier la charge virale contenue dans un échantillon biologique. La première est une quantification absolue qui nécessite d'apporter une gamme d'ADN de titre connu comme standard interne. Cependant, lors de la recherche des différents groupes adénoviraux, il sera difficile d'obtenir une gamme pour chacun d'entre eux.

La seconde possibilité consiste à rechercher l'évolution de la charge virale dans le temps. Cette technique de quantification relative, plus souple que la précédente est suffisante pour suivre le devenir de la maladie chez un patient, et en particulier pour tester l'efficacité d'un traitement. En effet, certains virus comme le CMV, peuvent être présent dans le sang d'un individu sans déclencher de pathologie particulière. Ce n'est qu'à partir d'un certain seuil qu'il sera nécessaire d'initier une thérapie. Pour l'AdV le fait d'être présent dans le sang est potentiellement synonyme de maladie adénovirale. De ce fait, la détection du virus sur un premier échantillon sans quantification permet de poser le diagnostic d'infection adénovirale.

Une alternative entre quantification relative et absolue existe cependant. La quantification d'un gène rapporteur (ou standard externe) permet alors d'affiner la quantification virale par PCR

L'utilisation d'un standard externe permet, pour les échantillons biologiques dans lesquels se trouvent des cellules (le sang essentiellement) de cerner le nombre de séquences virales rapporté à la quantité d'ADN génomique. Un gène témoin situé dans l'ADN génomique présent en nombre constant dans toutes les cellules de tous les individus sera alors amplifié en parallèle de la séquence virale. Il sera également possible d'utiliser ce standard entre deux analyses afin de s'assurer de la qualité de l'amplification par PCR.

Ainsi, la quantification relative de la charge d'un échantillon biologique en ADN adénoviral est relativement simple à mettre en œuvre et présente alors de nombreux avantages

3.2.3.4.1 Avantages d'une quantification de l'ADN adénoviral

L'absence d'étape de post PCR par rapport à une PCR classique permet de diminuer le temps d'analyse. Cela permet de plus une diminution des risques de contamination. De plus, par rapport à une PCR quantitative classique, la PCR temps réel nécessite moins de cycles d'amplification pour une sensibilité équivalente, avec une répétabilité et une reproductibilité supérieure.

En étudiant la partie linéaire de la cinétique d'émission du fluorophore, il est également possible de détecter des quantités de virus comprises entre plusieurs logarithmes. Cela permet alors d'éviter d'avoir à réaliser des dilutions de l'échantillon à tester et d'augmenter le nombre d'échantillons analysables lors d'une seule opération.

Enfin, la possibilité de réaliser des analyses sur de nombreux échantillons assure un avantage économique, en particulier face à d'autres techniques immunoenzymatiques.

3.2.3.4.2 Inconvénients potentiels de la PCR quantitative

Le choix d'une technique de quantification de l'ADN viral par PCR reste lié à des considérations économiques. En effet, l'investissement lié à l'achat des différents matériels reste lourd et doit être évalué en fonction du nombre d'analyses effectuées avec cet appareil.

Il apparaît cependant aujourd'hui que la quantification de l'ADN passe de plus en plus par des techniques de PCR quantitative. Ainsi, sur le plateau technique, au laboratoire de virologie, la plupart des virus sont recherchés et quantifiés par PCR. Le coût d'analyse d'un échantillon revient alors à moins de 10 euros.

De plus, il apparaît que la mise au point de ces techniques reste lourde à mettre en œuvre. Elle le sera d'autant plus pour des techniques de PCR quantitative associées à des stratégies de multiplexage ou plusieurs séquences d'ADN différentes sont détectables simultanément.

Afin de valider les résultats d'analyse, un ensemble de contrôles de la technique de PCR est indispensable

3.2.3.5 Contrôles d'une quantification par PCR temps réel

Les contrôles à apporter au cours d'une PCR temps réel sont ceux d'une PCR classique (témoins positifs et témoins négatifs). Il sera également nécessaire de rechercher la présence d'inhibiteurs modifiant le domaine de linéarité de la PCR.

3.2.3.5.1 Utilisation de témoins d'extraction et d'amplification

L'utilisation de témoins doit permettre de s'assurer du bon fonctionnement potentiel de la PCR (utilisation de témoins positifs) sans pour autant déclarer à tort un échantillon positif qui ne l'est pas (témoins négatifs).

Témoins négatifs

Afin de s'assurer de l'absence de contaminations lors de l'extraction, il est nécessaire d'utiliser un témoin spécifique de cette étape. Pour cela, en parallèle de l'extraction de l'ADN des échantillons d'intérêt sera extrait un échantillon sans ADN, le plus souvent de l'eau pure. La négativité de du témoin d'extraction assurera la validation de l'étape d'extraction.

Il est cependant possible d'avoir une contamination au cours de l'étape de PCR. Pour discriminer une contamination entre l'étape pré PCR et l'étape PCR, un second témoin négatif peut être utilisé. Il s'agira alors d'un puit de PCR comportant tous les réactifs d'amplification. La positivité du témoin négatif d'amplification signera une contamination par un ADN au cours de l'étape de PCR. Cet ADN peut provenir d'une contamination croisée entre les différents puits d'amplification ou encore peut avoir été rapporté de l'extérieur des puits (matériel, manipulateur...). Devant la sensibilité des techniques de PCR, le principe de marche en avant doit alors être appliqué de façon systématique.

Ces contrôles négatifs sont d'autant plus importants à utiliser qu'il est nécessaire d'utiliser des témoins positifs (et donc potentiellement sources de contamination) nécessaires à la validation de l'amplification PCR.

Témoins positifs et témoins de linéarité

Au laboratoire de virologie sont utilisés des contrôles positifs permettant d'affirmer la présence d'inhibiteurs d'amplification au sein de l'échantillon à analyser. Ces contrôles sont soit fournis par le fabricant des réactifs d'amplification PCR soit sont issus de cultures de virus.

En effet, l'amplification par PCR quantitative se heurte fréquemment à des problèmes d'inhibition liés à la persistance de protéines malgré l'étape d'extraction. Ces témoins positifs permettent ainsi de valider la négativité d'échantillons ne contenant pas de séquence d'ADN d'intérêt, c'est-à-dire d'exclure la présence de faux négatifs.

De plus, en réalisant des dilutions décimales du témoin positif, il est possible de définir le domaine de linéarité dans lequel s'effectue l'analyse. Lors de la mise au point de la technique de PCR quantitative, cette dilution s'effectuera sur plusieurs logarithmes. La gamme de sensibilité évaluée dans le cas de la détection d'ADN adénoviral du groupe C a permis de mettre en évidence un domaine de linéarité sur au moins 5 dilutions logarithmiques (Figure XIII).

On voit sur le graphique que les Ct des échantillons d'AdV du groupe C dilués de façon décimale apparaissent de façon régulière. On vérifie bien dans le tableau que la valeur des Ct augmente de 2,3 à chaque dilution, c'est-à-dire de 10 en 10 sur une échelle logarithmique décimale

Une fois le domaine de linéarité défini pour des conditions de PCR données, la linéarité pourra n'être évaluée que sur deux dilutions, afin de rechercher seulement la présence d'inhibiteurs d'amplification.

En plus de détecter et de quantifier des AdV présents au sein d'un échantillon biologique, il apparaît important de typer les différents groupes d'AdV. Ce typage doit pouvoir apporter des informations nécessaires à la prise en charge du malade, mais également doit permettre d'affiner les connaissances épidémiologiques concernant les différents groupes d'AdV. Dans ce but, la recherche des groupes d'AdV A,B,C,D et F sera mise en œuvre par une PCR quantitative dite multiplexe.

