

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2019

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)
et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 20 mai 2019 à NANTES
par Mademoiselle IRIMIA Alix

Dynamique de réplication des torques teno virus dans une cohorte de patients cérébro-lésés

Composition du jury :

Président :

Monsieur le Professeur LEVEQUE Nicolas, PU-PH, CHU de Poitiers

Membres :

Madame le Professeur IMBERT Berthe-Marie, PU-PH, CHU de Nantes

Monsieur le Professeur ROQUILLY Antoine, PU-PH, CHU de Nantes

Madame le Docteur COSTE-BUREL Marianne, PH, CHU de Nantes

Directeur de thèse :

Madame le Docteur BRESSOLLETTE-BODIN Céline, MCU-PH, CHU de Nantes

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2019

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)
et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 20 mai 2019 à NANTES
par Mademoiselle IRIMIA Alix

Dynamique de réplication des torques teno virus dans une cohorte de patients cérébro-lésés

Composition du jury :

Président :

Monsieur le Professeur LEVEQUE Nicolas, PU-PH, CHU de Poitiers

Membres :

Madame le Professeur IMBERT Berthe-Marie, PU-PH, CHU de Nantes

Monsieur le Professeur ROQUILLY Antoine, PU-PH, CHU de Nantes

Madame le Docteur COSTE-BUREL Marianne, PH, CHU de Nantes

Directeur de thèse :

Madame le Docteur BRESSOLLETTE-BODIN Céline, MCU-PH, CHU de Nantes



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie (HDR)
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

AHU

- BINSON Guillaume

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier
- GAY Julie

Poste de Doctorant

- FREYSSIN Aline

Le Doyen,

Année universitaire 2018 - 2019

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie (**retraite 09/2019**)
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale (**retraite 09/2019**)
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, oncologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (**en détachement**)
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECLERE Franck, chirurgie plastique, reconstructrice
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- MACCHI Laurent, hématologie
- MCHEIK Jiad, chirurgie infantile
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie

- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- SILVAIN Christine, hépato-gastro- entérologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, oncologie (**retraite 09/2019**)
- WAGER Michel, neurochirurgie
- XAVIER Jean, pédopsychiatrie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail (**en détachement**)
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- COUDROY Rémy, réanimation (**en mission 1 an**)
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- GARCIA Magali, bactériologie-virologie (**en mission 1 an**)
- JAVAUGUE Vincent, néphrologie
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PALAZZO Paola, neurologie (**pas avant janvier 2019**)
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe
- GOMES DA CUNHA José

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- FRECHE Bernard
- MIGNOT Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VALETTE Thierry

Maitres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- GAY Julie, professeur agrégé

Professeurs émérites

- DORE Bertrand, urologie (08/2020)
- EUGENE Michel, physiologie (08/2019)
- GIL Roger, neurologie (08/2020)
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (08/2020)
- HERPIN Daniel, cardiologie (08/2020)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (16/02/2019)
- MARECHAUD Richard, médecine interne (24/11/2020)
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (08/2021)
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2020)
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2020)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2021)

Professeurs et Maitres de Conférences honoraires

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (ex-émérite)
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- POURRAT Olivier, médecine interne (ex-émérite)
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- VANDERMARCQ Guy, radiologie et imagerie médicale

Remerciements

A Monsieur le Professeur Nicolas Lévêque, vous me faites l'honneur de présider ce jury, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Madame le Docteur Céline Bressollette-Bodin, pour m'avoir confié ce travail, je te remercie pour tous tes conseils et ton soutien.

A Madame le Professeur Berthe-Marie Imbert, vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Antoine Roquilly, vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

A Madame le Docteur Marianne Coste-Burel, pour me faire l'honneur de juger ce travail, merci pour tous tes conseils techniques et pour ton soutien lors des JNI.

A Madame le Docteur Louise Castain, pour avoir pris le temps de m'aider dans la rédaction de ce manuscrit, merci pour tous tes conseils.

A toute l'équipe du laboratoire de Virologie du CHU de Nantes, pour leur savoir-faire et leur bonne humeur au quotidien.

A toutes les équipes que j'ai pu rencontrer pendant mon internat à Poitiers et à Nantes.

A tous mes co-internes,

A Camille, merci pour tout ton soutien au cours de cette dernière ligne droite.

A Sophie, Anne, Anaïs, Coralie, Adeline et tous les autres pour tous ces bons moments durant notre internat.

A mes amis, pour tous les bons moments passés ensemble.

A toute ma famille,

A mes parents, pour leur soutien infailible depuis toujours.

A mes sœurs, Marie et Lucile, pour tous nos moments partagés et ceux à venir.

A Ronan, parce que la vie est plus belle avec un chapeau sur la tête, merci pour tout...

