

ANNEE 2003

N°71

THESE
pour le
DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Estelle GERBAUD

Présentée et soutenue publiquement le 10 Novembre 2003

Quantification du Cytomégalovirus par la technique
de PCR en temps réel

Président : **Madame Sylvianne BILLAUDEL - Professeur de Virologie**
Directeur de thèse : **Madame Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE - Professeur de Virologie**
Membre du Jury : **Madame Céline BODIN-BRESSOLLETTE - Médecin biologiste**

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à :

Madame le Professeur Berthe-Marie Imbert-Marcille pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans de si bonnes conditions humaines et techniques et pour son aide

Céline et Bernard pour m'avoir guidée tout au long de ce travail, pour leur aide, leurs explications, leur temps et leur gentillesse. Ils ont fait de ce stage une expérience très formatrice et enrichissante à tous points de vue

Madame le Professeur Sylvianne Billaudel pour avoir accepté de présider cette thèse

La petite équipe de la salle des cultures (Thérèse, Olivier et Annie-Claire) qui m'ont appris beaucoup de choses sur le monde de la virologie et pour les bons moments passés ensemble

Toutes les autres personnes du laboratoire pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leurs conseils. Ils ont permis que je me sente à l'aise et que je m'intègre pleinement au sein du laboratoire.

Les « petites » stagiaires et particulièrement Mathilde pour les moments de détente mais aussi pour leur soutien dans les moments de stress

Maman, papa, Clément et le reste de ma famille, pour m'avoir permis de faire ce que j'aime, pour leur soutien et leur amour

Gaëtan, pour tout son amour, sa patience et son aide et pour tous les kilomètres parcourus pour être présent à mes côtés

Toute la petite bande nantaise, Arnaud, Céline, John, Mimie, Nath, Raph et Vincent, pour les petites soirées du jeudi soir et tous les autres moments inoubliables. J'espère que ce travail vous prouvera que je n'ai pas que 2 neurones !

Tous mes autres amis et notamment Dianou, Isa A, Isa G et Marlène avec qui j'ai partagé tous les moments de stress d'une vie d'étudiante, je leur souhaite bon courage.

Sommaire

Abréviations.....	1
Introduction.....	2
A – GENERALITES.....	3
<u>1. Le cytomégalovirus (CMV)</u>	3
<u>1.1. Historique</u>	3
<u>1.2. Structure et réplication</u>	3
<u>1.2.1. Structure du virus</u>	3
<u>1.2.1.1. Le génome</u>	4
<u>1.2.1.2. Le core</u>	5
<u>1.2.1.3. La capside</u>	5
<u>1.2.1.4. Le tégment</u>	5
<u>1.2.1.5. L’enveloppe</u>	5
<u>1.2.2. Le cycle de réplication</u>	5
<u>1.2.2.1. La fixation du virus</u>	6
<u>1.2.2.2. Pénétration du virus</u>	6
<u>1.2.2.3. Synthèse du virion</u>	6
<u>1.2.2.4. Libération du virus</u>	7
<u>1.3. Physiopathogénicité de l’infection à CMV</u>	8
<u>1.3.1. Le tropisme cellulaire</u>	8
<u>1.3.2. Les différents stades de l’infection</u>	9
<u>1.3.2.1. La primo-infection</u>	9
<u>1.3.2.2. La phase de latence</u>	9
<u>1.3.2.3. La réactivation</u>	10
<u>1.3.2.4. La réinfection</u>	10
<u>1.3.2.5. La maladie à CMV</u>	10
<u>1.3.3. La réponse immunitaire</u>	11
<u>1.3.3.1. L’immunité non spécifique</u>	11
<u>1.3.3.2. L’immunité à médiation humorale</u>	12
<u>1.3.3.3. L’immunité à médiation cellulaire</u>	12
<u>1.3.4. Mécanismes d’échappement immunitaire du CMV</u>	12

<u>1.4.</u>	<u>Epidémiologie</u>	13
1.4.1.	<u>La séroprévalence</u>	13
1.4.2.	<u>Les voies de transmission</u>	13
<u>1.5.</u>	<u>Manifestations cliniques</u>	14
1.5.1.	<u>Chez l'immunocompétent</u>	14
1.5.2.	<u>Pendant la grossesse</u>	16
1.5.3.	<u>Chez l'immunodéprimé</u>	17
1.5.3.1.	<u>Au cours du SIDA</u>	17
1.5.3.2.	<u>Chez les greffés</u>	18
1.5.4.	<u>Implication du CMV dans différents processus pathogènes</u>	18
<u>1.6.</u>	<u>Prévention et traitement</u>	18
<u>1.7.</u>	<u>Les techniques de diagnostic</u>	19
1.7.1.	<u>Diagnostic direct</u>	19
1.7.1.1.	<u>Examen cytologique</u>	19
1.7.1.2.	<u>La culture cellulaire</u>	20
1.7.1.3.	<u>La culture rapide</u>	20
1.7.1.4.	<u>La détection des antigènes viraux ou antigénémie pp65</u>	20
1.7.1.5.	<u>La détection du génome viral</u>	21
1.7.2.	<u>Diagnostic indirect</u>	22
<u>1.8.</u>	<u>Les stratégies thérapeutiques</u>	23
1.8.1.	<u>Le dépistage</u>	23
1.8.2.	<u>Chez l'immunocompétent</u>	24
1.8.3.	<u>Pendant la grossesse</u>	24
1.8.4.	<u>Chez l'immunodéprimé</u>	25
1.8.4.1.	<u>Chez les greffés</u>	25
1.8.4.2.	<u>Chez les sujets VIH+</u>	25
1.8.4.3.	<u>Lors de manifestations cliniques</u>	25
1.8.4.4.	<u>Evaluation de l'efficacité du traitement</u>	25
<u>2.</u>	<u>Diagnostic moléculaire du CMV avec amplification par PCR</u>	26
2.1.	<u>Rappel : Principe de la PCR</u>	26
2.2.	<u>Application au diagnostic biologique des infections à CMV</u>	27
2.2.1.	<u>La PCR qualitative</u>	27
2.2.2.	<u>Les techniques de quantification virale</u>	27

2.2.2.1.	La PCR compétitive	27
2.2.2.2.	La PCR en temps réel	30
3.	<u>Construction du standard plasmidique : Principe de clonage d'un vecteur</u>	33
B -	MATERIEL ET METHODE	33
1.	<u>Matériel</u>	33
1.1.	Les échantillons	33
1.2.	Les amorces et les sondes	34
1.2.1.	Pour le cytomégalovirus	34
1.2.2.	Pour le gène de l'albumine	35
1.3.	Le thermocycleur	35
1.4.	Le milieu réactionnel	36
1.5.	Les témoins positifs	36
1.5.1.	Pour le cytomégalovirus	36
1.5.2.	Pour le gène de l'albumine	36
1.6.	Vecteur pGEM-T easy	36
2.	<u>Méthode</u>	37
2.1.	Amplification par PCR	37
2.2.	Interprétation des résultats de la PCR	37
2.3.	Construction d'un plasmide	38
2.3.1.	Purification des produits de PCR	38
2.3.2.	Clonage dans pGEM-T easy	38
2.3.2.1.	La ligation	38
2.3.2.2.	Transformation des bactéries JM 109	39
2.3.3.	Vérification du résultat	40
2.3.3.1.	Extraction de l'ADN plasmidique	40
2.3.3.2.	Digestion enzymatique	40
2.3.3.3.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide	40
C -	RESULTATS	41
1.	<u>Mise au point de la technique</u>	41
1.1.	Concentration en Taq polymérase	41
1.2.	Température de l'étape d'hybridation	41

1.3.	<u>Concentration en chlorure de magnésium (MgCl₂)</u>	42
1.4.	<u>Influence de l'amplification simultanée du gène de l'albumine</u>	42
1.4.1.	<u>Résultats de l'amplification parallèle et de la co-amplification d'une gamme de dilution du virus et d'une gamme d'albumine</u>	42
1.4.2.	<u>Modifications du milieu réactionnel pour l'amélioration des résultats</u>	43
1.5.	<u>Durée des trois étapes du cycle</u>	44
1.6.	<u>Spécificité</u>	46
1.7.	<u>Conditions définitives de la PCR en temps réel</u>	46
2.	<u>Validation de la technique</u>	46
2.1.	<u>Préparation de la gamme d'étalonnage</u>	46
2.2.	<u>Résultats de l'amplification de la gamme standard</u>	47
2.3.	<u>Critères de validation</u>	49
2.3.1.	<u>Sensibilité</u>	49
2.3.2.	<u>Reproductibilité</u>	49
2.3.2.1.	<u>Résultats obtenus avec les gammes du CMV et du gène de l'albumine</u>	49
2.3.2.2.	<u>Résultats obtenus avec des extraits leucocytaires d'un patient</u>	49
2.3.3.	<u>Répétabilité</u>	50
2.3.3.1.	<u>Résultats obtenus avec les gammes du CMV et du gène de l'albumine</u>	50
2.3.3.2.	<u>Résultats obtenus avec les extraits leucocytaires d'un patient</u>	50
2.4.	<u>Test croisé entre les gammes du cytomégalo virus et du gène de l'albumine</u>	51
2.5.	<u>Application de la technique dans le suivi d'une patiente</u>	52
2.5.1.	<u>Influence de la technique de préparation de l'ADN</u>	53
2.5.2.	<u>Modifications des conditions de la PCR</u>	53
2.5.3.	<u>Nouvelles conditions définitives de la PCR en temps réel</u>	54
2.5.4.	<u>Etude de la corrélation entre la PCR en temps réel et la PCR compétitive</u>	54
D –	DISCUSSION	55
	Conclusion.....	59
	Annexes.....	60
	Bibliographie.....	65

Liste des figures

Figure 1 : Structure du CMV en microscopie électronique.....	3
Figure 2 : Structure du CMV humain.....	4
Figure 3 : Représentation des régions du génome viral.....	4
Figure 4 : Schéma de répllication du CMV.....	8
Figure 5 : Schéma des différents stades de l'infection à CMV.....	11
Figure 6 : Effet cytopathogène du CMV sur fibroblastes embryonnaires humains.....	20
Figure 7 : Visualisation de cellules non infectées après réaction d'immunofluorescence.....	21
Figure 8 : Visualisation de cellules infectées après réaction d'immunofluorescence.....	21
Figure 9 : Principe de la PCR compétitive utilisant un standard interne.....	28
Figure 10 : Schéma du principe de construction du standard mis au point par le laboratoire (Poirier-Toulemonde <i>et al.</i>, 1997).....	29
Figure 11 : Principe de la PCR en temps réel basée sur la technologie TaqMan.....	32
Figure 12 : Influence de la température sur l'efficacité de l'amplification de différentes dilutions du CMV en présence de 3 mM de MgCl₂.....	41
Figure 13 : Influence de la concentration en MgCl₂ sur l'efficacité de l'amplification de différentes dilutions du CMV pour une température d'hybridation de 58°C.....	42
Figure 14 : Influence de la modification de composition du milieu réactionnel sur l'efficacité de l'amplification du CMV.....	44
Figure 15 : Influence de la modification de composition du milieu réactionnel sur l'efficacité de l'amplification du gène de l'albumine.....	44
Figure 16 : Influence de la durée des trois étapes du cycle sur l'efficacité de l'amplification du CMV.....	45
Figure 17 : Influence de la durée des trois étapes du cycle sur l'efficacité de l'amplification du gène de l'albumine.....	45
Figure 18 : (A) Réaction d'amplification des différentes dilutions de la gamme standard.	48
Figure 19 : Schéma des résultats de charges virales de la PCR en temps réel en fonction de ceux de la PCR compétitive.....	55

Liste des tableaux

Tableau 1 : Séquence et localisation génomique des amorces et de la sonde utilisées dans la PCR en temps réel du CMV	34
Tableau 2 : Séquence des amorces et de la sonde utilisées dans la PCR en temps réel du gène de l'albumine	35
Tableau 3 : Composition des différents mélanges testés pour la réaction de ligation	39
Tableau 4 : Résultats obtenus avec les deux méthodes d'amplification	43
Tableau 5 : Moyennes des Ct et coefficients de variation obtenus pour chaque dilution du virus lors de la reproductibilité	49
Tableau 6 : Moyennes des Ct et coefficients de variation obtenus pour chaque dilution du gène de l'albumine lors de la reproductibilité	49
Tableau 7 : Coefficients de variation obtenus pour chaque extrait leucocytaire lors de la reproductibilité	50
Tableau 8 : Moyennes des Ct et coefficients de variation obtenus pour chaque dilution du virus lors de la répétabilité	50
Tableau 9 : Moyennes des Ct et coefficients de variation obtenus pour chaque dilution du gène de l'albumine lors de la répétabilité	50
Tableau 10 : Coefficients de variation obtenus pour chaque extrait leucocytaire lors de la répétabilité	50
Tableau 11 : Résultats obtenus pour le test croisé en nombre de copies virales en fonction du nombre de cellules	51
Tableau 12 : Résultats de l'amplification du gène de l'albumine en Ct en fonction du nombre de copies virales	52
Tableau 13 : Résultats de l'amplification du CMV en nombre de copies virales/réaction obtenus après différentes préparations de l'ADN	53
Tableau 14 : Résultats de l'amplification du gène de l'albumine en nombre de cellules/réaction obtenus après différentes préparations de l'ADN	53
Tableau 15 : Résultats de l'amplification du CMV en nombre de copies virales/réaction obtenus lors des différentes modifications des conditions de la PCR	54
Tableau 16 : Résultats de l'amplification du gène de l'albumine en nombre de copies virales/réaction obtenus lors des différentes modifications des conditions de la PCR	54
Tableau 17 : Charges virales exprimées en Log de copies pour 10⁶ cellules obtenues pour des extraits leucocytaires par les PCRs en temps réel et compétitive	55

Abréviations

PCR : Polymerase Chain Reaction

CMV : Cytomégalovirus

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

IL : Interleukine

kb : kilobase

HHV 6 et 7 : Herpesvirus humain 6 et 7

LCR : liquide céphalorachidien

LBA : lavage broncho-alvéolaire

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

NASBA : nucleic acid sequence-based amplification

nm: nanomètre

LDL : Low Density Lipoprotein

E.L.I.S.A. : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

DEIA : DNA Enzym Immuno Assay

cfu : colonies formant unité

rpm : rotations par minute

Introduction

Très répandu dans toutes les populations mondiales, le cytomégalovirus (CMV) appartient à la famille des *Herpesviridae* et possède donc la caractéristique de persister, sous forme latente, pendant toute la vie du sujet infecté. Cet état de latence est rompu périodiquement par des épisodes de réactivation, qui sont, chez le sujet immunocompétent, rapidement jugulés par les effecteurs immunitaires. Chez les patients immunodéprimés (les greffés ou les sujets VIH +), la réplication virale n'est plus suffisamment maîtrisée et se déclare alors la maladie à CMV qui, en l'absence de traitement, conduit, le plus souvent, au décès de ces patients. De même, ce virus s'avère dangereux pendant la grossesse où il est susceptible d'entraîner d'importantes malformations fœtales.

De nombreuses équipes travaillent sur le développement des techniques diagnostiques qui permettent un dépistage de plus en plus précoce de la maladie à CMV et donc une prise en charge thérapeutique rapide. Actuellement les techniques les plus sensibles et les plus fiables sont celles de biologie moléculaire avec réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Tout d'abord, ont été utilisées des PCRs qualitatives, attestant uniquement de la présence ou non de la réplication virale. Puis les techniques suivantes ont permis une quantification de la charge virale dans le sang. Parmi ces dernières, la PCR compétitive ne donnant qu'une approche semi-quantitative du titre infectieux, tend à être supplantée par la PCR en temps réel qui offre de nombreux avantages.

L'objectif de ce travail a été de mettre en place une technique de PCR en temps réel dans notre laboratoire, afin d'obtenir des résultats plus rapides et de meilleure qualité. Pour cela, il a tout d'abord été nécessaire d'optimiser les différents paramètres de la réaction puis de valider notre méthode par la réalisation d'une gamme standard sur laquelle différents critères ont été évalués. Dans un dernier temps, l'application au suivi de différents patients a permis de confirmer les performances de cette quantification.

A-GENERALITES

1. Le cytomégalovirus (CMV)

1.1. Historique

En 1904, Ribbert, Jesionek et Kiolemenoglou décrivent, pour la première fois, des lésions histologiques caractéristiques de la maladie des inclusions cytomégaloïques. En 1952, la première technique diagnostique est mise en application par Fetterman. En 1956, Rowe isole la souche AD169 qui constitue maintenant la souche de référence ATCC VR 977. En 1960, Weller rebaptise le virus, cytomégalovirus.

1.2. Structure et réplication

1.2.1. Structure du virus (Colimon *et al*, 2002)

Le CMV ou Herpèsvirus Humain 5 (HHV 5), pathogène spécifique de l'homme, fait parti de la famille des *Herpesviridae* et de la sous-famille *Béta-Herpesvirinae* qui comprend également les virus HHV 6 et 7. Cette sous-famille est caractérisée par une spécificité d'hôte étroite, une multiplication des virus sur un faible nombre de systèmes cellulaires et un cycle de réplication long.

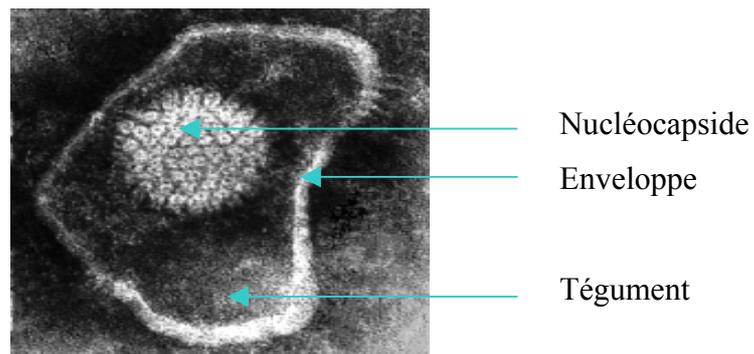


Figure 1 : Structure du CMV en microscopie électronique

HUMAN CMV VIRION STRUCTURE

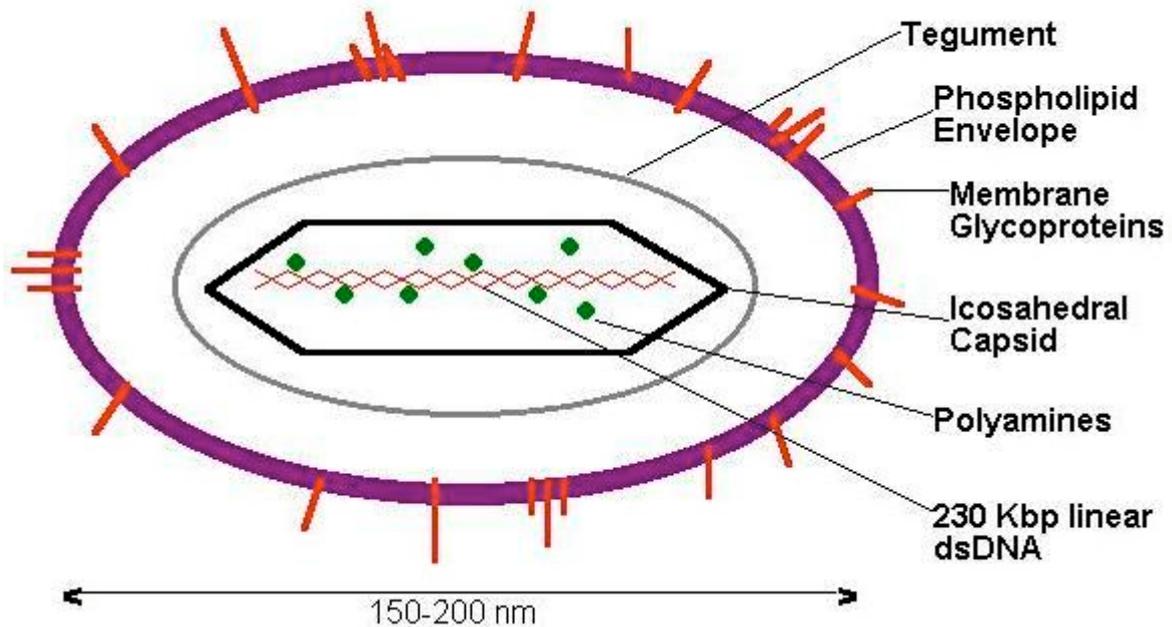


Figure 2 : Structure du CMV humain

1.2.1.1. Le génome

Il possède un ADN bicaténaire linéaire de 229 kb. Ce génome est le plus grand de tous ceux des Herpèsvirus connus. Il est séparé en deux segments de séquence unique :

- La région UL (Unique Long) qui représente 82% de la molécule
- La région US (Unique Short) qui représente 18%

Entre les deux, une zone de jonction IRL-IRS (Internal Repeat Long - Internal Repeat Short) est constituée des séquences inversées d'ADN des deux extrémités de la molécule, TRL (Terminal Repeat Long) et TRS (Terminal Repeat Short). Il existe quatre formes isomères de ce génome selon l'orientation des deux régions UL et US l'une par rapport à l'autre.