3.2.4 PCR quantitative multiplexe

Pour valider une PCR multiplexe, il est nécessaire que le choix des réactifs permette une discrimination suffisante entre les différentes séquences d'ADN amplifiées. Pour ce faire, deux grandes stratégies de multiplexage sont réalisables

3.2.4.1 Différentes stratégies de multiplexage

L'identification des différents groupes adénoviraux peut être effectuée en utilisant au cours de la PCR soit des amorces consensus soit des sondes consensus. Cela signifie que ces amorces ou ces sondes sont capables de se fixer sur des régions d'ADN partagées par l'ensemble des adénovirus d'un même groupe.

3.2.4.1.1 Discrimination des groupes d'AdV par une sonde marquée :

« Un seul couple d'amorces pour plusieurs sondes »

Le premier principe de multiplexage consiste à choisir un unique couple d'amorce pour amplifier toutes les séquences adénovirales potentiellement présentes au sein de l'échantillon biologique. Ces amorces sont capables de se fixer sur une seule séquence d'ADN partagée par l'ensemble des groupes d'AdV. Elles permettent cependant d'amplifier des séquences d'ADN pouvant varier de quelques paires de base.

C'est le cas pour la région hexonique du génome adénoviral qui bien que conservée possède des variations de séquence en fonction des groupes adénoviraux (Cf partie I). Il sera ensuite nécessaire d'apporter des sondes capables de faire la distinction entre les différentes séquences d'AdV amplifiées. Pour cela, chaque sonde devra posséder une séquence consensus du groupe à identifier, sans pour autant s'hybrider avec l'ADN d'un autre groupe.

Il apparaît cependant que de par la faible taille des amorces utilisables au cours de l'amplification PCR, la discrimination des différents groupes d'AdV s'avère délicate. Il a alors été choisi au laboratoire d'utiliser pour discriminer les différents groupe d'AdV plusieurs couples d'amorces d'amplification.

3.2.4.1.2 Discrimination du groupe d'ADV par les amorces

« Différents couple d'amorces pour plusieurs sondes »

Le seconde stratégie de multiplexage réside dans l'association de plusieurs couples d'amorces au sein de la même PCR, chaque amorce se fixant sur des régions différentes des différents groupes adénoviraux.

Cette technique demande cependant des conditions opératoires identiques pour tous les couples d'amorces (températures, teneur en magnésium...) et nécessite donc un travail de mise au point important (en particulier en ce qui concerne le choix de la séquence des amorces).

Comme dans la première technique de multiplexage, il sera nécessaire d'apporter des sondes à la fois spécifiques et consensus pour un groupe adénoviral donné. C'est cette dernière technique décrite par Leruez-ville et al ([Référence 39](#)), qui a été retenue pour typer les différents groupes adénoviraux.

Il apparaît alors dans cette étude que le choix des sondes, tout autant que celui des amorces est nécessaire à la discrimination des différents groupes d'ADV.

3.2.4.2 Matériel utilisé

3.2.4.2.1 Choix des sondes

Afin d'apporter une discrimination suffisante entre les différents sérotypes, il est nécessaire que les sondes possèdent une séquence partagée par tous les sérotypes du groupe, mais sans posséder d'affinité avec la séquence d'un autre groupe.

Pour ce faire, la séquence de la sonde doit avoir la plus forte affinité possible pour la séquence consensus du groupe auquel elle est dédiée. Il avait été publié par Leruez-ville et al.

(Référence 39). que l'utilisation de sondes MGB (Minor Groove Binding) d'une vingtaine de paires de bases capables de se fixer dans le grand sillon de l'ADN apportait les qualités requises à la fois en terme de spécificité pour un groupe d'AdV et également en terme de sélectivité entre les différents groupes d'AdV.

La non disponibilité commerciale des sonde MGB a été contournée en utilisant des sondes classiques de taille supérieures. Cependant, leur mise au point pour obtenir les caractéristiques sus citées a nécessité plus de temps de par l'augmentation de la taille des calculs à effectuer.

Après le choix de la séquence de la sonde, il est nécessaire que chaque sonde soit marquée à l'aide d'un rapporteur différent. Comme pour le système Fam-Tamra, les sondes sélectionnées par le laboratoire utilisent la technique du rapporteur extincteur (décrite dans la partie 7.3). Il est alors nécessaire de choisir parmi les différents rapporteurs disponibles ceux dont la longueur d'onde d'émission ne se superposera pas lors de la détection du signal. De plus, les différentes longueurs d'onde d'émission des fluorophores choisis doivent pouvoir être lus séparément par le photomultiplicateur du système d'analyse PCR.

Il a donc été nécessaire de choisir pour les 5 groupes d'AdV ciblés 5 fluorophores compatibles avec une lecture par l'appareil ROTORGENE utilisé au laboratoire de virologie de Nantes. PCR. On voit en **figure XIII** que parmi l'ensemble des fluorophores disponibles pour marquer une sonde que seuls 6 peuvent être lus simultanément par l'appareil rotorgène.

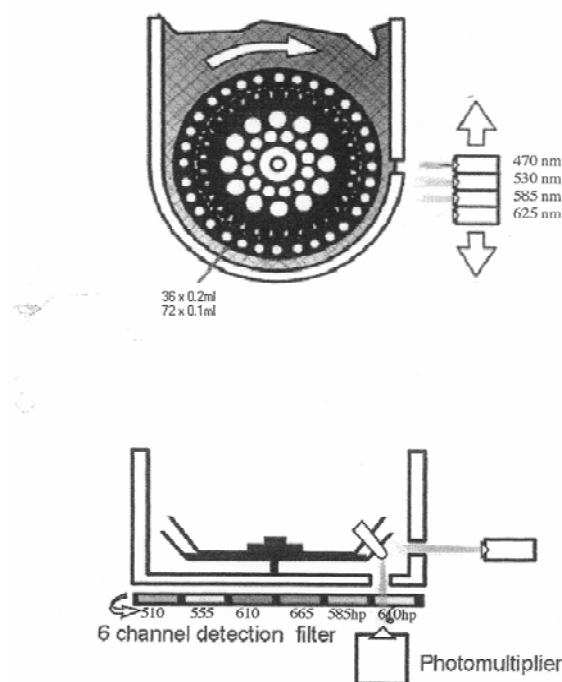


Figure XIII : Schéma vu du dessus et schéma en vue latérale du carrousel et du système optique d'émission et de réception de l'appareil ROTORGENE

En effet, la superposition du spectre d'émission de deux marqueurs de sonde pourrait générer de faux positifs. Il en va de même si deux couples d'amorces se fixent sur les mêmes séquences.

3.2.4.2.2 Choix des amorces

Les amorces sont les séquences d'ADN permettant d'initier la réaction de PCR (Cf Chapitre PCR classique). Leur choix pour la mise au point de la PCR multiplexe repose sur les travaux publiés par Leruez ville et al. (Référence 39)

Pour un groupe adénoviral donné, les amorces amplifient en théorie une séquence partagée par l'ensemble des virus de ce groupe. La spécificité des amorces pour un groupe adénoviral a été testée par alignement de séquence. Un logiciel (type clustalW) permet de comparer la séquence des sondes avec celle des différents AdV à tester.

Une fois le « design » des amorces et des sondes réalisé, différents contrôles doivent être mis en œuvre pour valider cette nouvelle méthode d'analyse.

3.2.4.3 Validation de la PCR AdV multiplexe en temps réel.

Lors de la mise au point d'une technique de diagnostic, il est nécessaire d'effectuer un ensemble de tests assurant la fiabilité de cette technique. Les contrôles utilisés lors de la mise au point de la PCR AdV quantitative doivent être repris et augmentés de ceux inhérents au multiplexage.