Table des matières

Liste des abréviations	11
Liste des figures	13
Liste des tableaux	15
Première partie : Bibliographie	16
I. Le virome	16
II. Les torque teno virus	17
A. Circonstances de découverte et historique des TTV	17
B. Classification et taxonomie virale.....	18
C. La particule virale	19
1. Structure de la particule virale	19
2. Organisation génomique	20
D. Cycle de réplication	21
1. Synthèse des ARN messagers	21
2. Expression et fonction des protéines virales	22
a. Expression protéique	22
b. Fonctions des protéines virales.....	23
3. Cycle de réplication.....	24
E. Variabilité génétique	25
F. Epidémiologie et pouvoir pathogène	27
1. Epidémiologie	27
a. Prévalence.....	27
b. Répartition géographique	29
c. Transmission.....	29
2. Pouvoir pathogène.....	30
a. Pathologies hépatiques	30
b. Pathologies respiratoires.....	31
c. Cancers et pathologies hématologiques.....	31
d. Pathologies auto-immunes.....	31
G. Lien entre TTV et système immunitaire	32
1. Evolution du virome et de la part des Anellovirus en fonction du statut immunitaire	32

2.	Etude des TTV chez les patients immunodéprimés	35
a.	Méthodes de détection et de quantification de l'ADN des TTV	35
b.	Cinétique de répllication des TTV chez les patients immunodéprimés	37
III.	L'immunodépression post-traumatique.....	40
A.	Physiopathologie.....	40
1.	Rappels sur l'immunité innée.....	40
2.	Réponse immunitaire post-traumatique	42
B.	Infections et réactivations virales en réanimation.....	44
Deuxième partie : Travail personnel		45
I.	Objectifs	45
II.	Matériels et méthodes.....	46
A.	Matériels	46
1.	Population.....	46
2.	Echantillons biologiques	46
3.	Trousse diagnostique pour la quantification génomique des TTV	47
4.	Thermocycleur	48
B.	Méthodes.....	48
1.	Recueil de données.....	48
a.	Recueil de données de l'étude IBIS-virus	49
b.	Recueil des données administratives, cliniques et biologiques	49
2.	Extraction des acides nucléiques.....	49
3.	Amplification des acides nucléiques	50
4.	Critères de validation de la PCR	52
5.	Analyse statistique.....	52
III.	Résultats	53
A.	Caractéristiques de la population étudiée	53
B.	Quantification des torque teno virus	56
1.	Quantification des TTV avec la trousse TTV R-gene®	56
a.	Contrôles négatifs	56
b.	Contrôles internes	56
c.	Contrôles positifs.....	57
d.	Reproductibilité de la gamme plasmidique	58
2.	Quantification des TTV dans la cohorte	59
a.	Fréquence de détection des TTV	59

b.	Charges virales des TTV	60
c.	Cinétique de réplication des TTV au cours du suivi	61
d.	Corrélation de la réplication des TTV à l'évolution clinique des patients	62
IV.	Discussion	65
	Références bibliographiques	70
	Liste des annexes.....	77
	Résumé	78

Liste des abréviations

AA	Acide Aminé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALAT	Alanine Amino-Transférase
ARN(m)	Acide RiboNucléique (messenger)
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
CARS	Réponse anti-inflammatoire compensatrice
CAV	<i>Chicken Anemia Virus</i>
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus humain
Cp/mL	copies par millilitre
CPA	Cellule Présentatrice d’Antigènes
CRB	Centre de Ressources Biologiques
Ct	Cycle seuil
CV	Coefficient de variation
DAMP	<i>Damaged-associated molecular patterns</i>
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphates
EBV	Virus Ebstein-Barr
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EFS	Etablissement Français du Sang
GC	Guanine-cytosine
HHV-7	Herpèsvirus humain de type 7
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSA	Hémorragie Sous-Arachnoïdienne
HSV-1	Virus Herpès simplex de type 1
HSV-2	Virus Herpès simplex de type 2
IC2	Contrôle interne
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IL-1β	Interleukine 1 beta
IL-6	Interleukine 6
IL-12	Interleukine 12
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LED	Diode électroluminescente
NF-KB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NGS	Séquençage nouvelle génération
ORF	<i>Open Reading Frame</i>

PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
pb	Paires de bases
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
pHSV	Réactivation virale HSV
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
QCMD	<i>Quality Control for Molecular Diagnostics</i>
QS1	Standard de quantification 1
QS2	Standard de quantification 2
QS3	Standard de quantification 3
QS4	Standard de quantification 4
SC	Témoin de sensibilité
sHSV	Statut sérologique HSV
SRIS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TTMDV	torque teno midi virus
TTMV	torque teno mini virus
TTV	torque teno virus
UTR	<i>Untranslated region</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VRS	Virus Respiratoire Syncytial