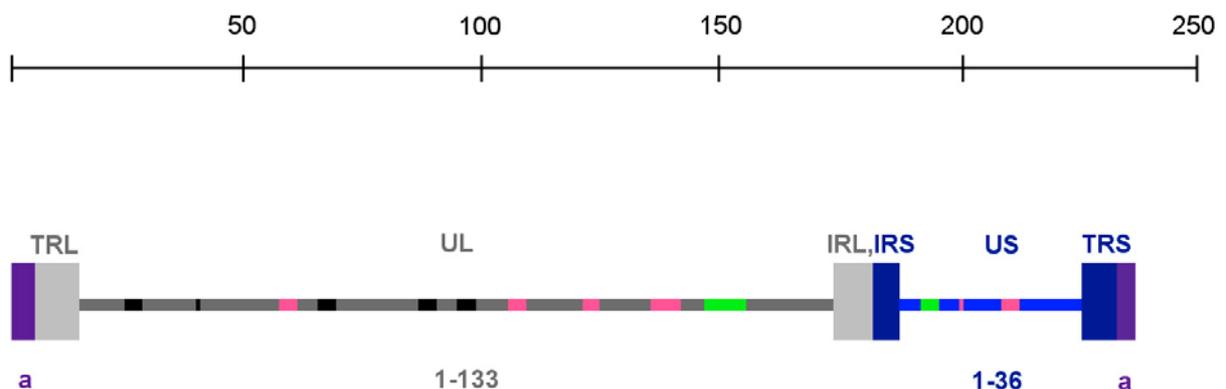


Figure 3 : Représentation des régions du génome viral

L'homologie du génome des différentes souches virales de CMV est supérieure à 80%. Pour les techniques diagnostiques de biologie moléculaire, il faut sélectionner une région de l'ADN commune à toutes les souches.

1.2.1.2. Le core

Il est constitué d'une glycoprotéine autour de laquelle est enroulé l'ADN viral. Des polyamines (spermine et spermidine) sont associées à la molécule génomique pour neutraliser ses charges négatives.

1.2.1.3. La capside

La capside est de forme icosaédrique avec un diamètre d'environ 110 nm. Celle-ci est composée principalement :

- de la protéine majeure de capside (MCP) à 90%
- de la protéine mineure de capside (mCP)

1.2.1.4. Le tégment

Il s'agit de la partie située entre la capside et l'enveloppe. Cet espace contient de nombreuses protéines et enzymes virales (ADN polymérase, DNase, phosphatase...).

1.2.1.5. L'enveloppe

Cette enveloppe provient des membranes nucléaires, cytoplasmiques et endosomales de la cellule hôte. Son diamètre mesure environ 200 nm. Elle comporte des glycoprotéines virales qui entrent en jeu lors de la fixation du virus à la cellule hôte. Elles jouent également le rôle d'antigène dans la réponse immunitaire de l'organisme infecté. L'enveloppe est un élément de fragilité chez les virus.

1.2.2. Le cycle de réplication (Colimon et al, 2002)

Le cytomégalovirus a une étroite spécificité d'hôte, chaque souche est spécifique d'une espèce animale. Chez l'homme, de nombreuses cellules peuvent jouer le rôle d'hôte pour le CMV humain : les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules parenchymateuses tels que les hépatocytes, les neurones, les myocytes... Par contre in vitro, la réplication se fait essentiellement dans les fibroblastes humains primaires différenciés et le cycle complet est long, de 48 à 72 heures.

1.2.2.1. La fixation du virus

La fixation du virus à la cellule hôte est un processus très rapide qui s'effectue, de manière efficace, aussi bien dans les cellules permissives que celles non permissives. Ceci implique donc la participation d'un grand nombre de récepteurs cellulaires encore mal connus mais dont certains, comme l'annexine II ou les protéoglycanes héparine sulfate, ont été mis en évidence. La possibilité d'infecter de nombreux types cellulaires s'explique également par l'existence de plusieurs mécanismes de fixation. L'un d'entre eux est une interaction indirecte, par l'intermédiaire de la $\beta 2$ globuline qui forme un pont entre le virus et les molécules HLA I de la membrane cellulaire. Cependant, les travaux montrent qu'aucun de ces mécanismes n'a un rôle central et n'est indispensable pour infecter les cellules.

La conséquence de ces interactions est une cascade de réactions aboutissant à l'augmentation du calcium et de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaires et à l'entrée dans le noyau de facteurs de transcription actifs.

1.2.2.2. Pénétration du virus

Elle a lieu dans les cinq minutes suivant la fixation, par fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire et, exceptionnellement, dans les cellules endothéliales et celles épithéliales pigmentaires de la rétine, par endocytose.

La nucléocapside et les protéines tégumentaires libérées dans le cytoplasme se dirigent vers le noyau et seul le complexe ADN-protéines virales pénètre à travers les pores nucléaires.

1.2.2.3. Synthèse du virion

Le virus va se servir de toute la machinerie cellulaire pour se multiplier, notamment de l'ARN polymérase II qui est capable de transcrire tous les gènes viraux. L'expression de ces gènes est divisée en trois phases :

- La phase α ou phase très précoce (de 0 à la 2^{ème} heure)

La transcription des gènes α , déterminant l'état de latence ou de réactivation virale, est sous la dépendance de facteurs cellulaires, eux même influencés par des stimulations physiologiques. La synthèse des protéines de cette phase est indispensable à celle des deux autres phases. Elle est également responsable de la régulation positive ou négative de l'expression d'un très grand nombre de gènes cellulaires et de gènes d'autres virus tel que le VIH.

- La phase β ou phase précoce (de la 2^{ème} à la 20^{ème} heure)

Au cours de cette phase, des protéines de structure sont synthétisées mais surtout des enzymes de la réplication virale notamment une ADN polymérase et des enzymes intervenant dans le métabolisme des nucléotides et dans la réparation de l'ADN.

- La phase γ ou phase tardive (après la 20^{ème} heure)

La plupart des protéines synthétisées à la phase γ sont des protéines de structure (celles de matrice, de capsid) mais aussi les glycoprotéines de l'enveloppe.

La réplication du génome viral débute après la phase précoce. L'ADN clivé est empaqueté dans les nucléocapsides immatures qui, en s'accumulant dans le noyau, forment une inclusion typique. Lors de leur passage dans le cytoplasme, elles s'enveloppent d'une partie de la membrane nucléaire puis migrent dans le réticulum endoplasmique. La particule perd son enveloppe, se munit de son tégment puis, au niveau des endosomes, récupère une nouvelle enveloppe. Plusieurs formes du virus peuvent être observées dans la cellule :

- Le virion complet
- Les corps denses résultant d'une production excessive des protéines virales et qui sont constitués seulement de la capsid et du tégment
- Les particules enveloppées non infectieuses (sans ADN)

Une inclusion cytoplasmique se forme contenant des virions matures et des corps denses, celle-ci est responsable de la forme en haricot du noyau des cellules.

1.2.2.4. Libération du virus

L'infection par le CMV est très peu cytolitique et la libération des particules virales se fait par un mécanisme d'exocytose.

Dans les premières heures de l'infection, une augmentation de taille des cellules est observée. In vitro, l'effet cytopathogène est caractérisé par un foyer constitué de cellules ovalaires réfringentes, de grande taille et d'extension lente.

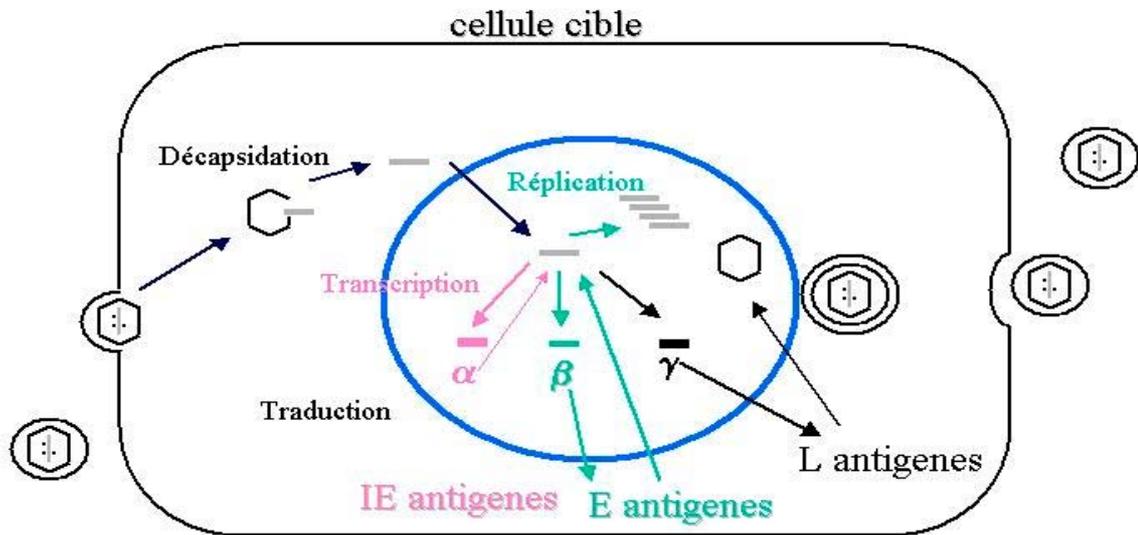


Figure 4 : Schéma de répllication du CMV

1.3. Physiopathogénicité de l'infection à CMV

1.3.1. Le tropisme cellulaire

Le CMV possède un large tropisme cellulaire qui est à l'origine de manifestations cliniques nombreuses et variées.

L'infection des monocytes-macrophages et des cellules dendritiques est certainement celle qui a le plus de conséquences sur l'évolution de la maladie. Ces deux types de cellule jouent le rôle de présentation d'antigène dans la réponse immunitaire. Situées dans la circulation sanguine, elles permettent la dissémination virale dans tout l'organisme. Elles constituent également des sites de latence.

Les cellules endothéliales sont les cellules cibles du virus.

Le tropisme pour les cellules souches myélomonocytaires et les cellules stromales de la moelle épinière entraîne des perturbations de l'hématopoïèse.

Le virus peut également infecter les cellules musculaires lisses et provoquer des ulcérations du tractus gastro-intestinal ou des perforations. Ce tropisme pourrait également intervenir dans le processus d'accélération de l'athérosclérose.

Dans les poumons, les cellules infectées sont les cellules épithéliales et les fibroblastes et dans le foie, les hépatocytes.

L'atteinte des cellules du système nerveux central et des neurones périphériques est à l'origine de manifestations neurologiques.

La transmission materno-fœtale s'explique par l'infection des cellules du trophoblaste et du syncytiotrophoblaste.

Cependant, des différences de tropisme et de niveau de réplication existent en fonction des souches virales, ces deux éléments étant interdépendants du génome viral. De même que des passages répétés du virus sur les fibroblastes, *in vitro*, entraînent une baisse de la virulence qui s'explique par la perte de certains gènes.

1.3.2. Les différents stades de l'infection

1.3.2.1. La primo-infection

Il s'agit du premier contact de l'organisme avec le virus. Une période d'incubation de 30 jours s'écoule, en moyenne, entre l'entrée du virus dans l'organisme et l'apparition de la virémie. Cette dernière permet la dissémination du virus vers les organes comme le foie, la rate, la peau, les poumons et plus rarement vers le système nerveux, le cœur, les reins et le tube digestif. Le virus est également retrouvé en grande quantité dans les liquides biologiques excrétés. Durant cette phase, se développe une réponse immunitaire primaire qui permet le contrôle de la réplication virale et donc l'entrée en période de latence du virus.

1.3.2.2. La phase de latence

Caractéristique de la famille des Herpèsvirus, ce phénomène permet au virus de persister pendant toute la vie de la personne infectée en échappant à la réponse immunitaire. Les mécanismes sont encore mal connus. Pendant cette phase, le génome viral est retrouvé dans les monocytes, sous forme épisomale, les progéniteurs de la moelle osseuse, les cellules endothéliales, épithéliales rénales et pulmonaires ou les hépatocytes. Le virus ne se réplique pas, cependant une production de transcrits spécifiques a été observée.

1.3.2.3. La réactivation

Cette phase se traduit par une multiplication complète du virus et une dissémination dans l'organisme par voie hématogène. Trois types de cellule sont impliqués dans cette dissémination :

- Les polynucléaires dans lesquels il semblerait ne pas y avoir de multiplication du virus mais plutôt une phagocytose de cellules infectées qui expliquerait la présence du virus. Attestant d'une infection active, ces cellules sont souvent isolées pour la réalisation des techniques de diagnostic

- Les monocytes-macrophages
- D'autres cellules avec des inclusions cytomégaliqes qui pourraient s'apparenter à des cellules endothéliales

La cause de cette infection active ne semble pas être l'immunosuppression mais plutôt la présence de stimulations physiologiques (stress, hormones...) ou de facteurs cellulaires qui agiraient sur l'expression des gènes α (exemple : transformation des monocytes en macrophages) et surtout la réaction allogénique contre le greffon chez les transplantés.

En temps normal, le système immunitaire se charge de ramener le virus à l'état latent, bien qu'un double jeu de ce système soit suggéré car sa stimulation pourrait augmenter la production de cytokines responsables d'une réactivation.

1.3.2.4. La réinfection

Le patient, déjà contaminé par le virus, est de nouveau infecté par une autre souche de CMV. De part la grande homologie du génome entre les diverses souches, la réponse immunitaire développée pour celle initialement présente agit également contre la nouvelle.

1.3.2.5. La maladie à CMV

Celle-ci se définit comme une infection active au cours de laquelle des signes cliniques sont observés chez le patient. Elle n'intervient que lors d'immunodépression (les transplantés ou les sujets VIH positifs). La multitude de signes cliniques pouvant être observés est due à la capacité du CMV à infecter de nombreux types cellulaires.

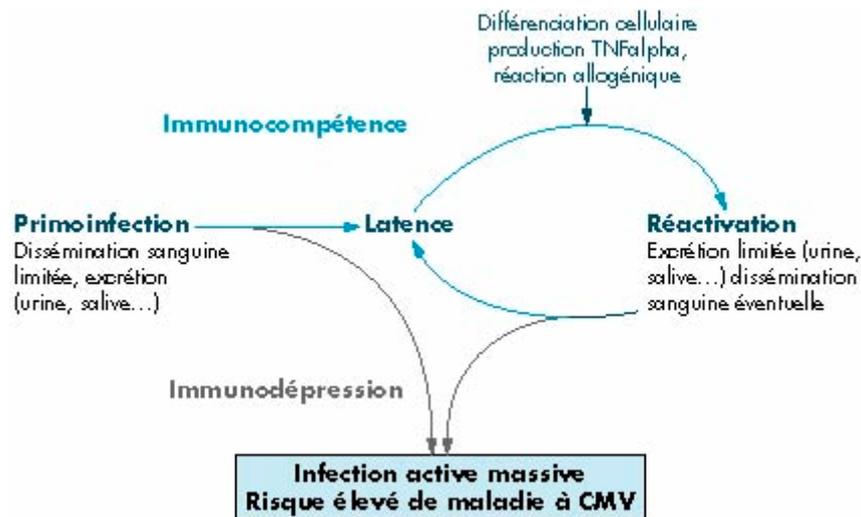


Figure 5 : Schéma des différents stades de l'infection à CMV

1.3.3. La réponse immunitaire (Segondy, 2002)

Malgré le fait que les Herpèsvirus persistent pendant toute la vie du patient grâce à sa forme latente, l'immunité développée par l'organisme permet de réguler la réplication du virus et d'empêcher l'apparition de la maladie.

1.3.3.1. L'immunité non spécifique

Les macrophages sont les acteurs principaux de cette immunité en agissant par plusieurs mécanismes :

- La phagocytose
- La présentation des antigènes aux lymphocytes CD4+
- La production de cytokines
- La cytotoxicité (avec intervention des anticorps)

En contradiction avec leur implication dans la défense de l'organisme, ils sont responsables de la dissémination du virus par voie sanguine.

L'induction de la synthèse d'interférons α et β confère une résistance aux cellules non infectées par le virus. Le complément intervient également pour combattre l'infection. Les cellules Natural Killer (NK) activées exercent, elles aussi, une cytotoxicité à l'égard des cellules infectées.

1.3.3.2. L'immunité à médiation humorale

Cette immunité a un rôle très modeste dans la lutte contre l'infection car la présence d'anticorps ne protège pas de la primo-infection ni des réactivations.

En effet, la présence de protéines virales antigéniques dans l'organisme entraîne une activation des lymphocytes B en plasmocytes qui produisent, en grande quantité, des anticorps spécifiques du CMV. Le principal antigène est représenté par la phosphoprotéine du tégument.

1.3.3.3. L'immunité à médiation cellulaire

Cette réponse fait intervenir les lymphocytes CD4+ dont l'activation dépend de la présentation, par les cellules spécialisées, des antigènes associés à une molécule de classe II du CMH en présence d'IL₁. Ils vont, à leur tour, augmenter la production de cytokines responsables de l'activation des lymphocytes B et T CD8+. Ces derniers exercent une action cytotoxique sur les cellules infectées présentant à leur surface les antigènes viraux associés à une molécule de classe I du CMH. Une inhibition de l'expression des molécules de classe I et II du CMH a été observée lors de l'infection par le CMV. Ceci aurait pour conséquence une diminution de l'activité des deux types de lymphocyte.

Les lymphocytes T (CD4+ et CD8+) ont un rôle fondamental dans le contrôle de la réplication virale. Une diminution du nombre de ces lymphocytes, lors de l'immunosuppression, entraîne l'apparition d'infections actives, le plus souvent symptomatiques. Dans le sérum, sont présents des lymphocytes T mémoires, spécifiques du CMV, permettant une réponse plus rapide lors des réactivations et réinfections.

1.3.4. Mécanismes d'échappement immunitaire du CMV (Segondy, 2002)

Le virus possède la faculté d'échapper au système immunitaire par différents mécanismes.

Sa dissémination, par passage de cellule à cellule, diminue fortement l'intérêt des anticorps donc de l'immunité à médiation humorale.

N'ayant pas d'expression de protéines virales à la surface des cellules au cours de la latence, celles-ci ne sont pas des cibles pour les acteurs de la défense immunitaire, elles ne sont pas détruites.