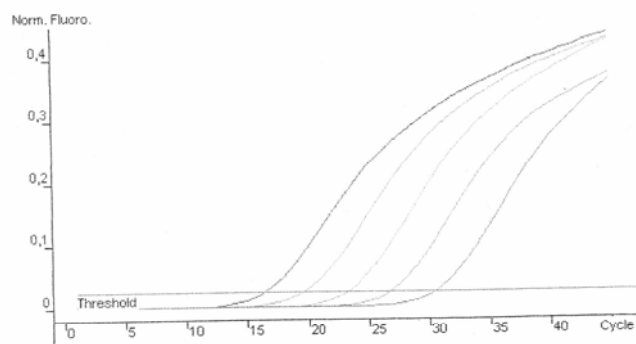
Concernant le domaine de linéarité dans lequel l'analyse doit être effectuée, il est nécessaire de tester ce paramètre pour l'ensemble des groupes adénoviraux testés. Pour l'instant, des dilutions de plasmide contenant la région hexonique d'AdV du groupe C ont pu mettre en évidence un domaine de linéarité pour 5 dilutions logarithmiques de ce plasmide (Cf figure XIV)

Quantitation Report

Experiment Information

Experiment Name	CMV HSV VZV adv 0812
Experiment Start	08/12/2004 11:38:03
Experiment Finish	08/12/2004 13:40:07
Operator	bernard
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 5.0.60
Gain FAM/Sybr	5
Gain Cy5	8
Gain VIC	8
Experiment Signature	The Experiment Signature is valid.

Quantitation data for Cycling A.FAM/Sybr



No.	Colour	Name	Type	Given Conc. (Copies)	Calculated Conc. (Copies)	% Variation	Ct	Ct Std. Dev.
G4		adv c - 2	Sample				16,58	
G5		adv c - 3	Sample				19,77	
G6		adv c - 4	Sample				23,37	
G7		adv c - 5	Sample				26,92	
G8		adv c - 6	Sample				30,63	

This report generated by Rotor-Gene Real-Time Analysis Software
(C)Corbett Research 2000
(R)All Rights Reserved

file://C:\Documents and Settings\Administrator\Local Settings\Temp\TYPO533\doc.html 08/12/2004

Figure XVI Etude du domaine de linéarité de la technique de PCR multiplexe Temps Réel à l'aide de dilutions logarithmiques de surnageants cellulaires après infection par un adénovirus du groupe C

Il a également été nécessaire de rechercher l'absence de réaction croisée dans la détection des différents groupes d'AdV. Cette étape a été réalisée sans qu'il y ait eu besoin de remettre en cause le choix des amorces et des sondes utilisées pour le multiplexage.

De même, la PCR adénovirus en temps réel a du être évaluée pour sa sélectivité, c'est-à-dire pour sa capacité à amplifier des génomes adénoviraux et non pas le génome d'autres types de virus pathogènes. Pour vérifier cette sélectivité, la PCR a été mise en œuvre en présence d'autres types de virus (CMV, HSV, VZV, rotavirus...). Lors des premiers résultats, il n'apparaissait pas de réaction croisée avec d'autres espèces virales.

Enfin, pour venir confirmer les informations apportées par cette nouvelle technique PCR, différentes analyses regroupées sous le terme d'étapes post PCR peuvent être effectuées

3.2.5 Etapes post PCR

Dans le cadre de PCR « classiques », des étapes post PCR sont toujours nécessaires. En effet, la mise en évidence d'un fragment d'ADN (ou amplicon) de la taille attendue signe la présence de la séquence d'intérêt au sein de l'échantillon étudié.

3.2.5.1 Mesure du poids moléculaire du fragment amplifié

Pour contrôler la taille du fragment d'ADN amplifié, celui-ci est déposé sur un gel d'agarose où un champ électrique permet sa migration en fonction de son poids moléculaire. Un agent intercalant permet alors de visualiser sous ultra violets le niveau de migration du fragment. Un marqueur de taille subissant le même champ électrique permet ensuite de déterminer la taille de l'amplicon.

3.2.5.2 Contrôles de la séquence d'ADN du fragment amplifié

La digestion enzymatique est un outil permettant d'affirmer la présence de l'ADN viral d'intérêt au sein de l'échantillon analysé. L'utilisation d'enzymes de restriction met alors en évidence des séquences spécifiques du groupe adénoviral amplifié.

Le séquençage, technique maintenant entièrement automatisée, permet de déterminer de façon encore plus précise l'enchaînement des paires de base d'un fragment d'ADN. Son utilisation sera évoquée dans la partie perspectives de cette étude. Voici cependant ici brièvement exposé son principe, historiquement décrit sous le nom de méthode de Sanger.

Il s'agit d'une amplification PCR, au cours de laquelle on ajoute au mélange réactionnel habituel des didéoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par un fluorochrome. La polymérase synthétise l'ADN en utilisant, au hasard, soit les déoxynucléotides, soit les didéoxynucléotides. Chaque fois qu'un didéoxynucléotide est incorporé dans la chaîne d'ADN, l'élongation de la chaîne s'arrête, car ces molécules ne permettent pas la liaison phospho-diester suivante. La réaction de séquence aboutit donc à la fabrication de fragments d'ADN de toutes les tailles possibles (par exemple, pour un fragment d'ADN recopié de 200 nucléotides, de 1 à 200). Les séquenceurs « automatiques » permettent la détection automatique du fluorochrome sur ces fragments d'ADN, par électrophorèse. Celle-ci est réalisée soit en gel vertical d'acrylamide, soit dans des capillaires de silice remplis de polymère.

La lecture de l'ensemble des fragments d'ADN synthétisés et marqués permet d'obtenir l'enchaînement précis du fragment étudié. Par superposition avec des banques d'ADN de ce fragment, il est alors possible de déterminer la souche virale dont est issu le fragment d'ADN.

3.3 Conditions pour la mise en place d'une technique de PCR en temps réel

Plusieurs publications ont utilisé la technique de PCR en vue de dépister et de typer des AdV potentiellement présents au sein d'échantillons biologiques. Parmi ces différents travaux, peu utilisent encore une technique de PCR multiplexe en temps réel. Une publication a alors retenu notre attention, il s'agit de celle publiée par Leruez ville et al. (Ref 39)

3.3.1 Etude de la publication de Leruez ville et al.

En typant les AdV. des groupes A, B et C, les auteurs de cette étude ont pu établir l'évolution de la maladie adénovirale chez 8 patients greffés et également évaluer l'efficacité d'un traitement par CIDOFOVIR.

3.3.1.1 Méthodologie

Pendant sept mois, différents échantillons biologiques ont été prélevés sur 44 patients présentant des symptômes compatibles avec une infection adénovirale. Différents échantillons biologiques (plasma, urines, lavages broncho-alvéolaires, aspirations naso-pharyngées et salive) ont été prélevés et ont été analysés par les techniques de PCR temps réel, d'immunofluorescence, de séroneutralisation et de culture. L'ADN du sérum des patients a été extrait sur colonne (kit d'extraction d'ADN du sang QIAGEN) avant d'être analysé par PCR.

Le choix des séquences à amplifier par la technique de PCR s'est porté sur la région hexonique du génome adénoviral qui, comme nous l'avons vu, est bien conservée entre les différents groupes d'AdV. Il était ensuite nécessaire de choisir des amorces spécifiques d'un groupe et capables d'amplifier la région hexonique de l'ensemble des sérotypes de ce groupe. Pour cela, un alignement des séquences hexoniques des différents AdV connus a été réalisé sur le logiciel clustalW.

L'utilisation de sondes MGB (capables de se fixer sur le sillon majeur de l'ADN) spécifiques de chaque séquence amplifiée a ensuite permis de mettre en évidence les groupes d'AdV présents au sein des différents échantillons biologiques.

La technique a ensuite été validée par l'utilisation d'un standard externe constitué par trois plasmides de concentration connue portant chacun la région hexonique d'un des groupes d'AdV testés. Des dilutions en série de chaque plasmide ont alors permis d'établir une courbe standard et de fixer le domaine de linéarité de (10^5 à 10 copies par puit) dans lequel pouvait s'effectuer l'analyse PCR.