Liste des figures

Figure 1 – Prévalence des différents virus retrouvés dans le virome sanguin	17
Figure 2 – Famille des <i>Anelloviridae</i> en 2010	19
Figure 3 – Structure du génome du prototype TTV-1a.....	20
Figure 4 – Transcription et expression protéique des TTV dans des cellules HEK 293, exemple de l'isolat HEL32 (génotype 6)	23
Figure 5 – Schéma du mécanisme de réplication du cercle roulant	25
Figure 6 – Arbre phylogénétique représentant les 5 groupes phylogénétiques des TTV décrits en 2009	26
Figure 7 – Répartition des prévalences des TTV dans le monde en utilisant des amorces spécifiques de UTR (a) ou de ORF (b)	28
Figure 8 – Composition du virome plasmatique	33
Figure 9 – Composition du virome plasmatique en fonction de l'exposition à des doses croissantes en immunosuppresseurs et antiviraux.....	34
Figure 10 – Relations entre l'intensité de l'immunodépression et les taux de TTV dans la prédiction du rejet de greffe	35
Figure 11 – Rôle des TLR dans l'induction de l'immunité adaptative	41
Figure 12 – Equilibre entre le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) et la réponse anti-inflammatoire compensatrice (CARS) dans la morbi-mortalité des patients traumatiques	43
Figure 13 – Schéma de notre étude ancillaire	47
Figure 14 – Principe de l'extraction des acides nucléiques par le MagNA Pure Compact Instrument.....	50
Figure 15 – Différentes phases de la PCR.....	51
Figure 16 – Principe de l'émission de fluorescence par la sonde Taqman	51
Figure 17 – Statuts sérologiques (sHSV) et réactivations virales HSV (pHSV) des patients..	53
Figure 18 – Délai de réactivation du virus HSV chez les patients séropositifs	54
Figure 19 – Inhibiteur de PCR	57
Figure 20 – Pourcentages de PCR TTV positives chez les volontaires sains et les patients au cours du suivi	59
Figure 21 - Pourcentages de PCR TTV positives en fonction du statut sérologique (sHSV) et de la réactivation du virus HSV (pHSV) chez les volontaires sains et les patients au cours du suivi	60

Figure 22 – Comparaison des charges virales à tous les points du suivi	61
Figure 23 – Evolution des charges virales TTV au cours du temps en fonction du statut sérologique et de la réactivation du virus HSV	62

Liste des tableaux

Tableau 1 – Méta-analyse de plusieurs études de prévalence des TTV chez des volontaires sains en fonction de la cible amplifiée	28
Tableau 2 – Comparaison des deux principales techniques de quantification des TTV	36
Tableau 3 - Cinétique de réplication des TTV chez les patients immunodéprimés	39
Tableau 4 – Critères clinico-biologiques du SRIS	42
Tableau 5 – Caractéristiques de la population étudiée	55
Tableau 6 – Résultats de l’amplification de l’IC2W0	56
Tableau 7 – Résultats de l’amplification de l’IC2 des échantillons	56
Tableau 8 – Résultats de l’amplification du témoin de sensibilité	58
Tableau 9 – Résultats de l’amplification de la gamme plasmidique	58
Tableau 10 – Résultats de l’efficacité des réactions de PCR	58
Tableau 11 – Comparaison des charges virales TTV moyennes entre les volontaires sains et les patients à tous les points du suivi en fonction du statut sérologique et de la réactivation du virus HSV	60
Tableau 12 – Charges virales TTV moyennes au cours du suivi	62
Tableau 13 – Caractéristiques des patients et évolution clinique en fonction de la réplication des TTV au cours du suivi	64
Tableau 14 – Charges virales moyennes des TTV sur plasma chez des volontaires sains	66
Tableau 15 – Charges virales moyennes des TTV avant transplantation rénale	67
Tableau 16 – Charges virales TTV mesurées chez des patients greffés rénaux	67

Première partie : Bibliographie

I. Le virome

Le microbiote humain désigne l'ensemble des microorganismes commensaux qui peuvent coloniser le corps humain : il regroupe ainsi les flores aérienne, digestive, cutanée, génitale, et est reconnu comme ayant un rôle essentiel dans la physiologie de l'hôte. Bien que le microbiote bactérien reste aujourd'hui le plus largement décrit et étudié, il existe une composante virale du microbiote, le virome (Foulongne, 2015).

Le virome représente l'ensemble des virus retrouvés chez l'homme, à l'intérieur du corps ou à sa surface, et en l'absence de signes cliniques d'infection. Cette définition comprend donc les virus responsables d'infections, qu'elles soient aiguës, chroniques ou latentes, les virus intégrés au génome (rétrovirus), et les bactériophages (Rascovan et al., 2016).