Le virus exerce un effet immunosuppresseur, notamment par sa capacité à infecter les cellules de l'immunité (monocytes-macrophages, lymphocytes). Ceci favorise la survenue d'autres infections qui affaiblissent également l'organisme. Les monocytes-macrophages infectés présentent une baisse de la synthèse d'IL₁ or cette interleukine intervient dans l'activation des lymphocytes T CD4+. Le virus diminue également la synthèse des molécules de classe I et II du CMH nécessaires respectivement à la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD8+ et CD4+. Les cellules NK, sensibles à l'inhibition de l'expression de ces molécules, devraient accroître leur activité, mais le CMV synthétise des analogues de molécule de classe I pour inhiber leur action.

Il s'installe donc un équilibre entre le virus et le système immunitaire de l'individu infecté qui est rompu, au profit du virus, lorsque l'immunité est déprimée.

1.4.Epidémiologie

1.4.1. La séroprévalence (Imbert-Marcille, 2001)

L'infection à CMV est endémique, présente dans le monde entier. Il n'existe pas d'influence saisonnière. Cependant la séroprévalence varie en fonction de plusieurs facteurs :

- L'âge
- Le pays : ceux en voie de développement sont plus touchés (90% en Afrique et en Asie contre 40 à 80% dans les pays industrialisés)
- Le niveau socio-économique : Le manque d'hygiène et les comportements sexuels à risque étant incriminés
- Les transfusions, les transplantations

La séroprévalence est basée sur la recherche des anticorps (IgG). Elle est donc dépendante de la sensibilité des tests utilisés. De plus, certains cas de patients infectés par le virus se sont révélés séronégatifs car ils ne présentaient qu'une réponse immunitaire à médiation cellulaire sans synthèse d'anticorps.

1.4.2. Les voies de transmission

Le CMV étant un virus enveloppé, il ne résiste pas dans le milieu extérieur donc la transmission se fait par contact direct et requiert des doses infectieuses importantes ou la présence de brèches dans l'épithélium. Elle n'est cependant pas systématique.

Au cours des infections actives, le virus est excrété dans la plupart des liquides biologiques : salive, urine, sécrétions génitales et lait maternel. Il est retrouvé dans le sang sous forme infectieuse mais aussi latente. La primo-infection, l'immunosuppression et une forte charge virale sont liés à l'intensité de l'excrétion du virus.

Les particules virales peuvent être transmises par voie respiratoire, orale, sexuelle, sanguine, par le lait ou in utero, et les virus à l'état latent peuvent également être contaminants par voie sanguine.

Deux types d'infection sont distingués :

- les infections communautaires avec deux pics de contamination, un au cours des premières années de la vie (infections maternofoetales – crèches) et le deuxième au début de la vie sexuelle active
- les infections nosocomiales représentées par les transfusions et les transplantations

1.5. Manifestations cliniques

Trois mécanismes sont suspectés être à l'origine des lésions tissulaires. Par action directe, la réplication du virus est responsable au niveau des cellules de l'effet cytopathogène et au niveau des cellules endothéliales de vascularites. Le troisième mécanisme est le conflit immunologique.

1.5.1. Chez l'immunocompétent (Meyohas, 1999)

Chez l'homme sain, lorsqu'elles existent, les manifestations cliniques correspondent essentiellement à la primo-infection. Mais 90% de ces primo-infections sont asymptomatiques. L'infection à CMV symptomatique est caractérisée par une fièvre prolongée, en moyenne de trois semaines, le plus souvent bien tolérée, survenant majoritairement chez les jeunes adultes. Celle-ci peut être accompagnée de myalgies, arthralgies, malaises, céphalées, gorge douloureuse, toux et parfois de troubles digestifs. A l'examen clinique, sont retrouvées, de manière inconstante, une splénomégalie, une hépatomégalie et/ou une adénopathie. Les examens biologiques révèlent un syndrome mononucléosique d'apparition tardive et une cytolysé hépatique avec augmentation modérée des transaminases. Des atteintes localisées à certains organes sont parfois observées. La décision de la mise en place d'une thérapeutique est basée sur l'évaluation du risque par rapport au bénéfice.

- Atteintes cutanées

Elles se traduisent par des éruptions, le plus souvent maculopapuleuses, favorisées par la prise de pénicilline A. Elles sont cependant moins fréquentes qu'avec l'EBV.

- Atteintes hépatiques

Malgré l'élévation des transaminases quasi-systématique lors d'infections symptomatiques, les atteintes sévères du foie sont rares. Elles se traduisent par une hépatite ictérique ou granulomateuse, cette dernière étant plus grave.

- Atteintes neurologiques

Les atteintes périphériques se traduisent par le syndrome de Guillain-Barré. Le CMV en est la cause dans 11 à 22 % des cas. Ce syndrome peut s'accompagner d'une insuffisance respiratoire, d'une atteinte des nerfs crâniens et d'une atteinte sensitive.

Les atteintes centrales sont principalement des encéphalites qui se manifestent par des troubles de la conscience, des céphalées, des signes de localisation et des convulsions.

- Atteintes pulmonaires

Ces atteintes se manifestent soit par une simple toux sèche soit par une pneumopathie.

- Manifestations cardiovasculaires

Des myocardites peuvent apparaître dans 6 % des cas alors que les malades ne présentent pas d'antécédent. Certains cas mortels ont été décrits. Les péricardites restent exceptionnelles.

- Manifestations gastro-intestinales

Des manifestations cliniques ont été observées à tous les niveaux du tube digestif. Dans la partie supérieure, peuvent être diagnostiquées des oesophagites ulcérées, des atteintes gastriques et au niveau de l'intestin, des ulcérations de l'iléon, des diarrhées sanglantes, des ulcérations colorectales. Il est parfois nécessaire d'instaurer un traitement pour que ces troubles disparaissent.

- Troubles hématologiques

Les complications les plus classiques sont l'anémie hémolytique et la thrombopénie. L'anémie s'accompagne généralement d'une splénomégalie, d'un ictère et de manière inconstante d'une hépatomégalie.

- Manifestations ophtalmologiques

Contrairement aux immunodéprimés, les immunocompétents présentent des troubles ophtalmologiques de façon très exceptionnelle.

- Infections sévères

Elles correspondent à des atteintes multi-viscérales. Le pronostic dépend de la précocité du traitement et donc du diagnostic.

1.5.2. Pendant la grossesse (Meyohas, 1999)

Le CMV est responsable du plus grand nombre d'infections congénitales. La transmission est réalisée par voie transplacentaire et elle a lieu principalement au cours de la primo-infection. Chez l'enfant, la plupart du temps, l'infection est asymptomatique, cependant des fœtopathies surviennent dans 10 à 15% des cas avec des signes nombreux et variés. Les facteurs influençant la gravité de l'atteinte fœtale sont :

- Les symptômes présents à la naissance (prématurité, petit poids de naissance, pétéchies, ictère, atteinte neurologique, hépatosplénomégalie...)
- La précocité de survenue de l'infection au cours de la grossesse : Plus l'atteinte est précoce, plus le risque de séquelles augmente
- Le stade de l'infection chez la maman : Le risque accru pour le fœtus existe essentiellement lors de la survenue de la primo-infection dont l'incidence est de 1 à 2% dans les classes moyennes et de 6% dans les classes socio-économiques basses. La transmission lors d'une réactivation ou d'une réinfection est également possible, mais elle est beaucoup plus rare et moins grave.

Le taux de mortalité et l'apparition de séquelles varient donc selon ces différents facteurs. Ces séquelles se manifestent principalement par des atteintes neurologiques, une surdité ou une baisse de la fonction intellectuelle. La prise en charge ultérieure de la grossesse est compliquée par l'absence de paramètres biologiques prédictifs de la gravité et l'absence de mesures thérapeutiques. Seule la prévention est applicable.

La transmission périnatale peut s'observer à l'accouchement, par exposition aux sécrétions vaginales, ou au cours de l'allaitement. L'importante excrétion du virus par les enfants infectés est la cause d'une grande contamination au sein des crèches et des collectivités.

1.5.3. Chez l'immunodéprimé (Mayaud et al, 1999)

1.5.3.1. Au cours du SIDA

Depuis l'instauration des multithérapies antirétrovirales, la maladie à CMV subsiste principalement chez les patients en échec thérapeutique, présentant un nombre de CD4+ inférieur à 100/mm³. La rétinite, les atteintes digestives et neurologiques sont les principales manifestations cliniques. Les localisations viscérales vont souvent de paire avec une infection active, c'est pourquoi une recherche de virémie est systématique.

- La rétinite

Il s'agit de la localisation la plus fréquente (80 % des cas de maladie à CMV) et la plus grave car en l'absence de traitement, elle conduit à la cécité puis au décès du patient. Le diagnostic est principalement ophtalmologique par la réalisation d'un examen du fond de l'œil.

- Les atteintes gastro-intestinales

Avec une fréquence de 15 à 30 %, elles surviennent généralement à un stade tardif de la maladie donc elles sont de mauvais pronostic. Tout le tube digestif peut être touché mais la localisation la plus fréquente est le colon. Elles se manifestent par des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs, hémorragies... Le diagnostic est réalisé essentiellement par une endoscopie digestive.

- Les atteintes neurologiques

Ces manifestations apparaissent tardivement dans 5 à 10 % des cas. Elles peuvent être d'origine centrale, encéphalite ou ventriculoencéphalite, ou d'origine périphérique, myeloméningoradiculonévrite ou neuropathie multifocale. Le diagnostic est réalisé par une détection du virus dans le LCR et des techniques d'imagerie médicale.

1.5.3.2. Chez les greffés

Responsable d'une morbidité et mortalité importante, le CMV doit faire l'objet d'une surveillance particulière chez ces patients. La maladie survient généralement dans un délai de 1 à 4 mois après la greffe. Les facteurs de risque sont le statut sérologique du receveur (le risque est maximum dans le contexte receveur-/donneur+), le degré d'immunosuppression parfois aggravé par le traitement d'épisodes de rejet, l'administration de sérums anti-lymphocytaires. Les symptômes peuvent être réduits à une fièvre isolée et constante. Mais lors d'atteintes viscérales, l'organe touché est souvent celui qui a fait l'objet de la greffe. Dans les greffes de moelle osseuse, le poumon est souvent touché avec apparition d'une pneumopathie interstitielle de mauvais pronostic.

1.5.4. Implication du CMV dans différents processus pathogènes

Le CMV pourrait être impliqué dans l'accélération du processus d'athérosclérose. Il induirait la prolifération des cellules artérielles musculaires lisses, l'accélération du captage des LDL par ces mêmes cellules et la génération de radicaux libres. Ainsi, l'infection par ce virus augmenterait le risque de rechutes de maladies coronariennes.

Le virus peut déclencher ou favoriser le rejet de la greffe. L'infection des cellules endothéliales du greffon, entraînant une vasculopathie inflammatoire, pourrait activer la réponse immunitaire du receveur. Les mêmes mécanismes sont évoqués dans la réaction du greffon contre l'hôte (GvH).

L'attribution d'un pouvoir oncogène au CMV reste à démontrer mais l'activation de l'expression de gènes cellulaires, par les protéines très précoces, pourrait être le mécanisme incriminé.

Son rôle immunosuppresseur, décrit précédemment, peut également favoriser la survenue d'infections opportunistes bactériennes, virales ou fongiques.

1.6.Prévention et traitement

Les traitements antiviraux des maladies à CMV sont efficaces mais sont parfois à l'origine d'effets indésirables sévères, c'est pourquoi d'autres alternatives ont été mises en place face à cette infection.

Les médicaments étant contre-indiqués pendant la grossesse, la prévention reste donc la seule mesure utilisable. Celle-ci préconise d'éviter le contact avec les nourrissons et les jeunes enfants ou de se laver les mains souvent. Une autre mesure de prévention consiste à utiliser des plasmas déleucocytés lors de transfusions.

La prophylaxie est également un moyen de lutte, notamment lors de transplantations à risque, lorsque le receveur est séropositif ou lorsqu'il est séronégatif et que le donneur est séropositif. Plusieurs molécules ont été testées. L'aciclovir ne paraît pas très efficace et le ganciclovir entraîne des infections tardives. Le valaciclovir est donc la molécule de choix.

Le traitement anticipé est une des solutions proposées pour limiter les risques d'apparition de la maladie. Il consiste en l'administration de ganciclovir ou de foscarnet lors de la détection du virus dans le sang ou le liquide de lavage alvéolaire, avant l'apparition de signes cliniques.

Pour traiter une maladie à CMV déclarée, les molécules actives sont le plus souvent utilisées en association car elles sont plus efficaces. Ces molécules sont le ganciclovir (analogue nucléosidique), le foscarnet (inhibiteur non nucléosidique de l'ADN polymérase virale), les immunoglobulines (spécifiques ou polyvalentes) et le cidofovir (analogue nucléosidique).

1.7. Les techniques de diagnostic (André-Garnier, 2003)

Les différents prélèvements sur lesquels les tests sont réalisés sont :

- Le sang : total, plasma ou sérum
- Les liquides biologiques : urine, LCR, sperme, liquide amniotique, LBA
- Les tissus : biopsie, produits d'avortement

1.7.1. Diagnostic direct

1.7.1.1. Examen cytologique

Les cellules provenant des biopsies ou des liquides biologiques sont colorées. Des inclusions intranucléaires et intracytoplasmiques sont recherchées dans ces cellules qui prennent alors l'aspect en « œil de hibou ». Technique peu sensible, elle ne présente un intérêt qu'en anapathologie.

1.7.1.2. La culture cellulaire

Les différents prélèvements reçus sont inoculés sur des fibroblastes embryonnaires humains (MRC5). La nappe cellulaire est observée toutes les 24 heures afin de détecter un éventuel effet cytopathogène. Celui-ci est caractérisé par des cellules ovalaires, réfringentes, de grande taille avec un aspect en « banc de poissons ». En raison de la longueur du cycle de réplication du virus, cet effet apparaît dans un délai de 8 à 20 jours, selon le titre infectieux de l'inoculum. Cette technique permet de constituer des stocks de virus, mais elle est longue, peu sensible et dépend de l'état des cellules utilisées.



Figure 6 : Effet cytopathogène du CMV sur fibroblastes embryonnaires humains

1.7.1.3. La culture rapide

Cette recherche s'effectue par la technique d'immunofluorescence ou d'immunopéroxydase, après 48 heures de culture sur fibroblastes. Les cellules sont mises en contact avec des anticorps monoclonaux spécifiques d'un antigène très précoce du CMV. Les anticorps marqués sont ensuite visualisés au microscope.

1.7.1.4. La détection des antigènes viraux ou antigénémie pp65

A partir d'un échantillon de sang prélevé sur anticoagulant, une technique de séparation (dextran, ficoll) permet de récupérer les leucocytes. Ils sont fixés sur des lames. Une réaction d'immunofluorescence, utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine pp65 du virus, révèle les cellules infectées. Cette technique est utilisée pour détecter les infections actives et parfois pour évaluer, de façon approximative, la charge virale qui s'exprime alors en nombre de cellules positives pour 200 000 leucocytes. Cependant pour

avoir un résultat de bonne qualité, l'échantillon doit être acheminé au laboratoire dans les 3 heures qui suivent le prélèvement.

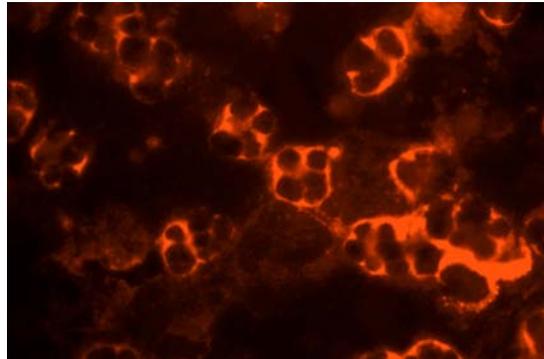


Figure 7 : Visualisation de cellules non infectées après réaction d'immunofluorescence

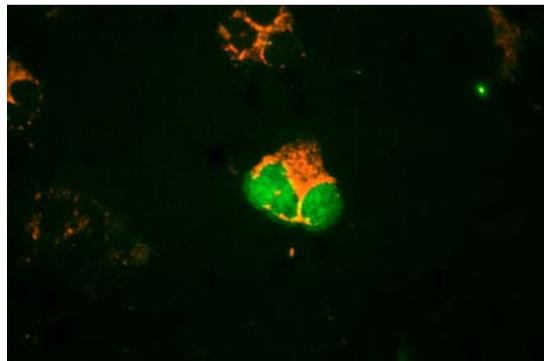


Figure 8 : Visualisation de cellules infectées après réaction d'immunofluorescence

1.7.1.5. La détection du génome viral

Les méthodes de détection du génome viral sont utilisées pour le dépistage et le suivi des infections actives.

❖ Recherche directe

Ces techniques abandonnées pour leur manque de sensibilité ont fait l'objet d'études et ont donc bénéficié de grandes améliorations.

L'hybridation directe consiste à former des complexes entre l'ADN viral du prélèvement et des sondes ARN. L'amélioration réside dans la révélation qui permet maintenant une amplification du signal (HybridCapture™ System). En effet, le complexe formé est reconnu par un anticorps qui est lui même couplé à plusieurs enzymes dont l'activité est mesurée par chimioluminescence.

La technique de l'ADN branché consiste également à créer des hybrides à l'aide de sondes spécifiques. La révélation fait intervenir une molécule d'ADN qui possède de multiples sites de liaison pour une sonde marquée d'une enzyme.

Ces deux méthodes permettent, à partir d'un prélèvement de sang total, une quantification de la charge virale après réalisation d'une gamme d'étalonnage, mais leur sensibilité reste bien inférieure à celle des techniques de PCR.

❖ Recherche avec amplification

L'amplification est réalisée par une réaction de polymérisation en chaîne ou PCR dont le principe est développé dans le paragraphe 2.

❖ Détection des ARN messagers viraux

La détection des ARNm viraux peut être réalisée soit par une transcription inverse suivie d'une amplification par PCR de l'ADNc, notamment la PCR en temps réel, soit par la méthode NASBA. Cette dernière consiste à soumettre l'échantillon d'ARN à une succession de cycles isothermes aboutissant à la synthèse d'ADNc puis d'ARN. Pour cela deux amorces sont utilisées dont une comporte le promoteur de la T₇ARN polymérase, enzyme utilisée dans la réaction. Les ARNs sont ensuite révélés par chimioluminescence et peuvent même être quantifiés par ajout d'un étalon interne.

Les techniques de détection des ARNm diffèrent par le type de transcrits recherchés, très précoces, précoces ou tardifs. Il est préférable de détecter les transcrits tardifs (trousse NuclisensTM CMV pp67 Assay, Organon tecknika) qui sont véritablement le signe d'une infection active contrairement aux autres transcrits qui ont pu être observés à différents stades de l'infection.

1.7.2. Diagnostic indirect

Certaines protéines du CMV sont des cibles privilégiées de la réponse humorale développée par le malade. Par exemple, les anticorps dirigés contre la protéine de matrice UL32 sont synthétisés chez pratiquement 100% des patients.

Le dosage des anticorps IgG et IgM s'effectue en majorité par des tests immunoenzymatiques E.L.I.S.A. Les anticorps du sérum se lient avec les antigènes fixés dans les puits réactionnels. La révélation est réalisée grâce à la fixation d'une enzyme qui transforme un substrat chromogène. L'intensité de la coloration, mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle

à la concentration en anticorps. Ces tests peuvent être réalisés par des automates, en circuit fermé (AxSYM[®] d'Abbott, Vidas[®] de Biomérieux). Pour le dosage des IgM, les techniques d'immunocapture sont de plus en plus utilisées car elles limitent le risque de faux-positifs lié à la présence de facteur rhumatoïde.