3.3.1.2 Analyse des résultats

Parmi les 8 patients pour lesquels une infection adénovirale a pu être mise en évidence, 7 étaient infectés par un ADV du groupe C et un par un ADV du groupe A. Pour ces 8 patients, la première analyse PCR adénovirus positive s'étalait de 18 à 300 jours post-greffe.

Sur 8 patients ayant reçu des injections de CIDOFOVIR (5 mg/kg tous les 10 ou 15 jours), 3 sont décédés. La mesure de la virémie par PCR a été effectuée entre 3 et 10 jours après traitement par CIDOFOVIR. Sur les 5 patients ayant survécu, l'AdV n'était plus détectable dans le sang après une durée moyenne de 92 jours.

Même si le nombre de malades infectés par l'AdV inclus dans cette étude ne permet pas de tirer de conclusions de façon statistique, il apparaît que la diminution de la charge virale sanguine (due au traitement par CIDOFOVIR ?) était liée à la survie des patients. Il semble donc que la quantification de la charge virale a permis dans cette étude d'établir un pronostic vital pour les patients traités par CIDOFOVIR.

La quantification de la charge virale apparaît, d'après cette étude, essentielle dans l'évaluation de l'efficacité des thérapies antivirales. Il semble cependant que la virémie absolue ne soit pas forcément un facteur de gravité puisque dans cette étude, le patient avec la charge la plus importante a survécu. C'est en fait l'évolution du nombre de copies d'ADN qu'il est important de rechercher. C'est pourquoi il a été choisi de développer au laboratoire de virologie une technique de quantification relative de la charge virale par PCR.

3.3.2 Développement de la PCR AdV quantitative et multiplexe au laboratoire de virologie de Nantes

3.3.2.1 Mise au point

C'est à partir des travaux de Leruez ville et al. que s'est développée la PCR multiplexe temps réel au laboratoire de virologie de Nantes. Cependant, plusieurs évolutions et mises au point importantes ont du être apportées à la technique proposée par cette équipe..

Une des améliorations désirée était l'élargissement du nombre de groupes adénoviraux potentiellement détectables. En permettant la détection des ADV des groupes A, B, C, D et F, il pourra alors être possible d'identifier la plupart des adénovirus pathogènes pour l'Homme (Cf. [partie 2.2.](#)). Ainsi, dès les premières heures après le prélèvement sur un individu potentiellement infecté, il sera possible d'obtenir des informations sur la nature du virus pathogène.

Cependant, cet objectif de typage apporte de nouvelles contraintes. En effet, il est nécessaire d'apporter dans le milieu de réaction du puit de PCR non plus trois mais cinq couples d'amorces différents. De ce fait, le « design » des amorces se complique car chaque couple d'amorce doit être consensus du génome de l'ensemble des AdV du groupe sans pour autant inférer avec la séquence d'ADN d'un AdV d'un autre groupe. Les différentes étapes de validation sont évoquées dans la partie dédiée à la PCR quantitative et à la PCR multiplexe.

Un autre point important était le choix des conditions de réaction dans lesquelles doit s'effectuer la PCR. Leruez ville et al. avaient réalisé leurs travaux sur un thermocycler

différent de celui utilisé au laboratoire de virologie. Ce sont alors des conditions développées pour une PCR adénovirus temps réel non sélective des différents groupes d'Adv qui ont été retenues. (Cf figure XII)

Une fois les premières étapes de validation de la technique de PCR multiplexe quantitative effectuées, il a été possible de quantifier et de typer une infection adénovirale pour deux patients suivis dans le service d'hématologie.

3.3.2.2 Premières utilisations cliniques de la PCR adénovirale consensus au CHU de Nantes

La technique de PCR adénovirale a été utilisée sur des échantillons sanguins provenant de deux patients greffés de moelle. Elle a permis à la fois de typer le groupe d'AdV incriminé et de quantifier l'évolution de la charge virale dans le sang de ces deux patients.

3.3.2.2.1 Historique de deux patients suivis au CHU de Nantes et décédés de maladie adénovirale

Il est ici important pour bien interpréter les différents résultats de la technique PCR de revenir sur l'évolution de la maladie pour les deux patients atteints de maladie adénovirale.

Cas n°1

Le premier cas clinique concerne Mr AUD suivi dans le service d'hématologie pour une allogreffe de moelle suite à une LAM en première rémission complète. L'allogreffe avait alors été réalisée le 17 Juillet 2003. Une GvH cutanée de grade 2 était ensuite apparue 21 jours après la greffe.

En juin 2004, cette GvH était maîtrisée par l'utilisation de CORTANCYL et de CELLCEPT. De plus, le patient présentait une altération intrinsèque des fonctions immunes avec une hypogammaglobulinémie décelée à 1.3g/l à J285 post greffe et un taux de cellules CD4 à 32 par mm³ à J 243.

C'est donc dans ce contexte que Mr AUD est hospitalisé le 19 Octobre 2004 en médecine interne pour la prise en charge d'un syndrome fébrile. Le patient décrit alors l'apparition 2 jours auparavant d'une fièvre à 39°C, accompagnée de sueurs et d'altérations de l'état général. Le patient décrit également une dyspnée développée au moindre effort.

L'examen clinique montre alors une toux ramenant quelques crachats, associée à une diminution du murmure vésiculaire en base droite. Il n'y a cependant pas de douleur thoracique. Sur le plan urinaire, la palpation des fosses lombaires est indolore.

Du point de vue biologique, le patient présente

- Une aggravation de l'insuffisance rénale chronique (urée 17.1 mmol/L, créatinine 230µmol/L et TP à 57%)
- Une leucopénie et une thrombopénie (respectivement 2690 et 99000/mm³)

- Un syndrome inflammatoire (fibrinogène à 8.7 g/L)
- Un bilan hépatique perturbé (TGO x20, TGP x12, γ GT x40, rapport bilirubine totale sur conjuguée à 38/18)
- Une hypoalbuminémie associée à une hyper α 1globulinémie
- Un ECBU et des hémocultures bactériennes stériles, la recherche d'antigènes aspergillaires et viraux restant négative

Sur le plan de l'imagerie, la radio et la scintigraphie sont normales, seule une tomodensitométrie thoraco-abdominale sans I.V. montre une adénopathie latéro-cave supérieure droite de 15 mm associée à une masse médiastinale latéro-aortique droite homogène de 35mm et un nodule solitaire de 13 mm au niveau du lobe moyen.

Le patient est alors mis sous antibiothérapie probabiliste (AXEPIM-CIFLOX). Une tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne montre la disparition de l'image aspergillaire de base droite et l'apparition d'une nouvelle image nodulaire de 18mm au niveau du lobe moyen.

Le 21, après ajout au traitement antibactérien d'un traitement antifongique constitué par AMBISONE et TARGOCID, le patient reste toujours fébrile sans pour autant présenter de point d'appel clinique.

Le patient développe dans l'après midi un état confusionnel suivi dans la soirée d'une défaillance hémodynamique avec hypotension résistant au remplissage vasculaire.

Mr AUD est ensuite transféré en réanimation où il décèdera de défaillance multiviscérale due au choc réfractaire associé aux troubles de coagulation.

Un lavage broncho-alvéolaire réalisé en début d'hospitalisation incrimine un adénovirus comme étant responsable des signes pulmonaires. Une biopsie hépatique post-mortem a pu également mettre en évidence un aspect histologique compatible avec une hépatite nécrotique fulminante .

On retiendra de ce cas d'une part la rapidité des complications liées à l'infection adénovirale et d'autre part la localisation principale des sites infectieux : pulmonaires et hépatiques.

La brutalité de la maladie peut directement être reliée aux facteurs de risque suivant :

- Existence d'une hémopathie maligne (LAM) traitée par allogreffe de moelle
- Présence d'une GvH maîtrisée par l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur (CORTANCYL et CELLCEPT).
- Persistance d'une déficience immune touchant à la fois les fonctions humorales et cellulaires

Le second patient présente également des facteurs de risque.