De nouveaux outils de la biologie moléculaire tels que la métagénomique ont permis l'exploration du virome. Des études menées chez des individus ont ainsi montré la grande diversité des virus colonisant le corps humain. La variabilité inter et intra-individuelle du virome est bien décrite et elle semble être liée à plusieurs facteurs, notamment à des facteurs environnementaux et à l'influence du système immunitaire (Foulongne, 2015).

Dans le compartiment systémique, une majorité de virus de la famille des *Herpesviridae* a été identifiée, représentés principalement par l'herpèsvirus humain de type 7 (HHV-7) et le virus Epstein-Barr (EBV), ainsi que des virus de la famille des *Anelloviridae* (Moustafa et al., 2017) (Figure 1).

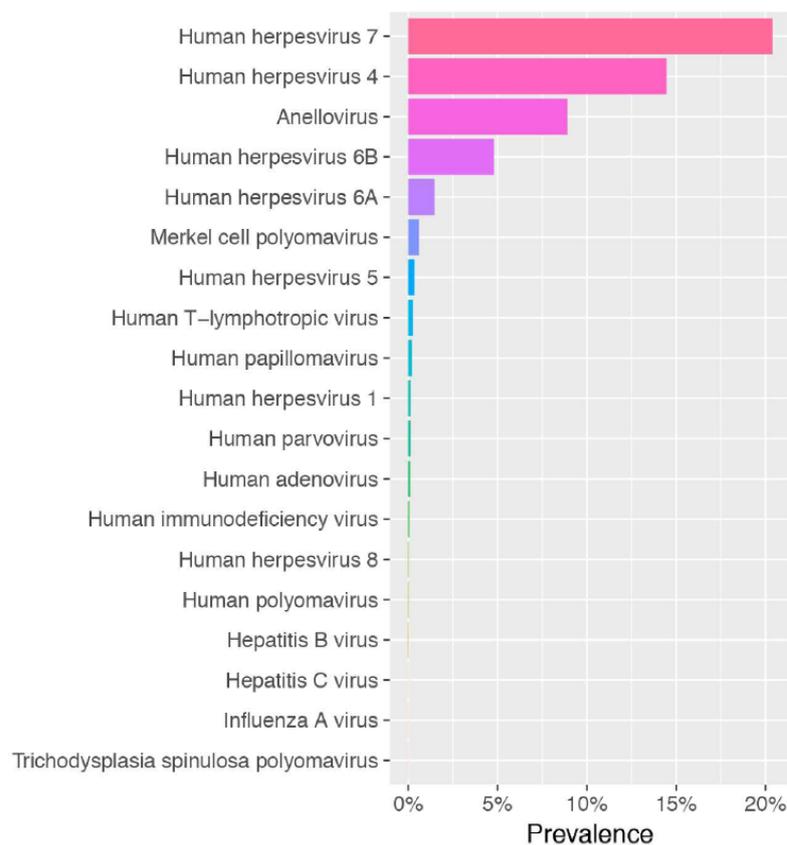


Figure 1 – Prévalence des différents virus retrouvés dans le virome sanguin
(Moustafa et al., 2017)

II. Les torque teno virus

A. Circonstances de découverte et historique des TTV

La découverte de nouveaux virus a été facilitée par l'utilisation de nouvelles techniques de biologie moléculaire de plus en plus performantes (réaction par polymérisation en chaîne (PCR), hybridation moléculaire, séquençage) associées à des techniques d'enrichissement viral (filtration, centrifugation sur gradient, traitement avec des DNases...). La métagénomique virale permet aujourd'hui de caractériser de très nombreuses séquences virales non répertoriées dans les bases de données actuelles. Elle repose sur une technique de séquençage à haut débit (*Next Generation Sequencing*, NGS) qui utilise des amorces aléatoires et permet ainsi de caractériser plusieurs millions de séquences à partir d'un échantillon à l'aide d'outils bioinformatiques puissants permettant de traiter toutes les données générées (Foulongne, 2015).

En 1997, par méthode de soustraction génique, un fragment de séquence virale d'environ 500 paires de bases (pb) a été découvert dans le sérum d'un patient japonais présentant une hépatite post-transfusionnelle d'étiologie indéterminée. Ce clone, initialement nommé N22 et non répertorié dans les bases de données de séquences virales de l'époque, a été renommé TT virus (TTV), d'après les initiales du patient chez lequel il a été découvert (Nishizawa et al., 1997). Des travaux supplémentaires ont par la suite montré que le génome du TTV est constitué d'un ADN circulaire simple brin de polarité négative (Okamoto et al., 1998b; Mushahwar et al., 1999). Il s'agit du premier virus à ADN circulaire simple brin isolé chez l'homme. Il se rapproche ainsi de familles virales déjà connues telles que la famille des *Circoviridae*, virus infectant les animaux, la famille des *Geminiviridae*, virus infectant les plantes, ou encore celle des *Microviridae*, virus infectant les bactéries (Hino, 2002).