L'augmentation des IgG et des IgM peut être observée aussi bien dans la primo-infection que dans les réactivations. Seule la mesure de l'avidité des IgG permet de faire la distinction entre les deux. Cette méthode inclue une étape de dénaturation par l'urée pour éliminer les IgG les moins fixés aux antigènes. L'index d'avidité des IgG correspond au rapport des densités optiques obtenues avec ou sans traitement à l'urée. Plus le taux d'IgG avides est faible, plus le diagnostic est en faveur d'une primo-infection.

Cependant la sérologie CMV a des limites :

- Contrairement aux techniques de détection du génome viral, elle ne permet pas le diagnostic précoce
- La réponse humorale est fortement diminuée lors de l'immunodépression

Son intérêt est limité, en pratique, à la détermination du statut immunitaire chez les donneurs et les receveurs d'organe lors de greffes ou au cours de la grossesse.

1.8. Les stratégies thérapeutiques (André-Garnier, 2003)

De nombreuses techniques existent actuellement pour la détection du cytomégalo virus. Cependant elles ne présentent pas la même sensibilité et ne donnent pas toutes les mêmes informations. Le choix des techniques utilisées doit tenir compte du type de patient concerné et du but recherché (dépistage, détection d'une primo-infection, surveillance de la virémie...).

1.8.1. Le dépistage

Il est réalisé :

- Chez la femme enceinte
- Chez les donneurs et receveurs de greffes d'organe ou de moelle pour prévenir la survenue d'infections actives
- Chez les sujets VIH +
- Chez les donneurs de sang, de tissus, de cellules

Le diagnostic sérologique permet de déterminer le statut immunitaire des patients.

1.8.2. Chez l'immunocompétent

Devant un syndrome mononucléotique, une sérologie est réalisée sur deux sérums prélevés à 15 jours d'intervalle. L'évolution du statut immunitaire ainsi que le test d'avidité des IgG permettent de dire s'il s'agit d'une primo-infection ou d'une réactivation.

Dans certains cas (formes sévères) ou selon les résultats de la sérologie, d'autres tests peuvent être demandés (culture, antigénémie, PCR).

1.8.3. Pendant la grossesse

A titre préventif, la détermination du statut immunitaire n'est pas réalisée systématiquement chez toutes les femmes, mais elle est pratiquée de plus en plus pour les plus exposées (personnel de crèches ou de collectivités d'enfants de moins de 3 ans).

Lors de la survenue de manifestations cliniques chez la maman ou d'anomalies chez le fœtus, le plus à craindre est une primo-infection. La sérologie et l'index d'avidité des IgG doivent être pratiqués sur deux sérums dont un antérieur aux signes cliniques. La séroconversion et la faible avidité des IgG témoignent de la primo-infection. Une recherche de virémie par culture, antigénémie ou PCR est nécessaire pour mettre en évidence l'infection active.

Même si tous les tests révèlent bien une primo-infection active chez la maman, aucun d'entre eux ne permet d'affirmer que le fœtus est atteint par le virus. Un diagnostic anténatal peut alors être prescrit, si la virémie de la mère est négative, pour éviter la contamination pendant l'acte. La recherche dans le liquide amniotique, par culture rapide ou PCR quantitative, sera effectuée. Encore une fois, la détection du virus dans le liquide amniotique ne confirme pas la gravité de l'atteinte fœtale.

L'infection acquise in utero sera confirmée au cours des deux premières semaines de la vie par les techniques de culture, antigénémie, PCR voire même par dosage des IgM (technique moins sensible) sur les urines et autres prélèvements. Attention la présence du virus après la quatrième semaine de vie peut être due à une infection périnatale dont les conséquences, pour le nouveau né, sont moins graves.

1.8.4. Chez l'immunodéprimé

1.8.4.1. Chez les greffés

Avant la greffe, les statuts immunitaires du donneur et du receveur sont déterminés, pour savoir si un traitement préventif doit être mis en place.

Après la greffe, une surveillance des patients permet de dépister les infections actives dont l'incidence est très élevée entre le 1^{er} et le 4^{ème} mois post-greffe. Cette surveillance est hebdomadaire, les trois premiers mois, puis bi-mensuelle, mensuelle voire trimestrielle. Elle est réalisée par la détermination de la charge virale dans le sang et plus précisément dans la fraction leucocytaire soit par antigénémie soit par PCR quantitative. Le plus intéressant est de suivre la cinétique qui donne davantage d'informations sur l'évolution de l'infection.

1.8.4.2. Chez les sujets VIH+

Grâce aux trithérapies utilisées dans le traitement du SIDA, la survenue des maladies à CMV a beaucoup diminuée. Cependant chez les patients présentant un taux de CD4 inférieur à 100/mm³, une surveillance clinique et virologique est nécessaire. Cette dernière est réalisée de la même façon que celle des sujets greffés par une étude cinétique de la charge virale.

1.8.4.3. Lors de manifestations cliniques

Le CMV possède un large tropisme cellulaire et peut donc être à l'origine de manifestations cliniques diverses et variées. La démarche diagnostique consiste à mettre en évidence la présence du virus au niveau de l'organe atteint et dans le sang, voie de dissémination, afin de pouvoir différencier la maladie de l'excrétion virale sans conséquence clinique.

En fonction de la localisation de l'atteinte (neurologique, pulmonaire, digestive...), les prélèvements recueillis et donc les tests diagnostiques mis en œuvre sont différents (PCR sur LCR ou LBA, culture ou examen cytologique sur biopsie...).

1.8.4.4. Evaluation de l'efficacité du traitement

L'efficacité du traitement est évaluée par l'étude cinétique de la charge virale qui doit se négativer.

2. Diagnostic moléculaire du CMV avec amplification par PCR

2.1.Rappel : Principe de la PCR

La technique de PCR consiste à réaliser des copies d'un fragment déterminé d'ADN, à partir d'une molécule entière. Ce fragment, spécifique du CMV, est délimité par deux sondes, oligonucléotides complémentaires aux deux brins. Une succession de cycles est réalisée, chacun d'entre eux est composé de trois étapes :

- L'étape de dénaturation de l'ADN double brin à 94°C
- L'étape d'hybridation qui permet la fixation spécifique des amorces, à une température qui dépend de la température de fusion des amorces
- L'étape d'élongation à 72°C grâce à la Taq polymérase, enzyme qui résiste aux températures élevées

La cinétique d'amplification contient une partie exponentielle suivie d'un plateau. Au cours de la phase exponentielle, la quantité de produits de PCR est proportionnelle à la quantité initiale d'ADN. Cette relation n'est plus vérifiée au niveau du plateau. L'effet de plateau s'explique par plusieurs processus intervenant au cours de la réaction :

- L'augmentation du nombre de matrices pour laquelle la quantité de Taq polymérase devient limitante
- Les hautes températures entraînant une dégradation progressive des dNTP et une inactivation de l'enzyme
- L'accumulation des molécules d'ADN responsable d'une diminution de l'efficacité de la dénaturation et d'une hybridation entre brins néosynthétisés plutôt qu'entre brins et amorces
- La production de pyrophosphates inhibant la catalyse enzymatique

Le nombre de cycles, à partir duquel débute le phénomène de plateau, est difficile à déterminer, il varie en fonction de la nature de la PCR.

2.2. Application au diagnostic biologique des infections à CMV

2.2.1. La PCR qualitative

La présence du génome viral peut être mise en évidence après la PCR par :

- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide après coupure par des enzymes de restriction
- Hybridation par des sondes spécifiques, par exemple la technique DEIA (DNA Enzym Immuno Assay) de Diasorin utilisée au laboratoire avant toute détermination de charge virale pour dépister les prélèvements positifs.

2.2.2. Les techniques de quantification virale

La détermination de la charge virale peut être réalisée par de nombreuses techniques : culture, antigénémie pp65, hybridation (HybridCapture™ System), la méthode de l'ADN branché ou celle NASBA. Mais leur sensibilité et/ou leur reproductibilité sont inférieures aux techniques de PCR.

Théoriquement la PCR permet d'obtenir, à partir d'une molécule d'ADN, 2^n copies au bout de n cycles. Cependant le rendement de l'amplification n'est jamais de 100%. Si X_0 est la quantité initiale d'ADN, la quantité X_n de copies, obtenue après n cycles, est :

$$X_n = X_0(1+r)^n \quad \text{où } r \text{ est le rendement compris entre 0 et 1}$$

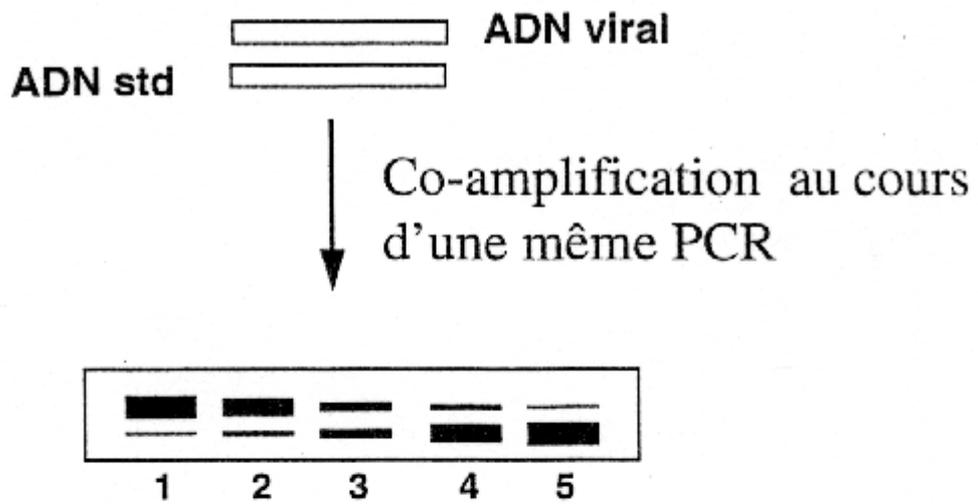
2.2.2.1. La PCR compétitive (Bogard *et al*, 1998)

Cette méthode se base sur une co-amplification de la souche du patient et d'un standard interne.

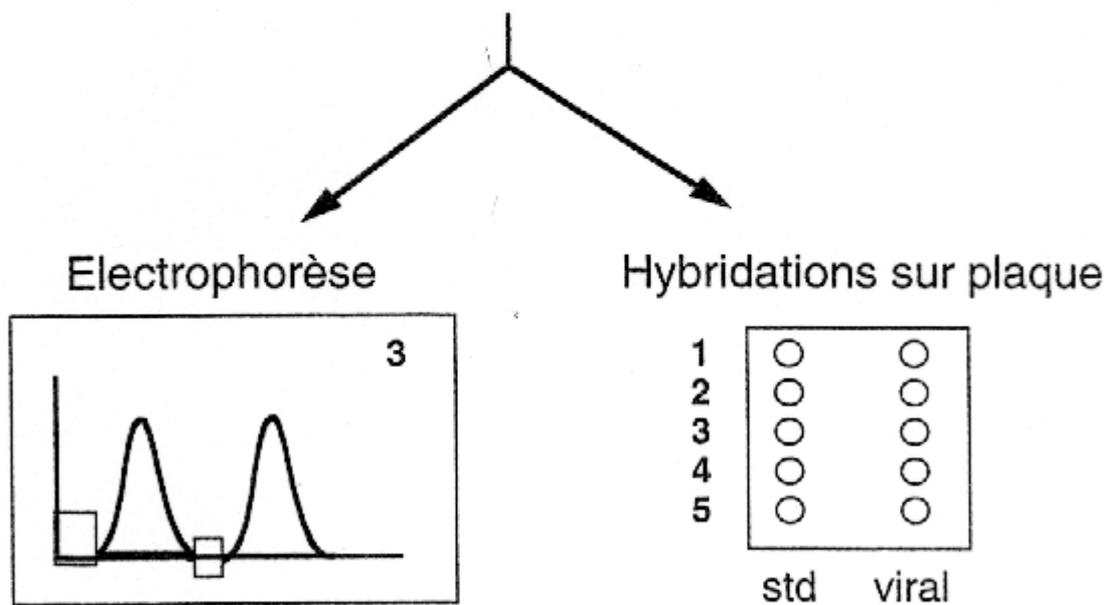
➤ Construction du standard

Ce standard peut être d'origine endogène, par exemple un gène humain (β globine). Dans ce cas là, l'utilisation d'un autre couple d'amorces est indispensable. Des phénomènes de compétition, vis à vis des constituants du milieu réactionnel, peuvent être à l'origine de variations de rendement entre les deux PCRs.

L'utilisation d'un standard interne d'origine exogène, utilisant les mêmes amorces, s'est donc imposée (Figure 9). Il ne diffère de l'ADN souche que de quelques bases. Les deux produits subissent les mêmes variations de rendement au cours de l'amplification.



Révélation différentielle des 2 produits de PCR



$$[\text{ADN viral}] = \frac{\text{ASC ou DO ADN viral}}{\text{ASC ou DO ADN std}} \times [\text{ADN std}]$$

Figure 9 : Principe de la PCR compétitive utilisant un standard interne

Le laboratoire a lui même construit son standard (Figure 10, Poirier-Toulemonde *et al*, 1997). Cette construction est basée sur la réalisation d'une PCR nécessitant l'utilisation du primer B utilisé dans la PCR compétitive et d'un primer C qui correspond au primer A additionné de 9 bases. Lorsque ce dernier vient s'hybrider sur l'ADN viral, il induit la formation d'une boucle de la séquence cible dont la longueur est finalement réduite de 6 pb. Les produits de la PCR sont ensuite identifiés par une électrophorèse puis leur séquence est vérifiée par séquençage.

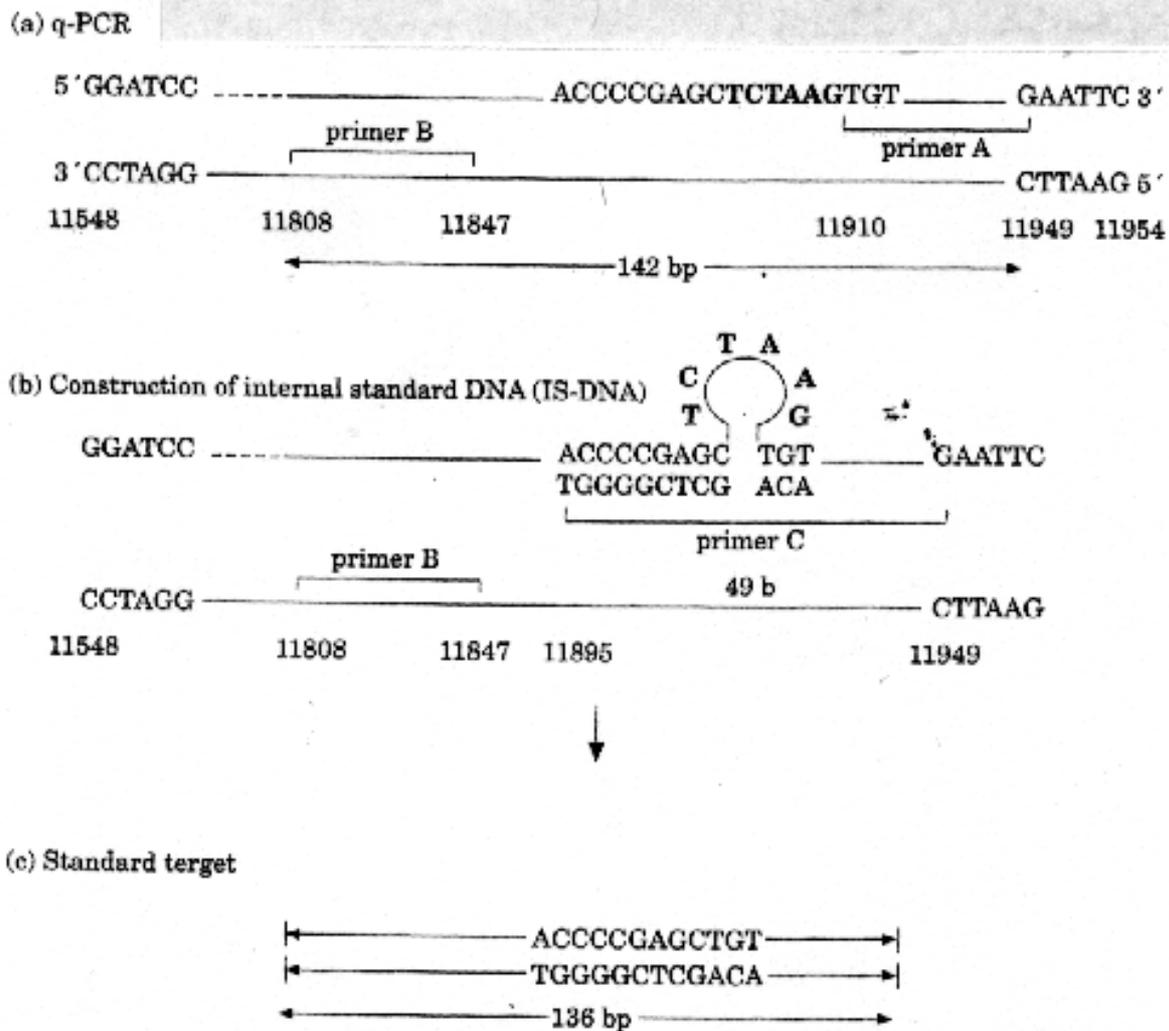


Figure 10 : Schéma du principe de construction du standard mis au point par le laboratoire (Poirier-Toulemonde *et al*, 1997)

➤ Principe de détermination de la charge virale par cette méthode

La PCR compétitive ne permet pas l'obtention des courbes cinétiques, cependant elle rend possible une mesure quantitative au niveau du plateau. L'analyse est beaucoup plus

fiable que celle de la quantification en phase exponentielle qui est difficilement reproductible car la vitesse d'amplification peut varier d'une réaction à l'autre.

La détermination de la charge virale nécessite une étape de révélation des produits de PCR, pour faire le rapport entre l'ADN souche et le standard. Cette révélation peut être réalisée par radiomarquage, séquençage, électrophorèse capillaire, hybridation en plaque (DEIA) ou par simple migration sur gel (méthode utilisée au labo).

$$\text{pour l'ADN à titrer,} \quad X_n = X_o (1+r)^n$$

$$\text{pour le standard,} \quad Y_n = Y_o (1+r)^n \quad \text{où } r, \text{ le rendement, est identique}$$

pour les 2

Le rapport donne donc la formule suivante : $X_o = (X_n/Y_n) \cdot Y_o$

La quantité initiale Y_o de standard est connue et le rapport (X_n/Y_n) est déterminé par la révélation. Lorsque le rapport est égal à 1, alors $X_o = Y_o$.

2.2.2.2. La PCR en temps réel

Cette méthode est basée sur l'utilisation de techniques de marquage utilisant des intercalants ou des sondes (Collot *et al*, 2001).

Les intercalants, dont le principal représentant est le sybergreen, se logent entre les deux chaînes de l'ADN double brin et émettent une fluorescence intense, après excitation, qui est mesurée pendant la phase d'élongation de chaque cycle. L'utilisation de ce type de marquage présente un coût moins élevé mais présente également une moins bonne spécificité.

Les méthodes utilisant les sondes sont basées sur le principe du transfert d'énergie de résonance (FRET) qui a lieu entre deux fluorochromes situés à proximité l'un de l'autre. La fluorescence émise par le premier est captée par le second qui réémet à une autre longueur d'onde.