Cas n°2

Le second patient (Mr LAC) pour lequel un adénovirus a été diagnostiqué au CHU de Nantes est lui aussi décédé de maladie adénovirale.

Ce patient avait comme antécédent un lymphome de bas grade diagnostiqué en août 98. La mise en œuvre de deux protocoles de chimiothérapies (COPADEM et CIVE), la maladie évolue en lymphome de haut grade en Octobre 2003. Mr LAC bénéficie alors d'une allogreffe intrafamiliale avec conditionnement en Juillet 2004.

Cette greffe est alors suivie d'une GvH cutanée modérée stabilisée sous CELLCEPT et CORTANCYL 20 mg. Plusieurs épisodes infectieux ont ensuite été diagnostiqués dont une infection par CMV traitée par ROVALCYTE.

Le 12 Novembre 2004, Mr LAC est hospitalisé pour un syndrome fébrile en aplasie non résolutif sous antibiotiques. (CIFLOX et ORELOX). La clinique montre une asthénie associée à une hypotension (8,5\5) sans point d'appel infectieux. Du point de vue biologique, le patient montre une aggravation de la pancytopenie liée à l'allogreffe. Un scanner thoracique ainsi qu'une fibroscopie pulmonaire réalisés suite à l'apparition d'une toux grasse sont normaux.

Le patient présente ensuite une évolution clinique rapide avec en association à des pics fébriles (à 39°C) , des frissons et des marbrures. On notera également l'apparition de saignements extériorisés associés à une cytolyse hépatique où les transaminases représentent plus de 100 fois la valeur normale.

Devant la résistance de l'infection antibiotiques renforcés par TARGOCID et CANDIDAS, une infection virale est évoquée.

Un adénovirus est ensuite mis en évidence dans les selles du patient et une biopsie hépatique montre la présence d'un ECP sur hépatocytes. De plus une hémophagocytose visible sur hémogramme permet d'expliquer la pancytopenie.

Malgré la remontée des différentes lignées de par l'utilisation de TEGELINE et l'administration de CIDOFOVIR, la cytolyse hépatique se poursuit.

Le 18 novembre, une défaillance respiratoire entraîne le transfert en réanimation du patient.

Mr LAC décédera en réanimation médicale le 18 novembre, le diagnostic retenu sera celui d'une défaillance poly-viscérale dans le cadre d'une réactivation à adénovirus.

De même que pour le premier patient, Mr Lac décède complications dont les points d'appel cliniques sont principalement ceux d'un syndrome infectieux (fièvre à 39°C) liés à une atteinte pulmonaire peu spécifique d'une infection adénovirale (toux grasse) et d'une défaillance hépatique (cytolyse et pancytopenie).

Mr LAC présente au même titre que Mr AUD des facteurs de risque liés aux conséquences de l'hémopathie :

- Persistance d'une déficience immune de l'ensemble des lignées hémathologiques
- Allogreffe (bien que intrafamiliale) en traitement du lymphome de haut grade

- Traitement immunosuppresseur (CELLCEPT et CORTANCYL 20 mg) lié à l'apparition d'une GvH cutanée

Synhèse des deux cas

Il apparaît à travers ces deux cas la difficulté à diagnostiquer une infection adénovirale. On voit ici que face aux premiers signes cliniques, une atteinte bactérienne est dans un premier temps évoquée (mise sous antibiothérapie probabiliste). Devant la persistance des signes, l'utilisation d'une thérapie antifongique (suspicion d'une aspergillose) est dans un deuxième temps associée au traitement antibiotique.

Nous avons vu dans la partie V concernant les différentes stratégies de traitement que plusieurs auteurs reconnaissaient que le délai de mise en œuvre était un point important pour la survie des patients. De ce fait, le choix d'une technique de diagnostic rapide est alors essentielle afin de mettre le plus rapidement en œuvre une thérapeutique adaptée.

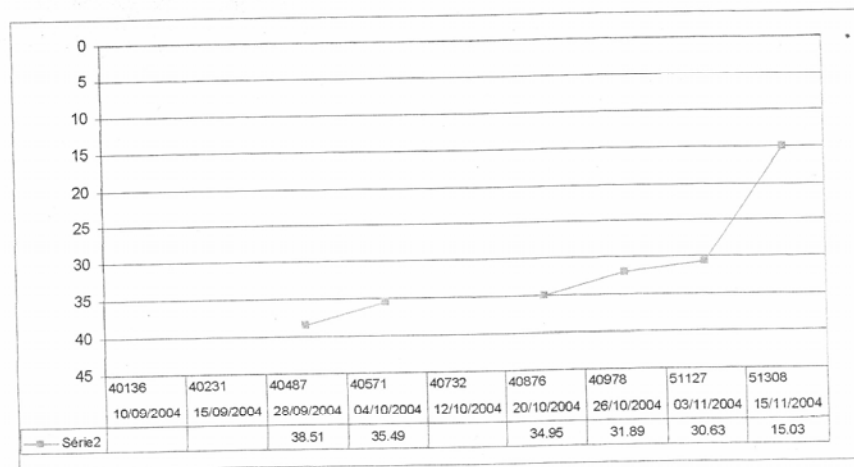
3.3.2.2 Evaluation rétrospective de la virémie adénovirale par la technique multiplexe en temps réel pour ces deux patients

Il a été possible de rechercher sur des échantillons sanguins obtenus à partir des deux cas cliniques évoqués ci-dessus la présence d'AdV par la technique de PCR multiplexe en temps réel.

On voit sur les deux graphiques de la figure XV que l'expression du Ct pour les différentes dates de prélèvement. Comme nous l'avons vu dans la partie 7.3, plus le Ct apparaît faible, plus la quantité d'ADN mise en évidence est importante.

Aux dates correspondant à l'hospitalisation (respectivement le 12/11 pour Mr LAC et le 19/10 pour AUD), on voit bien apparaître pour les deux patients une diminution importante du Ct qui est corrélée à l'apparition de signes cliniques infectieux. Par rapport aux analyses précédentes où les valeurs du Ct se trouvaient autour de la ligne de base, il est alors possible d'affirmer que les deux patients sont bien atteints de maladie adénovirale, et plus particulièrement par un sérotype de groupe C (résultat non présenté).

Mr AUD.



Mr LAC.

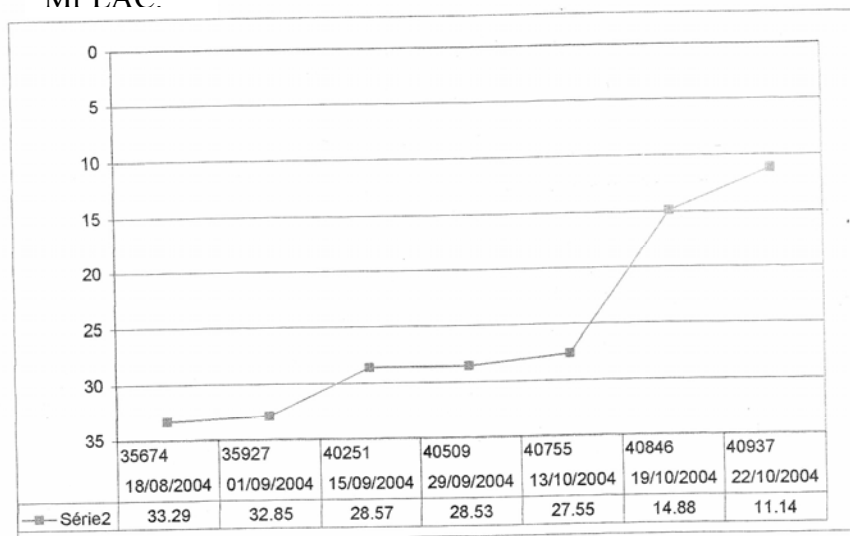


Figure XV : Résultat de l'analyse par la technique de PCR Multiplexe Temps Réel d'extractions de sérums prélevés à différents temps de l'infection adénovirale pour Mr AUD. et Mr LAC

Il se pose cependant la question de savoir si la technique de diagnostic par PCR est suffisamment sensible pour permettre la mise en œuvre d'un traitement antiviral préemptif. En effet, on remarque plus d'un mois avant l'hospitalisation une légère diminution du Ct pour les deux patients (Evolution de 33 à 28 pour Mr AUD et de 38 à 31 pour Mr LAC).