Au début des années 2000, le dépistage du TTV dans des échantillons de plasma humain a permis la découverte d'un nouveau virus, plus petit, avec des séquences divergentes par rapport à celles du TTV, nommé d'abord TLMV (TT-like mini virus) puis TTMV (torque teno mini virus) par le comité international de taxonomie des virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV). En 2007, un troisième virus ressemblant au TTV mais présentant des séquences divergentes a été identifié chez l'homme et nommé TTMDV (torque teno midi virus) (Biagini and de Micco, 2010).

B. Classification et taxonomie virale

En 2004, l'ICTV a approuvé la création d'un nouveau genre : le genre des *Anellovirus* (du latin *anello* signifiant l'anneau, en référence au génome circulaire). En parallèle, le TTV a été renommé torque teno virus (du latin *torques*, signifiant collier et *tenuis*, signifiant fin). C'est ensuite en 2009 que la famille des *Anelloviridae* a été créée par l'ICTV, suite à la découverte de nouveaux génomes TTV, TTMV et TTMDV complexifiant ainsi la taxonomie pré-existante (Biagini, 2009). La famille des *Anelloviridae* comprend aujourd'hui 14 genres différents, dont trois principaux retrouvés chez l'homme : Alphatorquevirus, représenté par 29 espèces différentes de TTV ; Betatorquevirus, représenté par 12 espèces de TTMV ; et Gammatorquevirus, représenté par 15 espèces de TTMDV. Les genres animaux Deltatorquevirus, Epsilontorquevirus, Etatorquevirus, Iotatorquevirus, Kappatorquevirus, Lambdatorquevirus, Mutorquevirus, Nutorquevirus, Thetatorquevirus et Zetatorquevirus ont

été identifiés respectivement chez les tupaïas, les tamarins à crête blanche, les chats, les cochons, les otaries, les chevaux, les chiens et les douroucoulis (Figure 2). Le genre des Gyrovirus, représenté par le Chicken Anemia Virus (CAV) a été récemment transféré de la famille des *Circoviridae* vers la famille des *Anelloviridae*.

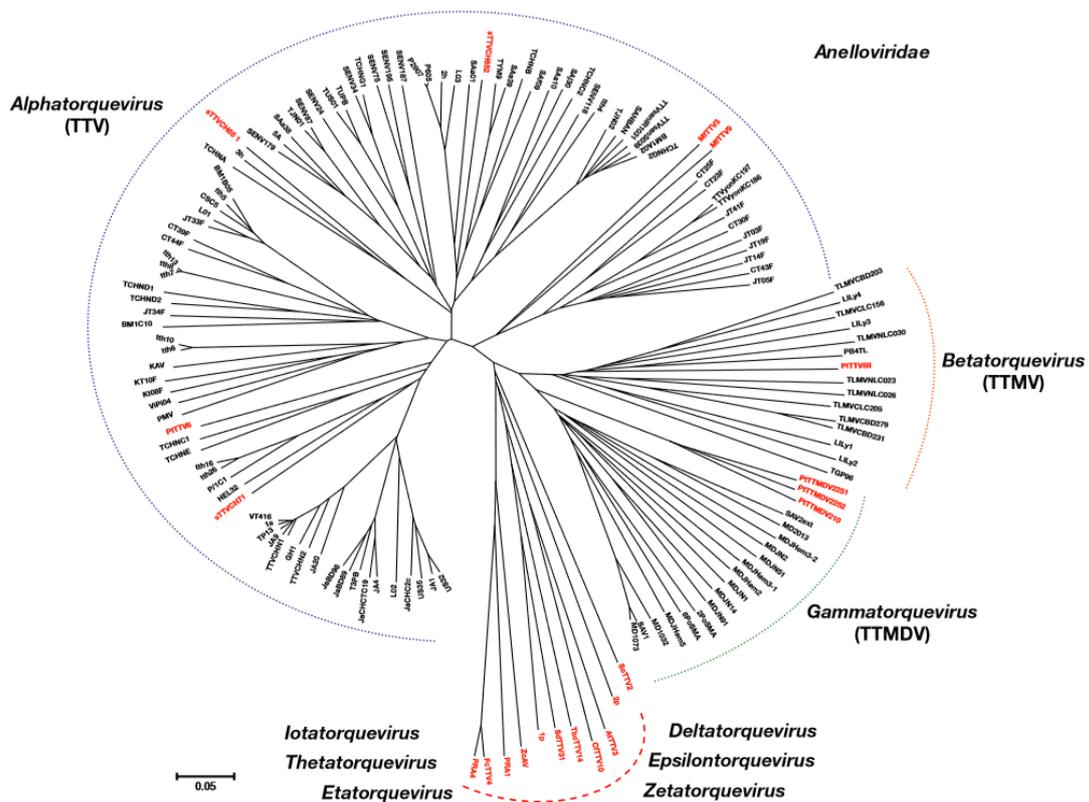


Figure 2 – Famille des *Anelloviridae* en 2010
(Biagini and de Micco, 2010)