Dans la PCR en temps réel, basée sur la technologie TaqMan (Figure 11), la sonde est un oligonucléotide monobrin marqué à ces extrémités par deux fluorochromes (Reporter et Quencher). Chaque fluorochrome a une longueur d'onde d'excitation et d'émission. Une lumière monochromatique dont la longueur d'onde correspond à celle d'excitation du reporter, est envoyée en permanence sur le milieu réactionnel.

Pendant la phase d'hybridation, cette sonde se fixe sur sa séquence complémentaire située dans le fragment à amplifier. Elle ne peut donner lieu à une élongation car son extrémité 3'OH est bloquée par le fluorochrome. Avant l'élongation, elle est entière, les deux fluorochromes sont couplés. Le transfert d'énergie a lieu. La lumière émise par le quencher n'est pas détectée donc aucun signal n'est émis. Par contre, au cours de l'élongation, la Taq polymérase, grâce à son activité 5'-3'exonucléasique, va cliver la sonde base par base. Il n'y a plus de couplage. La lumière émise par le reporter n'est plus captée par le quencher donc elle arrive sur le détecteur qui émet un signal. A chaque cycle d'amplification, une molécule de reporter est libérée pour chaque molécule d'ADN synthétisée.

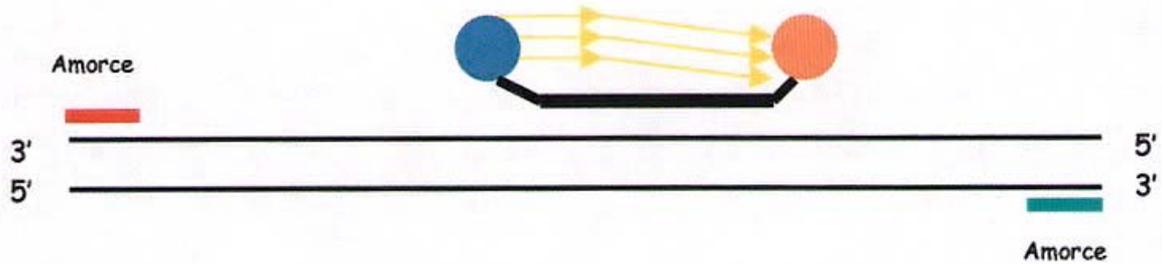
La technique consiste à suivre le signal émis en fonction du nombre de cycles écoulés. Le seuil d'apparition de la fluorescence (Ct) est proportionnel à la quantité d'ADN initialement présent dans l'échantillon. La détermination du titre nécessite la réalisation d'une courbe d'étalonnage, Quantité = f(Ct), grâce à un standard.

Le test d'hybridation est une autre méthode qui utilise un couple de sondes, chacune marquée par un fluorochrome différent. Lorsque les deux sondes s'hybrident sur deux séquences adjacentes de l'amplicon, le transfert d'énergie permet l'émission de la fluorescence. Plus le nombre d'amplicons synthétisés augmente, plus la fluorescence augmente.

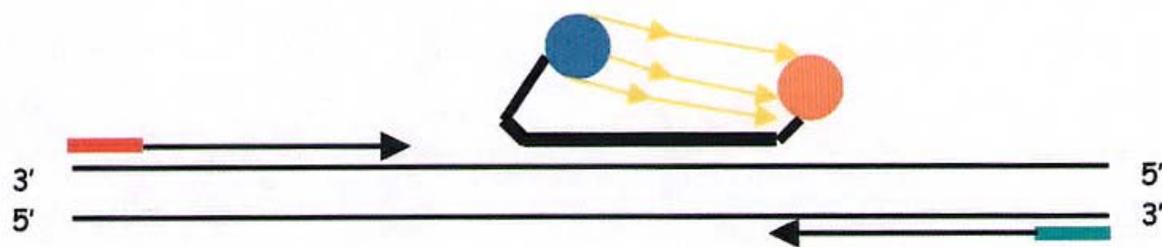
Les sondes beacon, comme celles de la méthode TaqMan, sont marquées à leurs deux extrémités mais elles possèdent en plus deux séquences complémentaires l'une de l'autre capables de s'hybrider pour former une structure en épingle à cheveux. Lorsqu'elles ne s'hybrident pas à l'ADN viral, elles sont sous forme repliées, les fluorochromes sont proches l'un de l'autre donc le transfert d'énergie se fait. Lorsqu'elles sont fixées à l'ADN, les fluorochromes sont trop éloignés pour permettre ce transfert donc la fluorescence du reporter est détectée.

La PCR en temps réel possède une très bonne sensibilité. Ne nécessitant plus de révélation post PCR, elle permet un gain de temps et réduit les risques de contamination. Cependant l'inconvénient majeur est le manque de standardisation de ces méthodes.

1- Etat initial : TAMRA (●) réprime l'activité fluorescente de FAM (●)



2- Elongation par la *Taq* polymérase



3- Activité 5'-3' exonucléasique de la *Taq* polymérase, libération de FAM et émission de la fluorescence

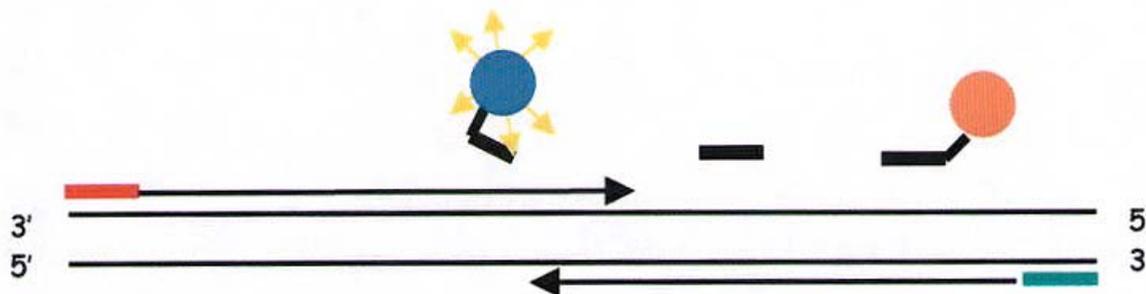


Figure 11 : Principe de la PCR en temps réel basée sur la technologie TaqMan

3. Construction du standard plasmidique : Principe de clonage d'un vecteur

La technique de clonage du fragment d'ADN génomique du CMV consiste à inclure celui-ci dans un plasmide. Ce vecteur est, à son tour, intégré dans un hôte, une bactérie *Escherichia coli*, non pathogène pour l'homme. Elle a la capacité de multiplier, de façon indépendante, l'ADN recombiné.

La sélection des bactéries est basée sur le principe de α complémentation. Les bactéries utilisées possèdent un gène défectif codant pour la partie COOH terminale de la β galactosidase. Dans le plasmide, a été introduit le gène *lacZ* codant pour le peptide α correspondant à la partie NH₂ terminale de l'enzyme. Lorsque le plasmide est contenu dans la bactérie, la complémentation permet la synthèse de la β galactosidase. Les colonies obtenues sont bleues. Cependant la présence de l'ADN à cloner, situé au milieu du gène *lacZ*, décale le cadre de lecture et empêche la synthèse de la β galactosidase. Ces colonies seront donc blanches. En effet, le milieu de culture contient de l'IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside), inducteur de la synthèse de la β galactosidase, et du X gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β D-galactosidase), substrat hydrolysé par l'enzyme en donnant un produit coloré en bleu. La sélection des bactéries est réalisée sur la couleur des colonies obtenues. Les colonies bleues sont les bactéries ayant incorporé le plasmide seul. Les colonies blanches sont soit les bactéries ne contenant pas le plasmide soit celles ayant le plasmide recombiné. Pour différencier les deux types de colonies blanches, la culture se fait en présence d'ampicilline. En effet, seul le plasmide contient le gène de résistance à cet antibiotique.

B – MATERIEL ET METHODE

1. Matériel

1.1. Les échantillons

Les échantillons sont des extraits leucocytaires de patients présentant une infection active à CMV. Le sang est prélevé sur un tube avec anticoagulant (EDTA). Les leucocytes sont séparés par un Dextran (annexe) puis subissent une ébullition de 10 min suivie d'une centrifugation à 10 000 tr/min pendant 5 min. Une extraction de l'ADN est ensuite réalisée grâce au QIAmp DNA MiniKit (Qiagen) (annexe).

1.2. Les amorces et les sondes

La co-amplification simultanée du génome viral et du gène de l'albumine nécessite l'utilisation de 2 couples d'amorces et de 2 sondes différents.

1.2.1. Pour le cytomegalovirus

Le fragment amplifié, d'une taille de 67 pb, est situé sur le gène US 8 qui correspond à une région conservée et spécifique du CMVH. US 8 fait parti de la famille des gènes US 6 qui jouent un rôle important dans les mécanismes mis en œuvre pour échapper au système immunitaire.

Les amorces, délimitant cette séquence, ont été choisies grâce au logiciel Primer express, à partir de la séquence de la souche de référence AD169. Ce logiciel étudie la formation de boucles intracaténaïres et de dimères d'amorces. La spécificité a été testée par le logiciel BLAST. Ces amorces sens et antisens font respectivement 20 et 19 bases et leurs températures de fusion sont de 62 et 58°C.

La même démarche a été suivie pour déterminer la séquence de la sonde. Sa taille est de 21 bases et sa température de fusion est 70°C. Elle comporte les fluorochromes FAM en 3' et TAMRA en 5'.

Les amorces et la sonde sont commercialisées par la société EUROGENTEC sous forme lyophilisée (Tableau 1). La solution est reconstituée avec de l'eau distillée pour obtenir une concentration de 20 µM.

Tableau 1 : Séquence et localisation génomique des amorces et de la sonde utilisées dans la PCR en temps réel du CMV

Référence	Société	Séquence	Position
amorce sens CMVUSRG1	Eurogentec	5'GGC-ACC-AAA-TGC-AGA-GTG-AG-3'	197 512
amorce antisens CMVUSRG2		5'AAG-CCG-TAT-TCC-GTT-TGC-G-3'	197 560
sonde CMVUSSRG		5'Fam-TGG-TCC-AAG-TCC-GTG-GGC-ACC-Tamra3'	197 533

1.2.2. Pour le gène de l'albumine

Le fragment du gène à amplifier a une taille de 74 pb. Les amorces, obtenues de la même façon que celles du CMV, font chacune 22 bases. Elles sont commercialisées par GENOSYS (Tableau 2). La sonde fait 26 bases et contient les fluorochromes JOE en 5' et TAMRA en 3'. Elle est commercialisée par la société EUROGENTEC.

Tableau 2 : Séquence des amorces et de la sonde utilisées dans la PCR en temps réel du gène de l'albumine

Référence	Société	Séquence
amorce sens ALB1RG	Genosys	5'-GCT-GTC-ATC-TCT-TGT-GGG-CTG-T-3'
amorce antisens ALB2RG	Genosys	5'-AAA-CTC-ATG-GGA-GCT-GCT-GGT-T-3'
sonde ALBSRG	Eurogentec	5'Joe-CCT-GTC-ATG-CCC-ACA-CAA-ATC-TCT-CC-Tamra3'

Le gène de l'albumine joue également le rôle du contrôle interne positif dont le but est de mettre en évidence la présence d'éventuels inhibiteurs de l'amplification. Le résultat obtenu par notre technique s'exprime en nombre de copies du virus pour 10⁶ cellules granuleuses. Si un pourcentage d'inhibition intervient sur le rendement de la PCR, celui-ci concerne à la fois le virus et le gène de l'albumine donc il s'annule.

1.3. Le thermocycleur

Toutes les amplifications sont réalisées sur le Rotor-Gene 2000, commercialisé par la société CORBETT RESEARCH. Les changements de température, qui se produisent à chaque cycle, s'effectuent par l'introduction d'air, plus ou moins chaud, à l'intérieur du système. Le rotor, tournant à la vitesse de 500 tours par minute, permet une bonne homogénéisation de cette température dans tous les tubes. Deux canaux de lecture permettent la détection de la lumière émise selon sa longueur d'onde.

Notre technique utilise deux couples de fluorochromes :

- Le couple FAM-TAMRA pour l'amplification du CMV
- Le couple JOE-TAMRA pour l'amplification du gène de l'albumine

1.4. Le milieu réactionnel

La Taq polymérase est fournie, à la concentration de 5 U/ μ l, par la société Qbiogene avec le tampon 10 X. Le chlorure de magnésium est fourni par PROMEGA, à la concentration initiale de 25 mM. Il est ensuite dilué pour obtenir la concentration déterminée dans l'étape de mise au point de la technique. Les dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) sont également fournis par PROMEGA à la concentration de 100mM. Ils sont dilués au dixième puis mélangés en quantité égale pour obtenir une solution finale dans laquelle la concentration de chacun des quatre nucléotides est de 2.5 mM.

1.5. Les témoins positifs

1.5.1. Pour le cytomégalo virus

Ces témoins positifs sont obtenus par dilution d'un extrait de la souche de référence AD169 qui est cultivée sur des fibroblastes humains et conservée à -70°C .

1.5.2. Pour le gène de l'albumine

La solution mère est une solution d'ADN humain commercialisée par la société ROCHE. Elle contient $30 \cdot 10^6$ cellules/ml donc 75000 pour une réaction utilisant 2.5 μ l. Des dilutions successives au $1/10^{\text{ème}}$ sont réalisées pour obtenir une gamme de 4 points à 75000, 7500, 750 et 75 cellules par réaction.

1.6. Vecteur pGEM-T easy

Le vecteur T, commercialisé par PROMEGA, a comme intérêt de présenter un T à chaque extrémité, permettant l'insertion facile de produits de PCR amplifiés par une ADN polymérase thermostable de type Taq, car cette enzyme ajoute un A à chaque extrémité 3' des fragments amplifiés. Il possède le fragment lacZ codant pour l' α peptide, de nombreux sites de restriction, et un gène de β lactamase permettant la sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide recombiné. Les bactéries mutantes utilisées sont les bactéries JM 109 (Promega), souches d'*Escherichia coli* non pathogène pour l'homme, possédant la mutation lacZ Δ M15 (c'est à dire ne synthétisant pas les acides aminés 11 à 41 du peptide α).

2. Méthode

2.1. Amplification par PCR

Au cours de la mise au point de notre technique, nous avons été amenés à changer, de nombreuses fois, la composition du milieu réactionnel en faisant varier :

- La concentration en $MgCl_2$
- La concentration en Taq polymérase
- La concentration en dNTP
- La présence des amorces et de la sonde du gène de l'albumine

Seul le tampon Q-BIOgene a été utilisé en quantité constante.

Un volume de 2.5 μl d'acides nucléiques est ensuite déposé dans 22.5 μl de ce milieu réactionnel.

Pour chaque série de réactions, est réalisée l'amplification des gammes d'étalonnage du CMV et du gène de l'albumine.

2.2. Interprétation des résultats de la PCR

Pour s'assurer de la validité de chaque manipulation réalisée, nous vérifions:

- L'allure générale des courbes d'amplification obtenues avec les témoins positifs, permettant de définir facilement le cycle à partir duquel la fluorescence dépasse le seuil (cycle seuil Ct). Les courbes sont de type sigmoïde, comprenant un point d'inflexion net (Ct), une phase exponentielle et une phase de plateau.
- La négativité du témoin négatif
- L'amplification des témoins positifs du CMV et du gène de l'albumine

Les résultats obtenus sont exprimés en **log du nombre de copies pour 10^6 cellules** :

- La charge virale inférieure à 4 est considérée comme très faible
- Entre 4 et 5, une surveillance accrue est nécessaire
- Au delà de 5, la charge virale est forte, un traitement doit être instauré

2.3. Construction d'un plasmide

2.3.1. Purification des produits de PCR

Une amplification génomique à partir d'un témoin positif, pur et dilué au 1/10, a été réalisée dans un milieu réactionnel ne contenant pas de sonde d'hydrolyse. La purification est réalisée par technique enzymatique. Pour cela, 2 µl d'ExoSAP-IT (USB Corporation) sont ajoutés à 10 µl de produits de PCR. ExoSAP-IT contient l'enzyme Exonucléase I et une phosphatase alcaline. Le mélange est incubé 15 min à 37°C (température à laquelle l'exonucléase I est active) puis 15 min à 80°C (température d'inactivation du produit). La pureté du produit ainsi obtenu a été vérifiée par la réalisation d'une migration électrophorétique en gel de polyacrylamide 9%. L'amplicon est ensuite conservé à -20°C.

2.3.2. Clonage dans pGEM-T easy

Le clonage du produit de PCR dans le vecteur pGEM T Easy nécessite une première étape de ligation, permettant l'insertion de l'amplicon, une deuxième étape de transformation des bactéries compétentes par choc thermique suivie de la culture et de la sélection des colonies transformées. Le plasmide est ensuite extrait et la présence de l'amplicon est vérifiée, après digestion enzymatique, par migration électrophorétique.

2.3.2.1. La ligation

Le vecteur pGEM T Easy est fourni avec les différents éléments du mix de ligation. Celui-ci comprend l'enzyme T4 DNA ligase, le tampon de ligation et un contrôle ADN d'intégration.

Trois mélanges réactionnels, contenant des concentrations différentes du produit de PCR purifié ou le contrôle ADN, le plasmide pGEM T Easy et l'enzyme T4 DNA ligase, sont préparés et incubés une heure à température ambiante.

Tableau 3 : Composition des différents mélanges testés pour la réaction de ligation

	A (en μ l)	B (en μ l)	C (en μ l)
Tampon T4 DNA ligase	5	5	5
pGEM T Easy	1	1	1
Amplicon CMV	1 (pur)	1 (dilué au 1/10)	-
Contrôle ADN	-	-	1
T4 DNA ligase	1	1	1
H2O distillée stérile (qsp 10 μ l)	2	2	2

2.3.2.2. Transformation des bactéries JM 109

A la fin de l'incubation, un tube de 200 μ l de bactéries compétentes JM109 ($>10^8$ cfu/ μ g), conservées à -80°C , est déposé dans de la glace. Trois tubes Falcon de 10 ml, ainsi que du milieu SOC auquel ont été ajoutés extemporanément du magnésium et du glucose, sont déposés sur la glace.

50 μ l de bactéries JM109 et 2 μ l de la solution de ligation sont mélangés délicatement dans chaque tube Falcon, et incubés 20 minutes à $+4^\circ\text{C}$. Les tubes sont ensuite déposés rapidement dans un bain marie réglé à $+42^\circ\text{C}$, pendant exactement 50 secondes. Ils sont ensuite à nouveau transférés sur la glace pendant 2 minutes. Dans chaque tube, sont ajoutés 950 μ l de milieu SOC supplémenté, le tout est incubé 1h30 à 37°C , avec agitation. Cent microlitres de chaque milieu contenant des bactéries transformées sont enfinensemencés sur des boîtes de culture préparées préalablement. Il s'agit d'un milieu LB auquel ont été ajoutés de l'IPTG 0.1 M, X-Gal et ampicilline. Les boîtes sont incubées 18 heures à 37°C sous 5% CO_2 en atmosphère humidifiée.

Le lendemain, quelques colonies blanches (ayant donc intégré le vecteur contenant l'amplicon) sont réisolées sur des boîtes MH auxquelles un disque d'ampicilline est ajouté, afin de s'assurer qu'il s'agit de bactéries résistantes à l'ampicilline, et non d'une contamination par des bactéries n'ayant pas intégré le plasmide. Les cultures sont incubées 24 heures à 37°C sous CO_2 5%.

A partir de la culture pure de bactéries transformées ainsi obtenue, les colonies sont inoculées dans 10 ml de milieu LB liquide et incubées 24 heures à 37°C sous agitation.

Les souches transformées d'E. coli JM109 sont conservées à -80°C sur des billes de latex, après repiquage sur pente TS 72 heures à 37°C sous CO_2 5% pour obtenir des cultures jeunes.