Lors de la mise au point du domaine de linéarité, il avait été possible de descendre à des Ct autour de 30, et ce pour des AdV du groupe C. Cependant, ces analyses ont été réalisées dans des conditions idéales sur des plasmides issus de milieu de culture. On peut donc se demander si, sur du matériel génétique issu de matrices biologiques, on peut obtenir une sensibilité aussi élevée. Se pose alors la question de savoir si la PCR développée permet la mise en œuvre éventuelle d'un traitement préemptif.

Les perspectives concernant la PCR présentée dans cette étude sont discutées au sein de la partie de conclusion

3.4 Perspectives de développement de la PCR multiplexe temps réel

Afin d'améliorer le pronostic et la prise en charge des patients greffés de moelle et atteints d'infections adénovirales, il est possible d'améliorer l'outil PCR qui a été développé au laboratoire de virologie de Nantes.

Il apparaît que la technique de PCR mise en œuvre répond à ses objectifs, c'est-à-dire effectuer un diagnostic rapide de la maladie adénovirale et typer les groupes d'AdV pathogènes. Cependant, plusieurs points de discussion persistent.

3.4.1 Elargissement de l'utilisation de la PCR multiplexe temps réel

Nous avons vu qu'il était possible de détecter dans le sang une infection par AdV et que, dans les cas cliniques évoqués, cette infection était corrélée à une maladie adénovirale. En analysant régulièrement des prélèvements sanguins chez les patients présentant des facteurs de risque, il apparaît possible de détecter de façon précoce une infection.

Dans la même optique, il pourrait être envisageable de rechercher la présence d'AdV au sein d'autres fluides biologiques que le sang (comme les urines ou des lavages broncho pulmonaires). Comme nous avons observé dans la partie I, certains sérotypes adénoviraux ont un tropisme particulier pour certains organes, en particulier pour la sphère ORL ou pulmonaire. Il serait donc intéressant de pouvoir adapter la technique de PCR multiplexe temps réel sur ces différents échantillons. Une mise au point spécifique sur chaque type d'échantillon serait alors nécessaire.

Bien que dans ce cas la quantification ne serait pas le point d'intérêt primordial, le groupage et surtout la précocité du dépistage permettraient d'envisager la thérapie la plus adaptée.

3.4.2 Sensibilité de la technique et rapidité de la mise en œuvre de moyens thérapeutiques

Nous avons vu qu'une quantification relative entre deux échantillons biologiques était suffisante pour poser le diagnostic d'infection adénovirale. On peut cependant s'interroger sur les limites d'une telle approche.

En effet, pour les deux cas cliniques évoqués, le délai entre hospitalisation et le décès des patients a été de 4 et 6 jours. Nous avons vu au cours de l'étude rétrospective de la virémie pour ces deux patients que l'augmentation brutale de la virémie était corrélée à l'apparition de symptômes infectieux. On pourra alors se demander quel sera le pronostic des patients pris en charge dès les premiers symptômes de la maladie adénovirale, c'est-à-dire dans la cadre de la mise en œuvre d'un traitement curatif associé à une virémie très élevée.

On peut également se demander si la mise en œuvre d'un traitement préemptif lié à un diagnostic effectué avant l'apparition des symptômes aura un réel impact clinique.

Pour répondre à cette question, il est important d'améliorer la sensibilité de détection. Dans cette optique, il apparaît alors possible d'associer un standard externe à la technique de PCR. En effet, la quantification d'un gène rapporteur endogène permettra d'effectuer une quantification plus sensible lors de la comparaison d'échantillons biologiques prélevés à des temps différents. Comme nous avons vu que l'ADN adénoviral était physiologiquement absent du sang d'un individu sain, un abaissement du seuil de détection pourra très certainement permettre un diagnostic d'infection adénovirale avant l'apparition des symptômes.

La panacée en matière de sensibilité consisterait à obtenir pour chaque groupe viral une séquence plasmidique de quantité connue. L'ajout de cette gamme comme étalon interne directement au sein de l'échantillon biologique autoriserait la détermination en parallèle d'un titre infectieux et du domaine de linéarité de l'analyse pour un échantillon donné.

L'amélioration de la sensibilité permettra également de choisir le traitement le plus adapté.

3.4.3 Utilisation de la PCR AdV dans le suivi et la mise en œuvre des thérapeutiques antivirales

Un autre avantage lié à une amélioration de la sensibilité résidera dans la possibilité de suivre de façon plus fine l'impact d'un traitement antiviral. En effet, la visualisation non seulement de la diminution de la charge virale sanguine, mais également de la disparition du virus dans le sang signera l'efficacité d'une thérapeutique.

Le suivi de la virémie pourra alors permettre de mieux élaborer les protocoles antiviraux en fonction de l'évolution de la virémie (dose, fréquence et molécule utilisée)

Il a été évoqué que certains antiviraux présentaient une efficacité variable in vitro en fonction du groupe adénoviral pour lequel ils étaient utilisés. En effet, Morphin et al. (Ref 40) ont montré une plus grande sensibilité du groupe C à la RIBAVIRINE (mais pas pour le CIDOFOVIR).

Il pourrait alors être possible à long terme d'établir un pronostic clinique en fonction du groupe ou du sérotype incriminé face au traitement mis en œuvre. La fiabilité du groupage serait alors indispensable

3.4.4 Spécificité et sélectivité pour l'ensemble des sérotypes adénoviraux détectables

Une autre question qui se pose concernant les possibilités de détection des différentes souches adénovirales réside dans le potentiel de discrimination d'un sérotype par rapport à un autre. Nous avons vu que l'utilisation de banques de données concernant l'ADN viral permettait de typer spécifiquement les AdV inclus dans un groupe.

Cependant, face à une plasticité biologique importante du matériel génétique viral, on peut se demander si des phénomènes de mutation ou d'évolution de l'ADN viral ne peuvent pas fausser le typage.

Il apparaît cependant que les phénomènes de mutation sont aléatoires et ne concernent qu'une faible proportion de l'ensemble des virus potentiellement présents dans le sang d'un patient. La superposition au groupage d'une analyse quantitative permet en fait de pondérer ces phénomènes de plasticité en identifiant l'ADN du groupe présent majoritairement au sein de l'échantillon.

3.4.5 Utilisation de la PCR AdV dans l'affinement des connaissances épidémiologiques

Il apparaît qu'un typage systématique des infections adénovirales iatrogènes permettra de mieux comprendre les causes de survenue des infections.

Il sera alors possible de mettre en évidence des épidémies ou tout du moins des infections de patient à patient et donc de mettre en œuvre les mesures les plus adaptées (utilisation de détergents adaptés, isolation des patients infectés...).

Des informations pourront aussi être apportées quand au risque de transmission d'AdV du greffon vers l'hôte en recherchant la présence d'AdV potentiellement présents au sein de la greffe.

Il pourrait également être possible d'évaluer pour un groupe ou un sérotype donné un pronostic pour le patient atteint. En effet, il pourrait être possible de relier pour une infection par un sérotype donné la gravité en fonction des facteurs de risque du patient.