C. La particule virale

1. Structure de la particule virale

Les TTV sont des petits virus d'environ 30 à 50 nm de diamètre, non enveloppés dont la structure tridimensionnelle est encore incertaine à ce jour. Le génome est constitué d'un ADN circulaire simple brin (*single-stranded DNA*, ssDNA) de polarité négative. Après immunoprécipitation des TTV à l'aide d'un antisérum anti-IgG humaines, une fraction de

l'ADN des TTV a été retrouvée dans le sérum d'individus infectés, indiquant que les TTV pourraient circuler dans le sang liés aux immunoglobulines (Maggi and Bendinelli, 2009).

2. Organisation génomique

La taille du génome des TTV varie en fonction des génotypes, de 3600 à 3900 pb. Malgré la diversité apparente de la taille des génomes des TTV, il semble que l'organisation génomique soit bien conservée et comporte deux régions :

- une région codante de 2600 pb et contenant au moins deux cadres de lecture ouverts (*Open Reading Frame*, ORF) chevauchants : ORF1 (long) et ORF2 (court), et deux cadres de lecture ouverts additionnels : ORF3 et ORF4. La région N22 de l'ORF1 est la séquence initialement découverte en 1997.
- une région non codante (*5' Untranslated Region*, UTR), bien conservée de 1200 pb. On y retrouve une séquence riche en guanine-cytosine (GC) de 117 nucléotides, et susceptible de former une structure secondaire de type « épingle à cheveux » (Figure 3).

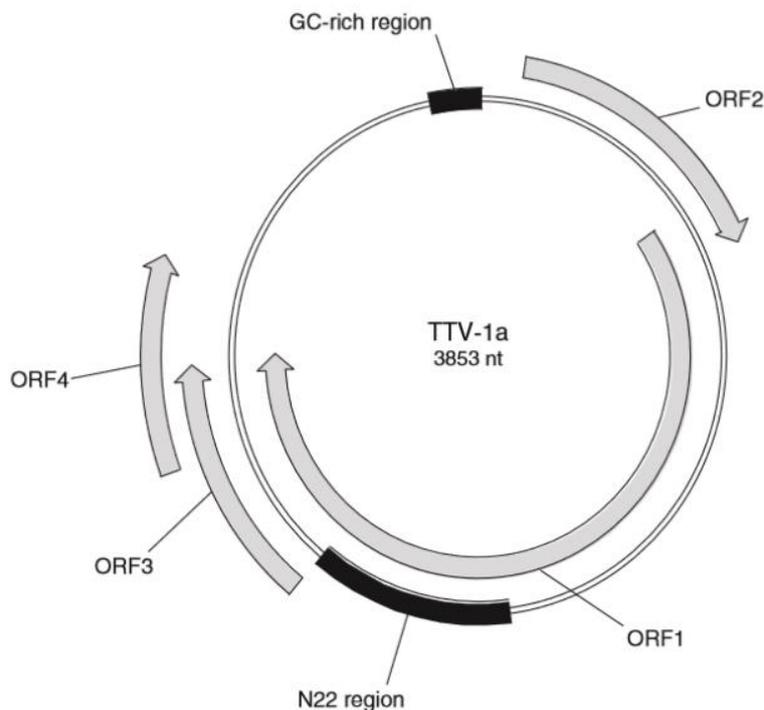


Figure 3 – Structure du génome du prototype TTV-1a
(Biagini, 2009)

D. Cycle de réplication

L'absence de modèle de culture cellulaire pour les TTV empêche l'étude approfondie des mécanismes de réplication mais également la compréhension de la nature et de la fonction des protéines sécrétées par les TTV (Hino and Miyata, 2007). Deux études ont montré des résultats intéressants dans la persistance d'un cycle viral de multiplication. L'infection d'une lignée cellulaire Chang Liver (cellules humaines dérivées de tissu non malin) par du sérum positif pour le TTV a montré l'apparition d'un effet cytopathogène 2 à 3 jours après l'inoculation avec destruction des cellules infectées. De faibles charges virales TTV mesurées dans le surnageant suggèrent néanmoins une faible sécrétion de particules virales (Desai et al., 2005). Dans une autre étude, la culture des TTV a été effectuée sur des cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC). La réplication *in vitro* des TTV a été observée sur ces cellules préalablement stimulées par de la phytohémagglutinine et une augmentation des charges virales des TTV a été mesurée dans le surnageant. Aucun effet cytopathogène n'a cependant été observé (Maggi et al., 2001).