2.3.3. Vérification du résultat

2.3.3.1. Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction plasmidique est réalisée avec le kit QIAmp Plasmid Minikit (QIAGEN), en suivant les recommandations du fabricant. Dix ml de milieu de culture liquide, contenant les bactéries transformées, sont centrifugés 10 minutes à 6500 rpm, à +4°C. Le culot est repris dans 0.3 ml de tampon P1, puis transféré dans un tube Eppendorf. Trois cent microlitres de tampon de lyse P2 sont alors ajoutés, l'ensemble étant mélangé par retournement, puis incubé 5 minutes à température ambiante. Une nouvelle incubation de 5 minutes est ensuite réalisée sur la glace après ajout de 300 µl de tampon P3. L'ensemble est ensuite centrifugé 10 minutes à 10 000 rpm, puis le surnageant est déposé sur une colonne Qiagen préalablement lavée avec un tampon. Quatre lavages successifs sont réalisés, puis la colonne est déposée sur un nouveau tube Eppendorf. L'étape suivante est une élution, suivie d'une précipitation par de l'isopropanol stabilisé à température ambiante. Après 30 minutes de centrifugation à 10 000 rpm, le surnageant est éliminé et un dernier lavage est effectué avec 1 ml d'éthanol 70%. Le culot obtenu, après centrifugation 10 minutes à 10 000 rpm, est séché à l'étuve à 37°C, puis repris dans 30 µl d'eau stérile.

2.3.3.2. Digestion enzymatique

Une digestion enzymatique du plasmide ainsi extrait est réalisée avec l'enzyme de restriction EcoR1, qui possède des sites de coupure de part et d'autre des sites d'insertion de l'amplicon. Un µl de l'extrait plasmidique est incubé pendant 1 heure avec 1 µl d'EcoR1, 2 µl de tampon de digestion et 16 µl d'eau distillée, à 37°C.

2.3.3.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

La révélation des produits obtenus après extraction et digestion enzymatique, est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide 9%. Un marqueur de taille est déposé en parallèle de l'échantillon à analyser.

C – RESULTATS

1. Mise au point de la technique

Cette étape consiste à trouver les conditions de la technique pour lesquelles nous aurons les meilleurs résultats. La comparaison des différentes conditions est réalisée sur le nombre de cycles (Ct) à partir duquel apparaît la fluorescence. Les conditions seront d'autant meilleures que les Ct seront plus faibles. Plusieurs concentrations de virus ont été testées pour avoir une approche sur la linéarité de la méthode.

L'ensemble des données chiffrées, qui ont permis de tracer les courbes, est présenté en annexe.

1.1. Concentration en Taq polymérase

La concentration en Taq polymérase a été préalablement fixée par le laboratoire à **5 unités/ μ l** qui est une concentration de référence utilisée dans d'autres techniques.

1.2. Température de l'étape d'hybridation

Dans le choix des températures à tester, nous avons tenu compte de la température de fusion des deux amorces et de la sonde et nous nous sommes aidés des conditions d'autres techniques de routine du laboratoire. Des tests ont été menés avec des concentrations de 3, 5 et 7 mM en $MgCl_2$.

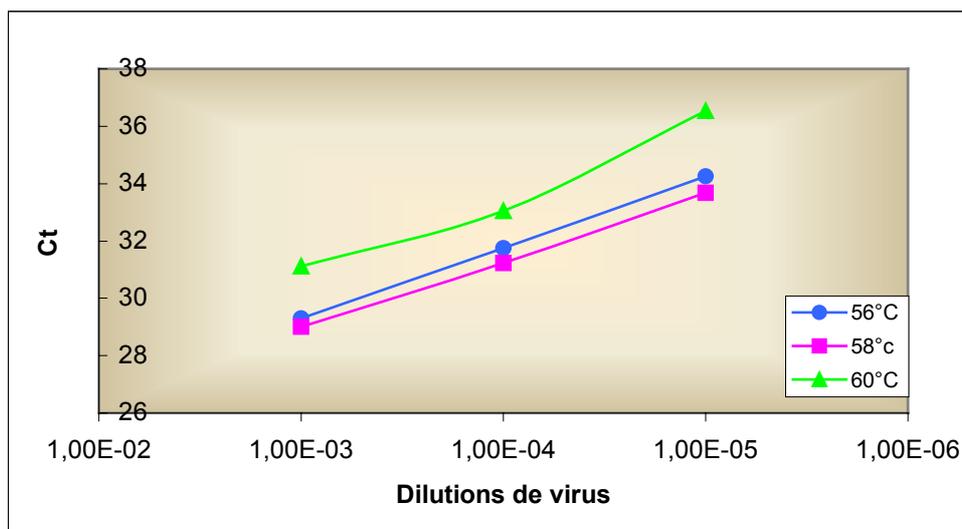


Figure 12 : Influence de la température sur l'efficacité de l'amplification de différentes dilutions du CMV en présence de 3 mM de $MgCl_2$

Sur la figure 12, la courbe à **58°C** présente des Ct inférieurs aux autres. De plus, celle-ci s'apparente à une droite ce qui témoigne d'une bonne linéarité des résultats.

1.3. Concentration en chlorure de magnésium (MgCl₂)

Dans un premier temps, nous avons testé les concentrations 3, 5 et 7 mM. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 3 et 5 mM donc par la suite nous avons travaillé sur 3, 4 et 5 mM.

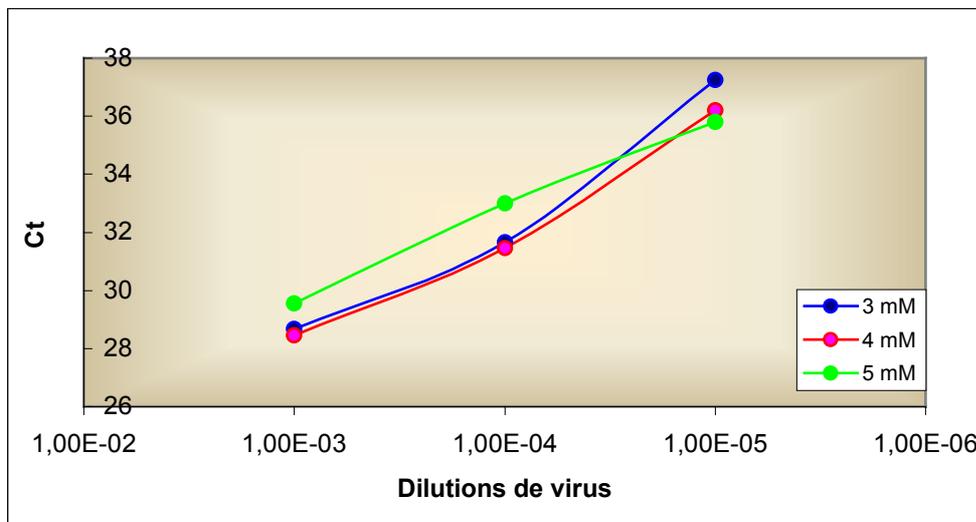


Figure 13 : Influence de la concentration en MgCl₂ sur l'efficacité de l'amplification de différentes dilutions du CMV pour une température d'hybridation de 58°C

En se basant sur les courbes (Figure 13), nous pouvons affirmer que **4 mM** est la concentration à retenir.

1.4. Influence de l'amplification simultanée du gène de l'albumine

1.4.1. Résultats de l'amplification parallèle et de la co-amplification d'une gamme de dilution du virus et d'une gamme d'albumine

Les conditions optimales de l'amplification du CMV ont été déterminées ci-dessus en utilisant un milieu réactionnel ne contenant pas les amorces et la sonde du gène de l'albumine. Nous avons donc réalisé deux amplifications en parallèle en les introduisant dans le milieu, pour vérifier leur influence :

- Celle d'une gamme d'albumine en l'absence de virus
- Celle d'une gamme des témoins positifs en l'absence d'albumine

Les résultats obtenus pour ces deux tests sont satisfaisants, les Ct n'ont pas été modifiés malgré la présence d'un couple d'amorces et d'une sonde étrangère.

Une co-amplification simultanée du gène de l'albumine et du virus a ensuite été effectuée en utilisant 9 extraits leucocytaires, obtenus chez un patient connu, pour lesquels une PCR compétitive ou une hybridation ont été réalisées (tableau 4).

Tableau 4 : Résultats obtenus avec les deux méthodes d'amplification

N° des extraits	Hybridation	PCR compétitive (en log de copies du CMV pour 10 ⁶ leucocytes)	PCR temps réel (en Ct)
1	Négative		>45
2	Négative		>45
3	Positive		27.1
4		5	31.8
5		5	34.31
6		<3	>45
7		4	>45
8		3.7	>45
9		<3	>45

Les résultats obtenus sont décevants. La technique de PCR en temps réel, ne détectant pas les charges virales inférieures à 4 log/10⁶ leucocytes, manque de sensibilité. Ceci s'explique par un phénomène de compétition entre les deux amplifications pour chacun des constituants du milieu réactionnel.

1.4.2. Modifications du milieu réactionnel pour l'amélioration des résultats

Pour remédier à ce problème, plusieurs solutions ont été envisagées et testées :

- Doubler la concentration en dNTP
- Doubler la concentration en Taq polymérase
- Utiliser une autre Taq polymérase (Taq platinum)

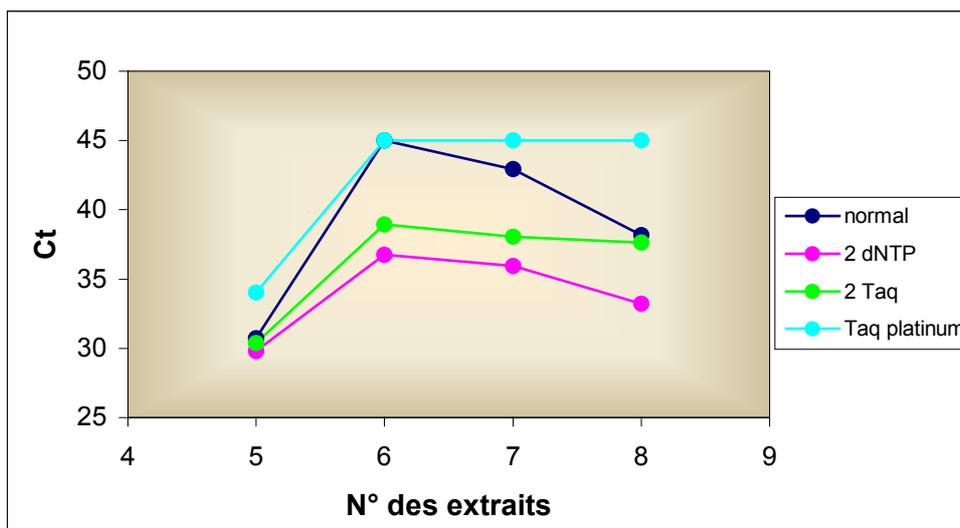


Figure 14 : Influence de la modification de composition du milieu réactionnel sur l'efficacité de l'amplification du CMV

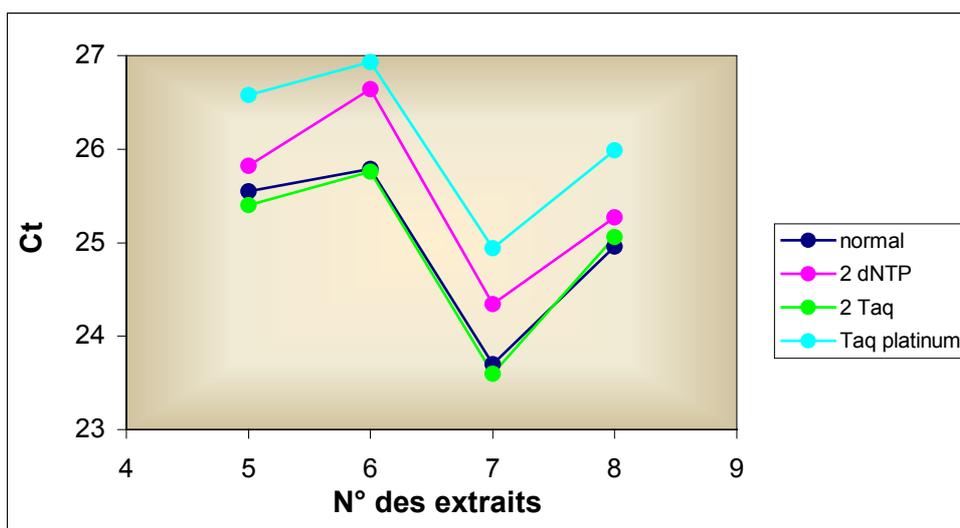


Figure 15 : Influence de la modification de composition du milieu réactionnel sur l'efficacité de l'amplification du gène de l'albumine

Les courbes (Figure 14 et 15) montrent une nette amélioration lorsque la concentration en nucléotides ou celle en Taq polymérase sont doublées, le phénomène de compétition disparaît. Pour des raisons de coût, il est préférable de **doubler la concentration en nucléotides**.

1.5. Durée des trois étapes du cycle

Les premières manipulations ont été réalisées avec une durée de 20 secondes pour chacune des étapes du cycle. Mais ce profil type peut être modifié pour optimiser la technique

et surtout réduire la durée de celle-ci. Des modifications de profil ont été testées sur l'amplification d'échantillons de virus et de gène de l'albumine.

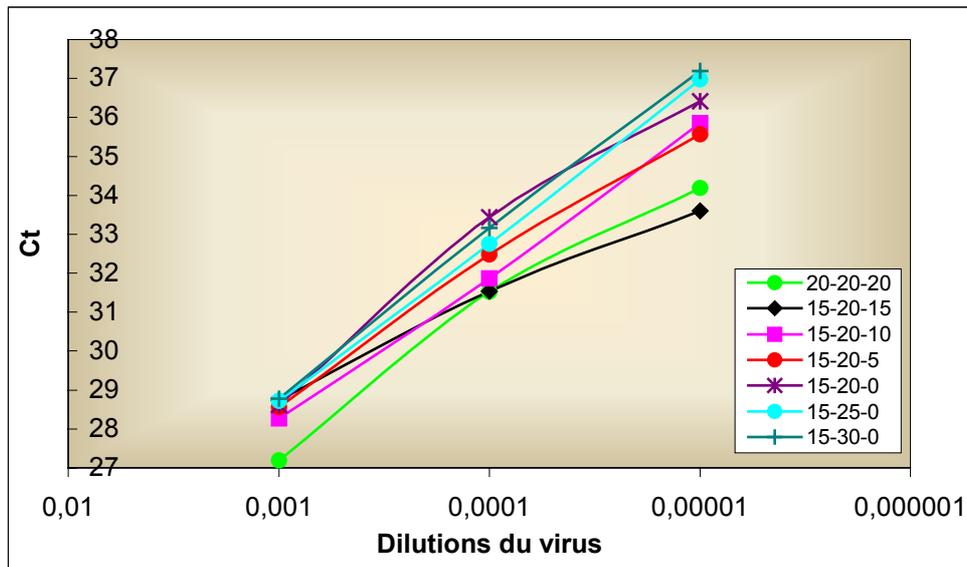


Figure 16 : Influence de la durée des trois étapes du cycle sur l'efficacité de l'amplification du CMV

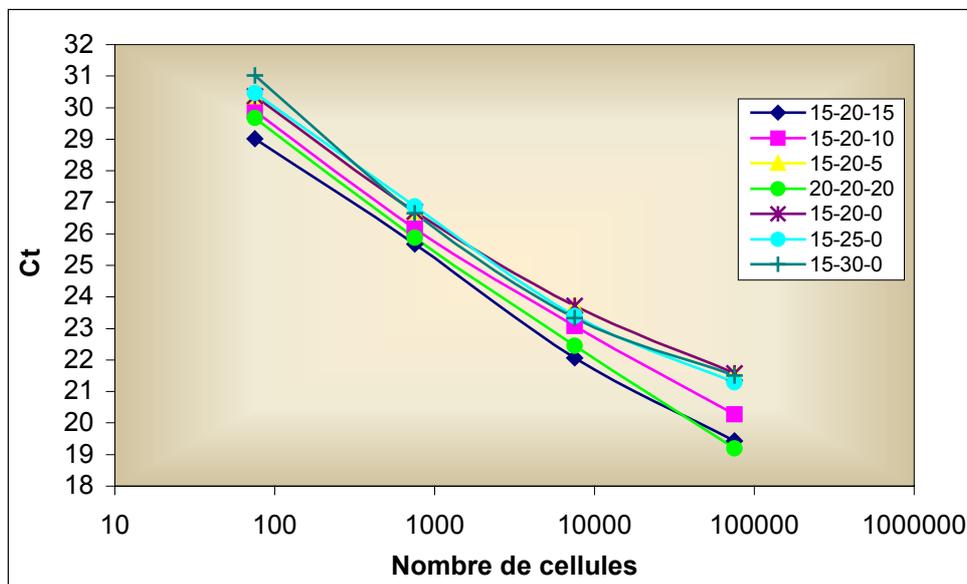


Figure 17 : Influence de la durée des trois étapes du cycle sur l'efficacité de l'amplification du gène de l'albumine

D'après les courbes (Figures 16 et 17), le profil défini par 15 secondes de dénaturation, 20 secondes d'hybridation et 10 secondes d'élongation semble être le meilleur

compromis entre la réduction de la durée de la technique et celle des Ct qui témoigne de l'augmentation de la sensibilité. De plus, il présente une bonne linéarité.

1.6. Spécificité

Une amplification de témoins positifs pour d'autres virus de la famille *Herpesviridae* a été réalisée pour tester la spécificité des amorces et de la sonde : HSV1 – HSV 2 – VZV – EBV – HHV 6 – HHV 8. Aucun de ces échantillons ne s'est révélé positif, la méthode permet donc d'amplifier spécifiquement le génome du CMV.

1.7. Conditions définitives de la PCR en temps réel

Les différentes manipulations réalisées au cours de la mise au point de la technique nous ont permis de déterminer la composition finale du milieu réactionnel.

Pour une réaction nécessitant 22.5 µl de milieu, nous utilisons :

- 0.125 µl de Taq polymérase avec 2.5 µl de tampon 10X et 4 µl de MgCl₂
- 0.375 µl de chacune des amorces du CMV et du gène de l'albumine dont la concentration finale est de 0.3 µM
- 0.125 µl de chacune des deux sondes pour obtenir 0.1 µM de concentration finale
- 4 µl de nucléotides
- 2.5 µl d'extrait et 10.125 µl d'eau distillée stérile

Pour chaque série de réactions réalisée, sont ajoutés un témoin négatif et des témoins positifs.

La programmation des cycles d'amplification comprend une première étape de 15 minutes à 95°C puis 45 cycles d'amplification de trois étapes : 15 secondes à 94°C, 20 secondes à 58°C et 10 secondes à 72°C.

2. Validation de la technique

2.1. Préparation de la gamme d'étalonnage

Après la ligation du produit de PCR au plasmide et la transformation des cellules JM109, des colonies blanches supposées contenir le plasmide ayant intégré l'amplicon ont été réisolées. Une électrophorèse en gel de polyacrylamide a été réalisée sur les produits obtenus après extraction plasmidique et digestion enzymatique par l'enzyme de restriction EcoR1. La

bande obtenue est identique pour les différents échantillons, avec un poids moléculaire légèrement supérieur à celui du produit de PCR initial, ce qui s'explique par la présence de séquences plasmidiques de part et d'autre de la séquence cible après digestion avec l'enzyme de restriction.