Comme nous avons vu que certains sérotypes avaient un tropisme tissulaire particulier, il pourrait alors être possible d'utiliser des antiviraux aux formes galéniques adaptés au type d'organe touché (aérosols en particulier).

Nous verrons par la suite que la détermination de la prévalence des infections par un groupe ou un sérotype donné pourra permettre d'élaborer des traitements spécifiques

4 Conclusion

Nous avons vu que la technique de PCR décrite au cours de cette étude permettait, à travers deux cas cliniques, de quantifier la virémie adénovirale. La PCR quantitative multiplexe a également pu effectuer le groupage des virus pathogènes pour les deux patients (virus du groupe C).

Il semble maintenant intéressant d'élargir l'utilisation de cette PCR en augmentant le nombre de malades pour lesquels l'infection peut être diagnostiquée. La réalisation de nouvelles analyses pourra nous renseigner sur différentes caractéristiques de la PCR, comme la fiabilité du groupage pour la détection des différents sérotypes adénoviraux pathogènes pour le patient immunodéprimé.

Parallèlement, il sera important que cette nouvelle technique soit développée dans le suivi des patients à risque afin de dépister une infection par l'AdV. En effet, seule la réalisation d'analyses sur des échantillons prélevés avant l'apparition de symptômes cliniques pourra permettre la mise en œuvre de traitements préemptifs. De ce fait, l'utilisation de la technique de PCR quantitative multiplexe permettra de réaliser des essais cliniques en partenariat avec le service d'hématologie du CHU de Nantes. Il sera de ce fait possible de mieux appréhender l'efficacité des différents traitements antiviraux.

Cependant, pour effectuer un dépistage efficace de l'infection adénovirale, il reste encore à améliorer la sensibilité de la PCR quantitative multiplexe. Pour cela, nous avons vu qu'il était possible d'utiliser, de façon concomitante à l'analyse des échantillons biologiques, des étalons internes (gène rapporteur) et des étalons externes (gamme de plasmide comportant la région hexonique adénovirale). Seule une amélioration de la sensibilité de la technique de PCR pourra permettre de détecter l'apparition d'une infection par l'AdV préalablement à l'apparition des signes cliniques souvent responsables d'une mortalité importante.

Il sera également possible en recherchant dans d'autres types d'échantillons biologiques que le sang de mettre en évidence une infection adénovirale localisée (sur un lavage broncho-alvéolaire ou sur des selles) ou une infection invasive (sur des urines). Comme une quantification n'est pas toujours réalisable sur ces échantillons, une technique de diagnostic par PCR non quantitative pourrait dans un premier temps être utilisée. Une fois l'infection adénovirale avérée sur ce type d'échantillons, la PCR quantitative multiplexe serait mise en œuvre en vue de la détection d'une infection disséminée. De la mise en évidence de la virémie et du groupage adénoviral découlerait alors la mise en œuvre d'une thérapeutique spécifique.

Nous avons au cours de cette étude défini les différents facteurs de risque de l'infection adénovirale chez les patients greffés de moelle. L'utilisation d'un traitement conditionnant et immunosuppresseur lourd en prévention du rejet de greffe ou d'une réaction du greffon contre l'hôte était le premier point avéré. L'âge du malade, l'absence de mémoire immunitaire ou une déficience immunitaire liée de façon directe ou indirecte à la maladie reste un second facteur parfois difficile à évaluer.

Il semble en fait que le risque infectieux soit relié aux différentes contraintes du clinicien : la réalisation d'un difficile équilibre entre d'une part la prévention des risques de rejet et risques de GvH par l'utilisation de traitements immunosuppresseurs et d'autre part l'apport d'un effet

GvL et le maintien d'une fonction immune efficace contre les différents pathogènes opportunistes.

D'une façon générale, il apparaît important d'évoquer pour ces patients à risque une infection adénovirale dès l'apparition des signes cliniques potentiellement associés à cette infection (fièvre, altération de l'état général...). Pour cela, la technique de PCR décrite dans cette étude permet d'orienter en quelques heures le clinicien vers l'étiologie infectieuse incriminée.

Nous avons évoqués au cours de cette étude les espoirs fondés sur la mise en œuvre d'un traitement adénoviral préemptif. Il apparaît alors possible de mettre cette stratégie de traitement en œuvre grâce à la technique de PCR quantitative multiplexe. L'identification des malades à risque nous permet de rechercher régulièrement pour ceux-ci l'apparition d'une infection adénovirale localisée ou invasive. Une fois le diagnostic d'infection adénovirale disséminé effectué par la technique de PCR quantitative multiplexe, le traitement préemptif peut être réalisé avec les meilleures chances de réussite.

Bien que le choix des patients à suivre et la fréquence de ce suivi par la technique de PCR reste à déterminer (rapport entre coût de l'analyse et bénéfice attendu), la gravité de la maladie adénovirale a rendu le développement de cette technique de PCR indispensable. Elle devra alors permettre de mieux connaître la maladie et les patients à risque, mais également être un outil efficace pour le clinicien dans l'élaboration de son diagnostic et la mise en œuvre d'une thérapeutique efficace.

5 Bibliographie

- 1 Chakrabarti et al., Adenovirus infection in stem cell transplant recipient : recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis and management; Leukemia and lymphoma ; 2004; 45.
- 2 Brown et al. ; Structure and composition of the adenovirus type 2 core ; Journal of Virology ; 1975: 16.
- 3 Collège de bactério-virologie, Université Claude Bernard, LYON, fiche disponible en ligne : (<http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/bacterio-viro/>)
- 4 Rowe et al; Isolation of a cythopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. PSEBM 1953:17.
- 5 Davison et al. ; Genetic content and evolution of adenoviruses; Journal of General Virology; 2003:84 :
- 6 Fry et al. ; Carte représentative du génome adénoviral ; Expert Review in Molecular Medicine; 1999 : 99.
- 7 Richard J. Roberts et Phillip A. Sharp ; press release sur www.nobelprize.org/medicine/laureates/1993.
- 8 Echavarria et al.; Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR; Lancet; 2001:358.
- 9 Chanock RM; Impact of adenovirus in human disease; Preventive Medicine; 1974.
- 10 Huraux et al. ; Traité de virologie médicale ; éditions ESTEM.
- 11 Echavarria et al. ; Rapid detection of adenovirus in throat swab specimens by PCR during respiratory disease outbreaks among military recruits. Journal of Clinical Microbiology; 2003 :41.
- 12 Raleigh et al. ; Second edition in transplant infection, éditions Lippincott Williams et Wilkins.
- 13 Schéma de l'hématopoïèse disponible sur www.csfedumed.unige.ch.
- 14 J Daucet J ; The major histocompatibility in man ; Science, 1981: 4515
- 15 J. F. Bach: Immunologie ; troisième édition ; Medecine Science-Flammarion éditeurs
- 16 Odom et al.; remission of relapsed leukaemia during a graft versus host reaction: a graft versus man reaction in man?; Lancet 1978: 8089.
- 17 Flomenberg et al.; Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients Journal of Infectious Disease; 1994:169.