1. Synthèse des ARN messagers

Le profil de transcription des TTV a par la suite été étudié par la transfection de plasmides contenant un génome linéarisé des TTV. Plusieurs constructions ont été testées, notamment la transfection de deux isolats appartenant au génogroupe 1 : l'isolat VT416 (génotype 1) dans des cellules Cos-1 (Kamahora et al., 2000) et l'isolat HEL32 (génotype 6) dans des cellules embryonnaires rénales humaines HEK 293 (Qiu et al., 2005). L'isolat TYM9, appartenant au génogroupe 3, a été étudié dans les cellules de la moëlle osseuse d'une patiente atteinte d'une leucémie aiguë myéloïde (Okamoto et al., 2000). Enfin, les isolats tth7 et tth8 appartenant au génogroupe 5 ont été transfectés dans des cellules L428 de lymphome de Hodgkin (Leppik et al., 2007).

Trois types d'ARN messenger ont ainsi été décrits, de respectivement 2,8 à 3 kpb, 1,2 kpb et 1,0 kpb. Chaque ARNm est transcrit à partir d'un unique promoteur, et est polyadénylé. Ces ARNm résultent de l'épissage d'un petit intron de 100 nucléotides, localisé après le site d'initiation de la transcription. Pour les deux transcrits les plus courts, l'épissage d'un deuxième intron plus large a lieu environ 400 nucléotides après le premier intron (Figure 4). L'ARNm le plus exprimé est la forme la plus longue (60%), et l'expression des formes de 1,2

et de 1,0 kpb est de 5% et 35% respectivement. L'étude des isolats appartenant au génogroupe 5 a montré, outre la présence de ces 3 ARNm déjà décrits, la présence de 12 transcrits additionnels, produits par des sites d'épissages alternatifs et par des réarrangements intragénomiques (Kakkola et al., 2009).

2. Expression et fonction des protéines virales

a. Expression protéique

Six protéines virales ont été identifiées dans le modèle de transfection de cellules HEK 293 avec l'isolat HEL32. Des mécanismes d'épissage alternatif et d'initiation alternative de la traduction sont nécessaires à la synthèse de ces protéines (Qiu et al., 2005).

Chaque ARNm code deux protéines différentes à l'aide d'une initiation alternative de la traduction (codons initiateurs O1AUG ou O2AUG). La protéine ORF1, de 736 acides aminés (AA), est la plus grande protéine des TTV et est traduite à partir de l'ARNm de 2,8 kpb. La protéine ORF2 est plus petite (117 AA) et est codée par le même ARNm à l'aide d'un codon initiateur alternatif. Les ARNm de 1,2 kpb et de 1,0 kpb codent chacun deux protéines : les protéines ORF2/2 (281 AA) et ORF2/3 (275 AA) codées à l'aide du codon initiateur O1AUG et deux autres protéines, ORF1/1 (199 AA) et ORF1/2 (142 AA), sont en revanche traduites à l'aide du codon initiateur O2AUG (Figure 4) (Kakkola et al., 2009).