La concentration de la solution mère, déterminée par la mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 260 nm, est de 0.7 µg/µl d'ADN. Le nombre de copies (y) contenu dans 1 µg d'ADN est obtenu par le calcul suivant : $y = 10^{-6} * 6.023 \cdot 10^{23} / (660 * 3082) = 3 \cdot 10^{11}$ copies avec : 6.023 10²³ : nombre d'Avogadro

660 : poids moléculaire d'une paire de bases

3082 : nombre total de paires de bases du plasmide ayant intégré l'amplicon

Le nombre de copies par µl est obtenu en multipliant (y) par la concentration du spectrophotomètre.

La concentration finale de la solution mère est donc de 2.1 10¹¹ copies/µl.

Pour préparer la gamme de standard, nous avons calculé le nombre de copies présentes dans une réaction contenant 2.5 µl d'extrait. Pour la solution mère, nous obtenons 5 10¹¹ copies par réaction.

Une dilution initiale au 1/5^{ème} puis des dilutions successives de raison 10 nous conduisent à une gamme allant de 1 copie à 10¹¹ copies par réaction.

2.2. Résultats de l'amplification de la gamme standard

La gamme amplifiée contient les dilutions de 1 copie à 10⁷ copies par réaction. Les courbes d'amplification et la courbe étalon correspondant sont représentées sur la figure 18.

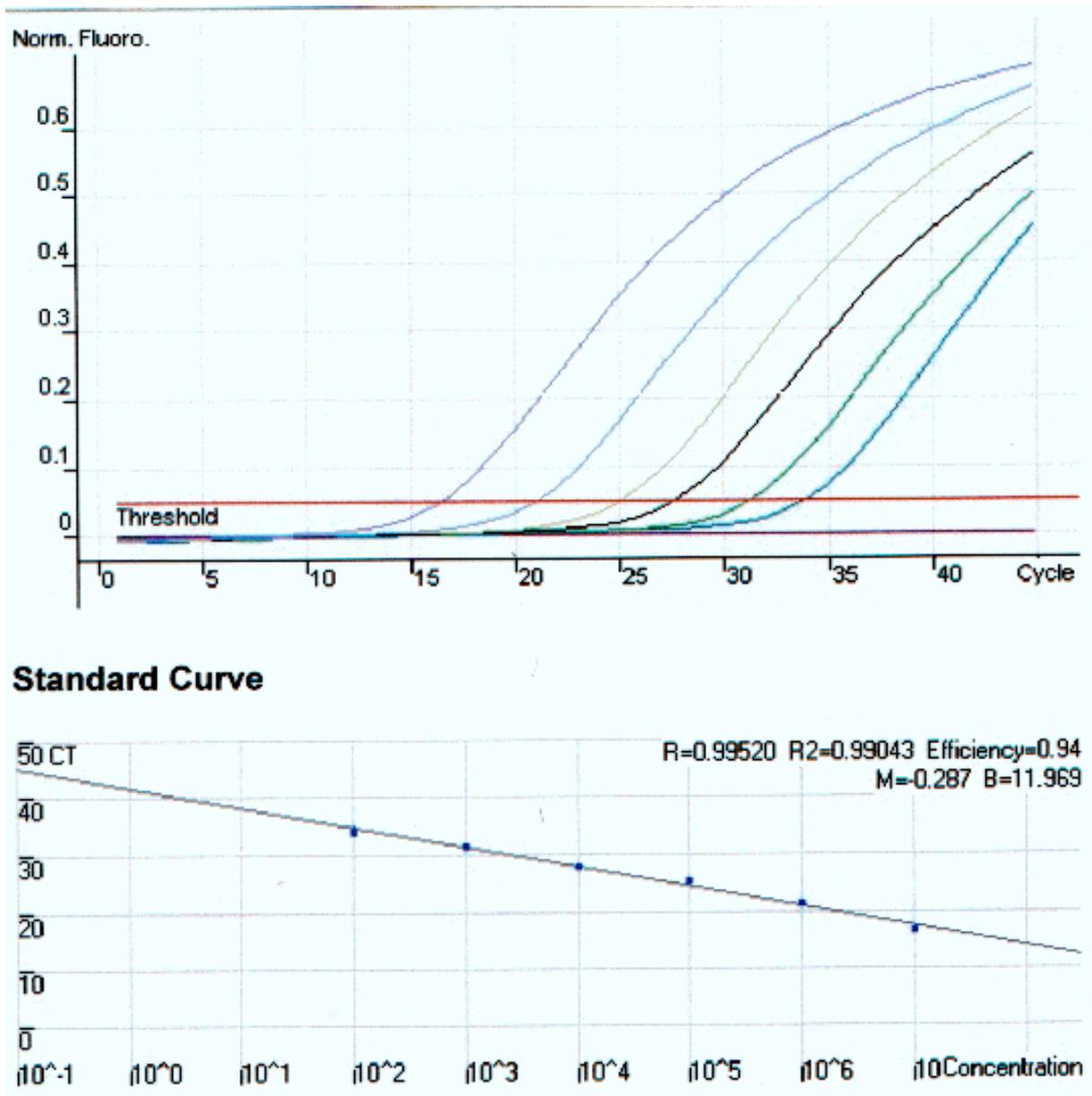


Figure 18 : (A) Réaction d'amplification des différentes dilutions de la gamme standard.
 (B) Courbe étalon permettant de calculer le coefficient de corrélation linéaire R et l'efficacité de la réaction (efficiency)

Le témoin négatif reste bien négatif. Seule la dilution correspondant à la quantité théorique de 1 copie/réaction ne donne pas lieu à une amplification. La linéarité a été calculée pour des dilutions correspondant de 10^2 à 10^7 copies/réaction. Elle est excellente car le coefficient de corrélation obtenu est de 0.995. Il en est de même pour l'efficacité qui est proche de 1.

2.3. Critères de validation

2.3.1. Sensibilité

La sensibilité de la méthode est représentée par la plus faible dilution du virus donnant lieu à une amplification dans 100% des expériences. Elle est de **100 copies/réaction**.

2.3.2. Reproductibilité

2.3.2.1. Résultats obtenus avec les gammes du CMV et du gène de l'albumine

La reproductibilité ou variabilité inter-essai consiste à réaliser 10 expériences, avec le même milieu réactionnel, pour toutes les dilutions de chacune des deux gammes d'étalonnage. Les coefficients de variation (CV) sont ensuite calculés à partir des 10 mesures obtenues.

Tableau 5 : Moyennes des Ct et coefficients de variation obtenus pour chaque dilution du virus lors de la reproductibilité

Dilution du virus en copies/réaction	1	10	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁶
Moyenne des Ct			32.9	29.4	25.1	21.9	18.1
CV (en %)			4.80	1.59	1.50	3.46	1.90

Tableau 6 : Moyennes des Ct et coefficients de variation obtenus pour chaque dilution du gène de l'albumine lors de la reproductibilité

Gamme albumine en cellules/réaction	75	750	7 500	75 000
Moyenne des Ct	30.3	26.4	22.9	19.9
CV (en %)	1.99	0.82	0.48	1.05

Les deux paramètres n'ont pas pu être calculés pour les points de gamme qui n'ont pas été amplifiés dans toutes les expériences. Pour les autres dilutions de standard, les valeurs des coefficients de variation sont comprises entre 0,48 et 4,80 %. Ces résultats sont satisfaisants.

2.3.2.2. Résultats obtenus avec des extraits leucocytaires d'un patient

Les mêmes 10 expériences ont été menées sur 4 extraits leucocytaires d'un patient. Les tableaux ci-dessous montrent les coefficients de variation obtenus pour le nombre de copies virales et pour le nombre de cellules.

Tableau 7 : Coefficients de variation obtenus pour chaque extrait leucocytaire lors de la reproductibilité

Extraits leucocytaires	1	2	3	4
CV pour le nombre de copies virales (%)	1.22		3.32	3.08
CV pour le nombre de cellules (%)	0.48	0.98	0.56	0.82

Les valeurs de CV sont très satisfaisantes puisqu'elles sont comprises entre 0,48 et 3,32 %.

2.3.3. Répétabilité

2.3.3.1. Résultats obtenus avec les gammes du CMV et du gène de l'albumine

La répétabilité ou variabilité intra-essai est réalisée en testant 10 réplicates de chaque dilution des deux gammes dans une même expérience avec le même milieu réactionnel. Les coefficients de variation sont ensuite calculés à partir des 10 mesures obtenues.

Tableau 8 : Moyennes des Ct et coefficients de variation obtenus pour chaque dilution du virus lors de la répétabilité

Dilution du virus en copies/réaction	1	10	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁶
Moyenne des Ct			33.2	29.3	24.9	21.5	17.8
CV (en %)			3.63	3.64	2.07	0.59	0.51

Tableau 9 : Moyennes des Ct et coefficients de variation obtenus pour chaque dilution du gène de l'albumine lors de la répétabilité

Gamme albumine en cellules/réaction	75	750	7 500	75 000
Moyenne des Ct	30	26.4	23	19.9
CV (en%)	1.10	0.42	0.56	0.59

Les CV se situent entre 0,42 et 3,64 %, ces résultats sont donc convenables.

2.3.3.2. Résultats obtenus avec les extraits leucocytaires d'un patient

La répétabilité a également été testée sur les 4 extraits leucocytaires, les résultats obtenus sont les suivants :

Tableau 10 : Coefficients de variation obtenus pour chaque extrait leucocytaire lors de la répétabilité

Extraits leucocytaires	1	2	3	4
CV pour le nombre de copies virales (%)	0.85		1.61	3.52
CV pour le nombre de cellules (%)	0.80	0.47	0.98	0.59

Les valeurs de CV sont comprises entre 0.47 et 3.52 %, elles sont donc satisfaisantes.

2.4. Test croisé entre les gammes du cytomégalovirus et du gène de l'albumine

Notre technique réalise à la fois l'amplification de l'ADN viral et humain (gène de l'albumine), nous avons donc voulu tester sa sensibilité lorsque l'un des ADN est en concentration beaucoup plus faible ou beaucoup plus forte que l'autre.

Pour cela, des solutions titrées en ADN ont été préparées en mélangeant, en quantités égales, chacune des dilutions du CMV avec chacune des dilutions du gène de l'albumine. De cette opération, résulte une dilution au ½ de tous les points de gamme. Ces derniers sont donc composés pour le CMV de 0.5, 5, 50, 500, 5 000, 50 000 et 500 000 copies/réaction et pour le gène de l'albumine de 37.5, 375, 3 750 et 37 500 cellules/réaction.

Tableau 11 : Résultats obtenus pour le test croisé en nombre de copies virales en fonction du nombre de cellules

Nombre de copies virales	0,5	5	50	500	5 000	50 000	500 000
37.5 cellules	0	0	33	3 596	10 011	63 977	551 015
375 cellules	0	0	0	432	10 248	140 132	700 405
3 750 cellules	0	0	0	2 430	11 588	126 864	725 431
37 500 cellules	0	0	0	15	3 431	45 036	641 553

Pour le CMV, la première dilution donnant lieu à 100% d'amplification est 500 copies/réaction. La sensibilité, pour cette expérience, est donc comprise entre 50 et 500 copies/réaction. Ce résultat concorde bien avec la sensibilité de 100 copies/réaction retrouvée auparavant.

Les résultats obtenus sont corrects dans l'ensemble, ils sont même un peu forts par rapport ceux attendus sauf pour les tests réalisés avec 37 500 cellules où une baisse est observée pour chaque dilution du génome viral. La dilution limite pour le gène de l'albumine est 3 750 cellules. Pour des valeurs supérieures, une dilution de l'extrait est nécessaire.

Lors de la réaction d'amplification du gène de l'albumine, une anomalie est survenue. Les résultats ci-dessous sont donc exprimés en Ct et non en nombre de cellules.

Tableau 12 : Résultats de l'amplification du gène de l'albumine en Ct en fonction du nombre de copies virales

Gène de l'albumine	37.5 cellules	375 cellules	3 750 cellules	37 500 cellules
0.5 copies	33.5	30	25.9	23.8
5 copies	33.5	30	25.9	24.0
50 copies	33.5	30	25.9	23.9
500 copies	33.5	30	25.8	23.9
5 000 copies	33.5	30	26.0	23.9
50 000 copies	37	30	25.8	23.9
500 000 copies	41	32	26.4	24.0

Pour les premières dilutions, les résultats sont très satisfaisants car les Ct sont homogènes. La dilution de 500 000 copies virales présente des Ct supérieurs car le grand nombre de copies empêche une amplification du gène de l'albumine dans de bonnes conditions. Cependant, lors de la mise en routine de la technique, des charges virales correspondant à 500 000 copies/réaction ne seront jamais observées.

Les résultats de ce test confirment bien que notre technique présente une bonne sensibilité quelque soit les concentrations des deux ADNs.

2.5. Application de la technique dans le suivi d'une patiente

Mademoiselle M, âgée de 22 ans, est atteinte d'une mucoviscidose. Elle subit une première transplantation cœur-poumon en 1992, une deuxième transplantation bi-pulmonaire en 1997, une troisième rénale en 2000 puis une dernière greffe du cœur en janvier 2003. Cette dernière opération met en jeu une discordance des sérologies du CMV (donneur + et receveur -). Un traitement préventif par le Valaciclovir est alors instauré. Fin mars 2003, la patiente présente une altération de son état général et de la fièvre. Une PCR CMV est réalisée et s'avère positive donc un traitement curatif par du ganciclovir est mis en place. Devant la persistance d'une charge virale élevée, le ganciclovir est remplacé par sa prodrogue, le valganciclovir qui donne de bons résultats. Mais une récurrence au mois de juin, fait apparaître une résistance au ganciclovir. Le foscarnet lui est donc prescrit et celui-ci présente une bonne efficacité.

Les nombreux prélèvements réalisés sur cette patiente nous permettent de tester notre technique afin d'y apporter certaines modifications.

2.5.1. Influence de la technique de préparation de l'ADN

Des variations dans la préparation des échantillons ont été testées, en réalisant une PCR après :

- Ebullition seule
- Extraction Qiagen seule
- Ebullition + extraction Qiagen

Tableau 13 : Résultats de l'amplification du CMV en nombre de copies virales/réaction obtenus après différentes préparations de l'ADN

N° des échantillons	Ebullition seule	Extraction seule	Ebullition + extraction
1	39	1045	127
2	0	43	77
3	0	1	0

Tableau 14 : Résultats de l'amplification du gène de l'albumine en nombre de cellules/réaction obtenus après différentes préparations de l'ADN

N° des échantillons	Ebullition seule	Extraction seule	Ebullition + extraction
1	438	2661	3365
2	414	694	2957
3	293	370	431

Sur l'ensemble des tableaux, les meilleurs résultats sont obtenus lorsque l'ADN est soumis à une ébullition suivie d'une extraction, ce sera donc la méthode retenue pour le traitement de l'ensemble des échantillons.

2.5.2. Modifications des conditions de la PCR

Sur les échantillons présentant une faible charge virale, un manque de sensibilité de notre technique a été mis en évidence par rapport à la PCR compétitive. Nous avons donc été amenés à réaliser des modifications notamment en :

- Multipliant la concentration en amorces par 2
- Déposant 5 µl d'extrait d'ADN
- Multipliant la concentration en amorces et en déposant 5 µl

Ces conditions ont été testées, dans une même réaction, en modifiant la composition du milieu réactionnel en fonction des besoins. Les résultats sont indiqués dans les tableaux 15 et 16.

Tableau 15 : Résultats de l'amplification du CMV en nombre de copies virales/réaction obtenus lors des différentes modifications des conditions de la PCR

N° des échantillons	Concentration en amorces par 2	Dépôt de 5 µl	Concentration en amorces par 2 + dépôt de 5 µl
4	3962	3277	1624
5	48	35	9
6	0	0	0
7	0	14	0
8	11	16	0

Tableau 16 : Résultats de l'amplification du gène de l'albumine en nombre de cellules/réaction obtenus lors des différentes modifications des conditions de la PCR

N° des échantillons	Concentration en amorces par 2	Dépôt de 5 µl	Concentration en amorces par 2 + dépôt de 5 µl
4	10279	7900	1716
5	438	336	107
6	415	367	223
7	12	5	1
8	421	397	3

Les tests réalisés avec une concentration en amorces multipliée par deux ou avec un dépôt de 5 µl donnent de bons résultats, surtout pour les faibles quantités de virus. Une autre expérience nous a permis de faire une comparaison entre un dépôt de 5 et 10 µl, mais les résultats ne sont pas meilleurs avec 10 µl.

2.5.3. Nouvelles conditions définitives de la PCR en temps réel

Suite aux différentes expériences menées ci-dessus et à l'étude de techniques de PCR en temps réel développées dans d'autres laboratoires, nous avons décidé d'effectuer des dépôts de 5 µl. Une nouvelle gamme d'étalonnage du génome viral a du être réalisée en comprenant 1, 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ et 10⁶ copies dans 5 µl et non plus 2.5 µl. De même pour la gamme du gène de l'albumine. Le nouveau volume de milieu réactionnel est donc de 20 µl. Dans la composition du milieu réactionnel, la quantité d'eau est modifiée mais ceci ne change pas les concentrations des autres constituants.

2.5.4. Etude de la corrélation entre la PCR en temps réel et la PCR compétitive

Pour vérifier les conditions définitives de notre technique, certains échantillons de Melle M ont été testés à la fois par la technique de PCR compétitive et par celle en temps réel.

Tableau 17 : Charges virales, exprimées en Log de copies pour 10^6 cellules, obtenues pour des extraits leucocytaires par les PCRs en temps réel et compétitive

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PCR en temps réel	5.3	4.8	2.9	6.1	5.4	5.4	4.8	4.7	4.2	0
PCR compétitive	4	4	3.7	6	5.7	4.7	4.7	4.7	4	<3

Pour étudier la corrélation des résultats obtenus, nous avons tracé le graphique ci-dessous.

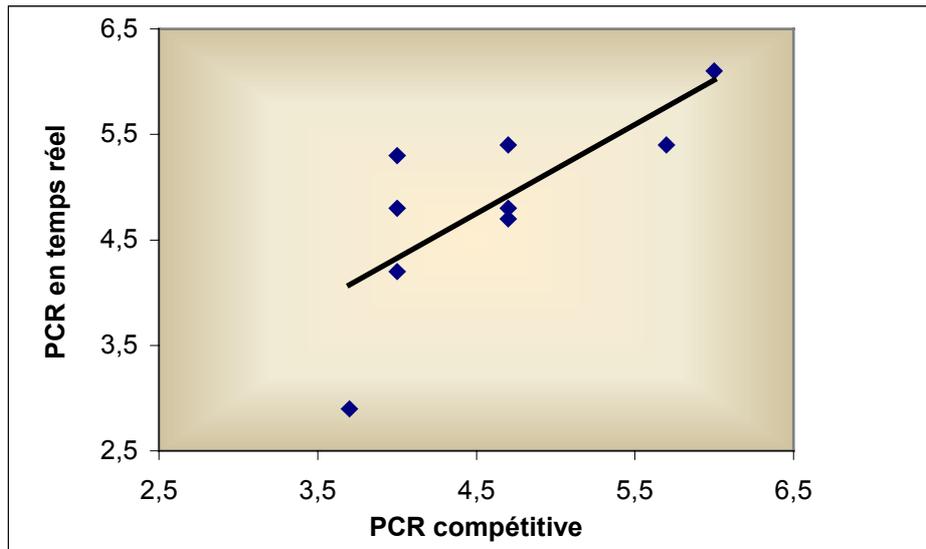


Figure 19 : Schéma des résultats de charges virales de la PCR en temps réel en fonction de ceux de la PCR compétitive

Le coefficient de corrélation calculé est de 0.74. La faiblesse du résultat s'explique par le faible nombre d'échantillons testés et surtout par le fait que la PCR compétitive est une méthode semi-quantitative à la différence de la PCR en temps réel qui est quantitative. Ce coefficient est donc acceptable.