- 18 Smith et al.; Extensive cross reactivity of adenovirus specific cytotoxic T cells; Human Gene Therapy; 1998:9.
- 19 Shpall et al.; American society for blood and marrow transplantation guidelines for training; Biological Blood and Marrow transplantation; 2001
- 21 Shields et al.; Adenovirus infections in patients undergoing bone marrow transplantation; New Eng. Jour. Med.; 1985:312.
- 22 Baldwin et al.; Outcome and clinical course of 100 patients with adenovirus infection following bone marrow transplantation; Bone. Marrow. Transplantation.; 2000:26.
- 23 Blanke et al.; Evolving pathogens in allogeneic bone marrow transplantation: increased fatal adenovirus infections; American journal of medicine; 1995:99.
- 24 Howard et al.; Adenovirus in haematopoietic stem cell transplant recipient; Clinical Infectious Disease; 1999: 29
- 25 LaRosa et al. ; Adenovirus infection in adult recipients of blood and marrow transplants Clinical Infectious Disease; 2001:32.
- 26 La Rosa et al. ; Adenovirus infection in adult recipients of blood and marrow transplants Clin. Inf. Disease.; 2001:32
- 27 Chakrabarti et al.; Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery; Blood; 2002:100.
- 28 Lion et al.; Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease; Blood; 2003:102.
- 29 Lankester et al.; Adenovirus infection in pediatric haematopoietic stem cell transplant recipients: feasibility of adoptive cellular immunotherapy; Bone marrow transplant; 2003:31.
- 30 Hoffmann et al.; Adenoviral infection and a prospective trial of cidofovir in pediatric haematopoietic stem cell transplant; Biological Bone Marrow Transplantation; 2001:7.
- 31 www.biam.fr
- 32 Bordigoni et al.; Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; Clinical Infectious. Disease; 2001 :32
- 33 Hale et al.; Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation; Bone marrow transplant ;1999:23.
- 34 Miyamura et al.; Successful ribavirin therapy for severe adenovirus hemorrhagic cystitis after allogeneic marrow transplant from close HLA donors rather than distant donors; Bone marrow transplant; 2001:25.

- 35 Samarasinghe et al.; Adenovirus infection during bone marrow transplantation; Royal college of paediatrics and child Health; sixth spring meeting; york, UK; 2001
- 36 Ljungmann et al.; Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the infectious disease working party of the european group for blood and marrow transplantation; Bone Marrow Transplantation; 2003:31.
- 37 Legrand et al.; Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone transplantation in children; Bone Marrow Transplantation; 2001:27.
- 37 Hoffmann et al.; Adenoviral infection and a prospective trial of cidofovir in pediatric haematopoietic stem cell transplant; Biological Bone Marrow Transplantation; 2001:7.
- 38 Hamel et al.; Adenovirally transduced dendritic cells induce bispecific cytotoxic T lymphocyte responses against adenovirus and cytomegalovirus pp65 or against adenovirus EBV EBNA3C protein: a novel approach for immunotherapy Human Gene Therapy 2001:13.
- 39 Leruez ville et al.; real time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection; Clinical Infectious Disease; 2004; 38.
- 40 Morphin et al.; 43rd Interscience conference on microbial therapy, abstract n°488.
- 41 Yoshida et al.; Complete resolution of severe chronic active Epstein-Barr virus infection by cultured, activated donor T lymphocyte infusion after nonmyeloablative stem cells allografting.; Bone Marrow Transplantation; 2003:32.
- 42 Wiesner et al.; Selection of CMV-specific CD8+ and CD4+ T cells by mini-EBV-transformed B cell lines; European Journal of Immunology; 2005:35.
- 43 Images disponibles sur le site www.pediatrics.org

6 Table des figures

Figure I - Organisation des protéines constituant la capsid adénovirale.

Figure II- Arbre phylogénique établi en fonction des variations du gène de l'hexon de la capsid adénovirale.

Figure III- Carte représentative du génome adénoviral.

Figure IV: Cinétique de fixation et d'internalisation cellulaire d'un adénovirus.

Figure V : Schéma de l'hématopoïèse .

Figure VI : Mécanisme cellulaire de présentation du CMH de classe I responsable de la GVHD.

Figure VII Mise en jeu de l'immunité non spécifique .

Figure VIII : Représentation de la structure atomique d'une double hélice d'ADN (unige.ch).

Figure IX : Représentation pour 3 cycles d'amplification des différentes températures nécessaires à l'amplification d'une séquence d'ADN par PCR.

Figure X : Production des amplicons à partir des deux brins d'ADN matrice

Figure XI : Tracé schématique de la courbe d'amplification d'une séquence d'intérêt par PCR quantitative

Figure XII : Protocole d'amplification par PCR en temps réel utilisé au laboratoire de virologie de Nantes permettant la mise en évidence d'AdV sur des extractions de fluides biologiques.

Figure XIII : Schéma vu du dessus et schéma en vue latérale du carrousel et du système optique d'émission et de réception de l'appareil ROTORGENE

Figure XIV Etude du domaine de linéarité de la technique de PCR multiplexe Temps Réel à l'aide de dilutions logarithmiques de surnageants cellulaires après infection par un adénovirus du groupe C

Figure XV : Résultat de l'analyse par la technique de PCR Multiplexe Temps Réel d'extractions de sérums prélevés à différents temps de l'infection adénovirale pour Mr AUD. et Mr LAC

7 Table des tableaux

Tableau I : Classification en groupes et sérotypes des adénovirus.

Tableau II: Différents sérotypes pour différentes pathologies chez le patient immunocompétent.

Tableau III- Différents sérotypes pour différents tropismes tissulaires chez le patient immunodéprimé.

Tableau IV: Etudes rétrospectives de l'infection adénovirale chez des patients greffés de moelle.

Tableau V: Etudes prospectives sur la survenue d'infections adénovirales.

Tableau VI- Pourcentage d'isolation d'adénovirus en fonction du type de greffe de moelle.

Tableau VII: différentes stratégies de traitement préventif des infections opportunistes chez le patient greffé de moelle.

Tableau VIII: Essais cliniques utilisant la RIBAVIRINE chez les patients greffés de moelle.

Tableau IX: Essais cliniques utilisant le CIDOFOVIR chez les patients greffés de moelle.

8 Table des images

Image I : Vue d'un Adénovirus par microscopie électronique(Ebola.com)

Image II : Coupe de tissu bronchique avec inclusions nucléaires basophiles

Image III : Appareil de PCR quantitative ROTORGENE utilisé au laboratoire de virologie du CHU de Nantes

Image IV : Carrousel contenant les puits dans lesquels s'effectue la réaction de PCR

Cariou Yves : Infections à adénovirus chez le sujet greffé de cellules souches hématopoïétique:
Titre de la thèse : Intérêt potentiel du diagnostic moléculaire

Résumé de la thèse :

Une infection adénovirale est le plus souvent bénigne pour un individu issu de la population générale. Pourtant, chez certains patients greffés de moelle, les virus de la famille des *adénoviridae* peuvent générer des complications souvent fatales.

Après avoir défini les différents adénovirus pathogènes ainsi que les pathologies qui leur sont associées, nous essaierons dans cette étude de comprendre les causes de cette susceptibilité. Une fois les facteurs de risque infectieux cernés pour le patient greffé de moelle, nous évoquerons les différentes stratégies thérapeutiques disponibles à ce jour. Parmi celles-ci, les traitements préemptifs, c'est-à-dire réalisés avant l'apparition des signes cliniques spécifiques de l'infection par le virus, nécessitent des outils de diagnostic sensibles

Comme alternative aux techniques de culture cellulaire ou aux techniques immunologiques, le diagnostic moléculaire permet une prise de décision rapide et fiable. A travers l'étude du cas de deux patients greffés de moelle et décédés de maladie adénovirale, nous verrons la mise en œuvre pratique d'une nouvelle technique d'amplification de l'ADN par PCR en temps réel.

Le choix de développer au CHU de Nantes une méthode d'analyse capable à la fois de quantifier et de typer les principaux groupes d'adénovirus, devra permettre, non seulement de faciliter la pratique des cliniciens, mais également d'améliorer les connaissances épidémiologiques concernant les adénovirus pathogènes chez l'homme.

MOTS CLES	ADÉNOVIRUS	GREFFE DE MOELLE
	PCR TEMPS RÉEL	MULTIPLEXAGE

JURY :

Président : Mme S. Billaudel, Professeur de Virologie à la Faculté de Pharmacie de Nantes

Assesseurs : Mme B. M. Imbert, professeur de Virologie à la Faculté de Pharmacie de Nantes et Praticien attaché au CHU de Nantes

Mme M. Coste, Praticien attaché au CHU de Nantes