D – DISCUSSION

Le CMV n'entraîne que rarement des signes cliniques sauf chez les patients immunodéprimés et pendant la grossesse où il devient d'une extrême gravité. Des thérapeutiques existent actuellement pour stopper la réplication virale lors des infections actives. Cependant, la mise en place du traitement nécessite un diagnostic précoce de la maladie. Notre objectif était de développer une nouvelle technique de PCR permettant

d'obtenir une réponse plus rapide et plus précise par rapport à celle utilisée actuellement au laboratoire.

Notre technique est une PCR en temps réel basée sur la technologie TaqMan, elle amplifie simultanément une partie du gène viral US 8, qui est une région conservée et spécifique du CMV, et le gène de l'albumine.

La mise au point de la technique a permis d'optimiser les conditions opératoires (concentration des constituants du milieu réactionnel, température de l'étape d'hybridation, durée des trois étapes du cycle...) et de tester la spécificité par rapport à d'autres virus de la même famille, susceptibles d'avoir des séquences génomiques semblables (HSV 1 et 2, VZV, EBV, HHV 6 et 8).

Ensuite nous avons procédé à la validation qui a été réalisée par clonage de l'amplicon du virus dans un plasmide suivi d'une sélection des bactéries transformées puis par extraction plasmidique. Par dilution de la solution mère de ce standard externe, nous avons obtenu une gamme d'étalonnage allant de 1 à 10^6 copies/réaction. A partir de cette gamme, ont été déterminés différents critères notamment la sensibilité qui est de 100 copies/réaction et la linéarité allant de 10^2 à 10^6 copies/réaction. Les coefficients de variation calculés pour les essais de reproductibilité et répétabilité sont inférieurs à 5 %. Ces deux essais ont également été réalisés sur des extraits leucocytaires d'un patient et ont donné d'aussi bons résultats.

Le test croisé entre la gamme du CMV et celle du gène de l'albumine a confirmé la bonne sensibilité de la technique, même lorsque les concentrations en virus et en cellules de l'échantillon sont très différentes. Seul un nombre de cellules supérieur à 3750 par réaction entraîne une diminution du nombre de copies virales amplifiées et nécessite de recommencer la manipulation en diluant l'extrait. Mais ce test a été réalisé dans les conditions initiales avec un dépôt de 2.5 μ l d'extrait d'ADN, il faudrait donc le refaire dans les conditions définitives qui présentent une meilleure sensibilité.

Avec l'application de notre technique au suivi d'une patiente, nous avons pu étudier l'influence du mode de préparation de l'ADN et procéder à l'optimisation des conditions opératoires de la PCR dans le but d'améliorer la sensibilité.

La technique développée est donc sensible, spécifique du CMV et reproductible.

Cependant, son application à un plus grand nombre de patients est nécessaire avant son utilisation au laboratoire.

Quelques laboratoires ont également développé leur technique de PCR en temps réel basée sur la technologie TaqMan pour la quantification de la charge virale du CMV. La région amplifiée par Mengelle *et al*, 2003 et Gault *et al*, 2001 est située dans le gène UL 83 et celle amplifiée par Najjioullah *et al*, 2001 est située dans le gène HXFL 4. Aucune étude n'a pu définir la région la plus appropriée à cette amplification.

Les trois laboratoires ajoutent, au milieu réactionnel, 10 µl d'extrait d'ADN, cependant un volume aussi important favorise la présence d'inhibiteurs de la PCR. C'est pourquoi nous avons débuté nos travaux avec un dépôt de 2.5 µl puis, pour augmenter la sensibilité de la méthode, nous sommes passés à 5 µl (Li *et al*, 2003).

La détermination de la charge virale peut être faite sur le plasma ou le sérum (Najjioullah *et al*, 2001), sur sang total (Li *et al*, 2003) ou sur la fraction leucocytaire comme dans notre technique. Le choix de l'une ou l'autre des méthodes reste très controversé. Mais dans tous les cas, une extraction de l'ADN est réalisée.

Dans notre méthode, l'amplification du virus sert à la détermination du nombre de copies virales et celle du gène de l'albumine sert à la quantification des cellules granuleuses qui sont les principales cellules responsables de la dissémination du virus dans le sang. La charge virale, dans ce milieu, est donc fonction de la quantité de cellules. L'amplification du génome du CMV nécessite une préparation des prélèvements sanguins dans laquelle les cellules granuleuses sont récupérées par centrifugation et les ADNs, viral et cellulaire, sont extraits. L'amplification du gène de l'albumine permet d'obtenir un résultat sur lequel le rendement de ces deux étapes n'interfère pas. Il est identique pour les deux ADNs donc l'expression des résultats sous forme de rapport (nombre de copies virales/10⁶ cellules) entraîne son annulation.

Mengelle *et al*, 2003 ne dénombrent pas les leucocytes, mais l'absorbance de l'extrait d'ADN est mesurée par spectrophotométrie et 150 ng sont ajoutés au milieu réactionnel. Les résultats sont donnés en log de copies/capillaire, ce qui ne permet pas de comparer ces résultats avec ceux d'une autre technique. Dans la technique proposée par Gault *et al*, 2001, la détermination du nombre de leucocytes est réalisée par l'amplification du gène de l'albumine mais celle-ci est effectuée dans un tube différent de celle du génome viral. Des petites variations de rendement de la PCR peuvent survenir entre les deux tubes induisant une erreur sur le résultat. Mais surtout le nombre de tubes nécessaires à la réalisation de la technique est multiplié par deux donc le coût est supérieur. Li *et al*, 2003 rendent leurs résultats en nombre de copies/ml de sang total or, en cas de leucopénie, une faible valeur de la charge virale peut être mesurée alors que la réplication du virus est intense.

L'amplification du gène cellulaire, dans notre technique, présente un autre avantage car elle nous permet de nous affranchir de l'utilisation d'un contrôle interne (Najioullah *et al*, 2001) pour détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR.

De nombreux travaux ont comparé les résultats de la PCR en temps réel avec ceux obtenus par d'autres méthodes de quantification utilisées en routine. Mengelle *et al*, 2003 ainsi que Gault *et al*, 2001 ont établi une corrélation entre les résultats de la PCR en temps réel et ceux de l'antigénémie pp65. L'utilisation de la PCR permet donc d'obtenir des résultats similaires à ceux de l'antigénémie en s'affranchissant des inconvénients de cette dernière qui sont :

- Un délai entre le prélèvement et la réalisation de la méthode inférieur à trois heures
- La nécessité d'un technicien expérimenté
- Une technique longue

Malgré le faible nombre d'échantillons testés dans notre étude, nous avons pu observer que les résultats de notre PCR en temps réel présentaient une certaine concordance avec ceux de la PCR compétitive utilisée au laboratoire. La mise en routine de la PCR en temps réel permettrait de s'affranchir des inconvénients présentés par celle compétitive :

- L'imprécision de la numération des leucocytes qui est réalisée manuellement sur un échantillon du prélèvement
- Le risque de contamination post-PCR survenant au cours de la révélation sur gel
- La longueur de la technique
- La difficulté de standardisation

Mais l'avantage majeur de cette nouvelle technique est la grande précision du résultat. La PCR compétitive n'est qu'une approche semi-quantitative car le résultat est extrapolé par comparaison des bandes obtenues pour le prélèvement avec celles du standard. Cette grande précision va donc permettre d'effectuer un meilleur suivi des patients et surtout de prévenir l'apparition des maladies à CMV par la mise en place d'un traitement précoce. Cependant aucun seuil de charge virale n'est défini pour l'initialisation du traitement car celui-ci varie en fonction de la technique et de la pathologie primaire présentée par les patients.

Conclusion

Les étapes de mise au point et de validation nous ont permis de développer une technique de PCR en temps réel spécifique, sensible et reproductible, pour la détermination de la charge virale du CMV. La nouveauté de cette technique, par rapport à celles développées dans d'autres laboratoires, est la co-amplification, dans un même tube, du génome viral et du gène de l'albumine permettant l'obtention de résultats précis, exprimés en nombre de copies virales pour 10^6 leucocytes. L'application au suivi d'un plus grand nombre de patients est cependant nécessaire avant la mise en routine de cette quantification, pour confirmer ses performances.

Cette technique pourrait alors faire l'objet d'une commercialisation. Cependant l'obstacle majeur est la faible étendue du marché potentiel qui est réduit aux seuls laboratoires hospitaliers. En effet, les populations à risque, nécessitant un dépistage et une surveillance de la maladie, font l'objet d'un suivi hospitalier. C'est pourquoi les techniques de quantification du CMV ne sont jamais réalisées en laboratoire d'analyses médicales de ville.

Annexes

MgCl ₂	Dilutions	Températures		
		56°C	58°C	60°C
3 mM	témoin+ 10 ⁻³	29,30	29,00	31,12
	témoin+ 10 ⁻⁴	31,75	31,23	33,04
	témoin+ 10 ⁻⁵	34,26	33,67	36,53
	témoin+ 10 ⁻⁶	37,19	>45	36,56
5 mM	témoin+ 10 ⁻³	29,48	29,25	31,00
	témoin+ 10 ⁻⁴	31,77	31,42	33,23
	témoin+ 10 ⁻⁵	34,95	35,03	35,52
	témoin+ 10 ⁻⁶	>45	37,35	37,01
7 mM	témoin+ 10 ⁻³	30,19	30,22	31,97
	témoin+ 10 ⁻⁴	32,94	32,65	33,97
	témoin+ 10 ⁻⁵	35,48	35,01	34,43
	témoin+ 10 ⁻⁶	35,29	40,15	37,02

Résultats de l'amplification du génome viral (en Ct) en fonction de la concentration en MgCl₂ et de la température

MgCl ₂	Dilutions du virus			
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
3 mM	28,68	31,67	37,24	>45
4 mM	28,45	31,46	36,20	>45
5 mM	29,56	33,00	35,80	>45

Résultats de l'amplification du génome viral (en Ct) à 58°C pour différentes concentrations de MgCl₂

N° des extraits	Mix normal	dNTP*2	Taq pol*2	Taq platinum
5	30.71	29.79	30.36	34.02
6	>45	36.74	38.93	>45
7	42.94	35.96	38.04	>45
8	38.19	33.23	37.63	>45

Résultats en Ct de l'amplification du CMV obtenus avec différentes compositions de Mix

N° des extraits	Mix normal	dNTP*2	Taq pol*2	Taq platinum
5	25.55	25.82	25.4	26.58
6	25.79	26.64	25.76	26.93
7	23.7	24.34	23.6	24.94
8	24.96	25.27	25.06	25.99

Résultats en Ct de l'amplification du gène de l'albumine obtenus avec différentes compositions de Mix

Durées des étapes (s)	Dilution du virus			
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
20-20-20	27,19	31,52	34,19	>45
15-20-15	28,74	31,53	33,60	>45
15-20-10	28,27	31,87	35,85	>45
15-20-5	28,56	32,48	35,57	>45
15-20-0	28,61	33,44	36,41	>45
15-25-0	28,72	32,75	36,98	>45
15-30-0	28,78	33,16	37,20	>45

Résultats en Ct de l'amplification du CMV pour différentes durées des 3 étapes du cycle

Durées des étapes (s)	Nombre de cellules			
	75	750	7500	75000
20-20-20	29,67	25,88	22,46	19,20
15-20-15	29,01	25,67	22,06	19,43
15-20-10	29,89	26,16	23,08	20,27
15-20-5	30,15	26,61	23,59	21,33
15-20-0	30,37	26,71	23,72	21,57
15-25-0	30,46	26,88	23,40	21,29
15-30-0	31,03	26,65	23,33	21,51

Résultats en Ct de l'amplification du gène de l'albumine (dont la concentration est exprimée en nombre de cellules) pour différentes durées des 3 étapes du cycle

Protocole de séparation des leucocytes polynucléés: DEXTRAN

1) 3 ml de sang total + 0,75 ml de Dextran 6% (Sigma ref D1390 100g).

Agiter par retournements.

Centrifugation 10 minutes à 500 tours (*programme 4 , centrif JOUAN C422*)

2) Prélever toute la phase supérieure avec une pastette (*récupération des GB*) dans un tube sérothèque. Eviter de prélever les hématies

Centrifuger 5 minutes à 2000 trs (centrifugeuse JOUAN A14).

3) Reprendre le culot dans 1 ml de NH₄CL 0,8% (*lyse des GR résiduels*). Poirer. Laisser en contact 5 minutes à température ambiante.

Centrifuger 5 minutes à 2000 trs (centrifugeuse JOUAN A14).

4) Décanter et éliminer les hématies de surface avec environ 1 ml de PBS stérile, rejeter et resuspendre le culot dans 1 ml de PBS stérile. Bien homogénéiser.

Centrifuger 5 minutes à 2000 trs (centrifugeuse JOUAN A14).

5) Rejeter le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de PBS, homogénéiser et faire un numération si **Charge virale CMV**.

Centrifuger 5 minutes à 2000 trs (centrifugeuse JOUAN A14).

6) Rejeter le surnageant, égoutter le tube sur papier absorbant et reprendre le culot dans 0,15 ml à 0,5 ml de PBS stérile en fonction du culot. Répartir dans 2 tubes sérothèques.

PROTOCOLE Charge virale CMV

Ajuster la suspension de cellules à $2,5 \cdot 10^6$ C/ml: Calcul du volume de PBS (en ml)

Volume = Nbre de GB/ μ l divisé par 2500 ($1\mu\text{l} = 1\text{mm}^3$)

Faire 2 aliquots. Congeler à -20°C

Extraction d'ADN à partir de cellules éclatées

QIAmp DNA MiniKit

1- LYSE DES CELLULES

Les aliquots de cellules éclatées au Bain-marie 100°C sont de nouveau incubés 5mn à 100°C et centrifugés 10000 trs/5mn.

Prélever 200µl.

- ajouter 20 µl de proteinase K (QIAGEN) stockée à 4°C (porte du réfrigérateur).

Vortexer

- ajouter 200 µl de Buffer AL stocké à 4°C (porte du réfrigérateur). **Vortexer 15 s**
incuber **10 mn à 56 °C** bain marie à sec (pièce d'extraction).

2- EXTRACTION DE L'ADN SUR COLONNES QIAGEN

Préparer l'appareil « QIAVAC » et les colonnes suivant les recommandations du fabricant et brancher sur la trompe à vide. Créer le vide dans le Qiavac.

- ajouter 200 µl d'éthanol absolu avec un pipetman de 1000µl. Homogénéiser par aller-retours et déposer dans la colonne Qiagen.

attendre l'aspiration totale du liquide

3- LAVAGE de l'ADN

- ajouter 750 µl de solution de lavage AW1 à l'aide d'une pastette
attendre l'aspiration totale du liquide

- ajouter 750 µl de solution de lavage AW2 à l'aide d'une pastette
attendre l'aspiration totale du liquide

Retirer la colonne de son support et placez-la sur le tube collecteur Qiagen

Centrifuger **5mn à 14000 trs/mn**

4- ELUTION DE L'ADN EXTRAIT

- placer la colonne sur un tube eppendorf identifié de 1,5 ml.

- retirer l'alcool résiduel autour du filtre de la colonne à l'aide d'un cône de 10µl

- incuber 3mn à 65°C tube ouvert pour évaporer l'alcool résiduel.

- ajouter 100 µl **d'eau distillée stérile** .

- incuber 1 min à température ambiante.

- centrifuger 1 min à 8000 tr.

Bibliographie

André-Garnier E. *Cytomegalovirus et Herpesvirus Humain de type 6: étude de leur réplication au sein du système hématopoïétique* [Thèse d'Université]. Faculté de Pharmacie de Nantes; 2003.

Bogard M, Lamoril J. Analyse quantitative des acides nucléiques. In: Elsevier E, ed. *Biologie moléculaire en biologie clinique*. Vol. 1; 1998:119-144.

Bressollette-Bodin C. Développement d'une PCR en temps réel pour la quantification du BK virus. Application au suivi d'une cohorte de transplantés rénaux. [Thèse de doctorat]. Faculté de médecine de Nantes; 2003.

Colimon R, Minjolle S. Biologie du cytomégalovirus. In: Elsevier E, ed. *Cytomégalovirus* ;2002:3-14.

Collot S, Alain S, Denis F, Ranger-Rodez S. Quantification par PCR en temps réel, technologie TaqMan et applications en virologie. *Virologie*. 2001;5(6):439-448

Gault E, Michel Y, Dehée A, Belabani C, Nicolas JC, Garbarg-Chenon A. Quantification of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39(2):772-775.

Imbert-Marcille BM. Histoire naturelle des infections à cytomégalovirus. *Médecine thérapeutique*. 2001;7(8):577-584.

Li H, Dummer S, Este WR, Meng S, Wright PF, Tang YW. Measurement of Human Cytomegalovirus Loads by Quantitative Real-Time PCR for Monitoring Clinical Intervention in Transplant Recipients. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):187-191.

Mayaud C, Parrot A, Cadranel J. Cytomégalovirus-Clinique chez l'immunodéprimé. In: Elsevier E, ed. *Les Herpèsvirus Humains-Clinique/Biologie/Diagnostic*;1999 :183-208.

Mengelle C, Pasquier C, Rostaing L, Sandres-Sauné K, Puel J, Berges L, Righi L, Bouquies C, Izopet J. Quantitation of Human Cytomegalovirus in Recipients of Solid Organ Transplants by Real-Time Quantitative PCR and pp65 Antigenemia. *J Med Virol.* 2003;69:225-231.

Meyohas MC. CytomégaloVirus-Expressions cliniques chez l'immunocompétent. In : Elsevier E, ed. *Les Herpèsvirus Humains-Clinique/Biologie/Diagnostic*;1999 :173-182.

Najioullah F, Thouvenot D, Lina B. Development of a real-time PCR procedure including an internal control for the measurement of HCMV viral load. *J Virol Methods.* 2001;92(1):55-64.

Poirier-Toulemonde AS, Imbert-Marcille BM, Ferre-Aubineau V, Besse B, Le Roux MG, Cantarovich D, Billaudel S. Successful quantification of cytomegalovirus DNA by competitive PCR and detection with capillary electrophoresis. *Mol Cell Probes.* 1997;11(1):11-23.

Segondy M Réponse immunitaire au cours de l'infection à cytomégaloVirus. In : Elsevier E, ed. *CytomégaloVirus*; 2002:51-67.

Nom – Prénoms : GERBAUD Estelle

Titre de la Thèse : Quantification du cytomégalovirus par la technique de PCR en temps réel

Résumé de la Thèse :

Ce travail a consisté à développer une technique de PCR en temps réel pour la quantification du CMV dans la fraction leucocytaire du sang. Une co-amplification du génome viral et du gène de l'albumine a été effectuée, dans un même tube, pour obtenir un résultat précis sur lequel les rendements des étapes de préparation de l'ADN et d'amplification n'interfèrent pas. Tout d'abord, nous avons optimisé les paramètres opératoires pour obtenir les meilleures conditions de réalisation de la technique et testé sa spécificité. Puis par clonage plasmidique, nous avons réalisé une gamme standard avec laquelle ont été évalués la sensibilité, la linéarité et la reproductibilité de la méthode. L'application de la PCR à de véritables prélèvements biologiques a permis d'apporter des modifications pour augmenter la sensibilité de cette méthode.

MOTS CLES :

Cytomégalovirus – quantification - PCR temps réel – TaqMan – co-amplification – gène de l'albumine

JURY

PRESIDENT : Madame Sylvianne BILLAUDEL - Professeur de Virologie

ASSESEURS : Madame Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE - Professeur de Virologie

Madame Céline BODIN-BRESSOLLETTE - Médecin biologiste

Adresse de l'auteur : 6 rue de l'école
85240 Nieul sur l'Autize