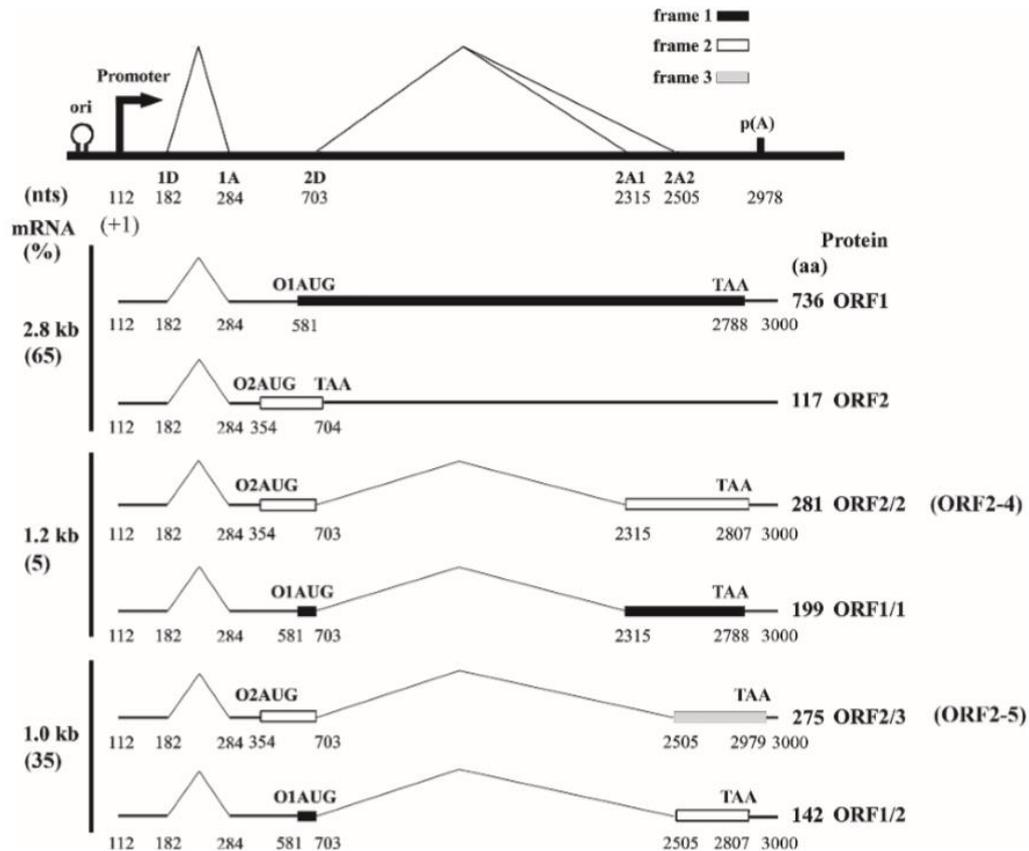


Figure 4 – Transcription et expression protéique des TTV dans des cellules HEK 293, exemple de l'isolat HEL32 (génotype 6)

(Kakkola et al., 2009)

Les études de transfection de différents génomes des TTV dans des lignées cellulaires ont montré des profils de transcription et de traduction globalement similaires. On suppose ainsi que cette organisation serait conservée chez les TTV, mais qu'il existerait des variations spécifiques de génotype (Kakkola et al., 2009).

b. Fonctions des protéines virales

Toujours en raison de l'absence d'un modèle de répllication efficace des TTV, il est aujourd'hui difficile de démontrer la réelle fonction des protéines précédemment décrites.

La protéine ORF1 semble être une protéine multifonctionnelle à la fois structurale (protéine de capsid) et impliquée dans la répllication virale. En effet, des motifs caractéristiques de la protéine de répllication Rep ont été identifiés. La protéine Rep est une

protéine retrouvée dans les autres familles de virus à ADN simple brin circulaire. Elle possède trois domaines distincts permettant la reconnaissance de l'origine de réplication et a une activité NTPase et hélicase (Bernardi and Timchenko, 2008). De plus, la présence d'une région N-terminale riche en arginine suggère l'interaction d'ORF1 avec l'ADN viral (Mushahwar et al., 1999).

Des travaux sur la protéine ORF2 ont montré sa capacité à inhiber la voie du NF- κ B, facteur nucléaire impliqué dans la réponse protectrice de l'hôte vis-à-vis des pathogènes viraux. Ainsi, ORF2 diminuerait indirectement l'expression de cytokines de l'inflammation (IL-6, IL-8) et aurait un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Zheng et al., 2007). La protéine ORF2 possède également une structure conservée de type WX₇HX₃CX₁CX₅H susceptible d'avoir une activité phosphatase. Ces protéines avec activité phosphatase ont des fonctions importantes notamment dans la régulation de la transcription génique (Kakkola et al., 2009).

ORF2/2 et ORF2/3 ont une localisation nucléaire et auraient un rôle dans l'expression génique et la réplication virale. ORF2/2 possède un domaine riche en sérine dans sa partie C-terminale pouvant générer différents sites de phosphorylation : en étant phosphorylée, elle pourrait ainsi interagir avec les protéines cellulaires dans le maintien d'une infection persistante (Asabe et al., 2001).

3. Cycle de réplication

Le mécanisme exact de réplication des TTV reste aujourd'hui inconnu mais il est probable qu'il fasse intervenir le système de réplication cellulaire, les TTV ne possédant pas leur propre ADN polymérase (Kakkola et al., 2007). Par analogie avec les virus de la famille des *Geminiviridae* ou le CAV, autres virus connus à ADN circulaire simple brin, les TTV se répliqueraient selon le mécanisme du cercle roulant (Bernardi and Timchenko, 2008). La protéine ORF1 aurait d'ailleurs une activité centrale dans ce mécanisme, en portant des motifs de la protéine Rep (Biagini and de Micco, 2010).

Le mécanisme du cercle roulant implique dans un premier temps la formation d'un intermédiaire de réplication à ADN double brin. La réplication débute grâce à la fixation de la protéine Rep sur l'origine de réplication. L'ADN polymérase cellulaire synthétise un nouveau

brin d'ADN complémentaire. Enfin, une ADN ligase permet de libérer le brin d'ADN circulaire simple brin nouvellement synthétisé (Figure 5).

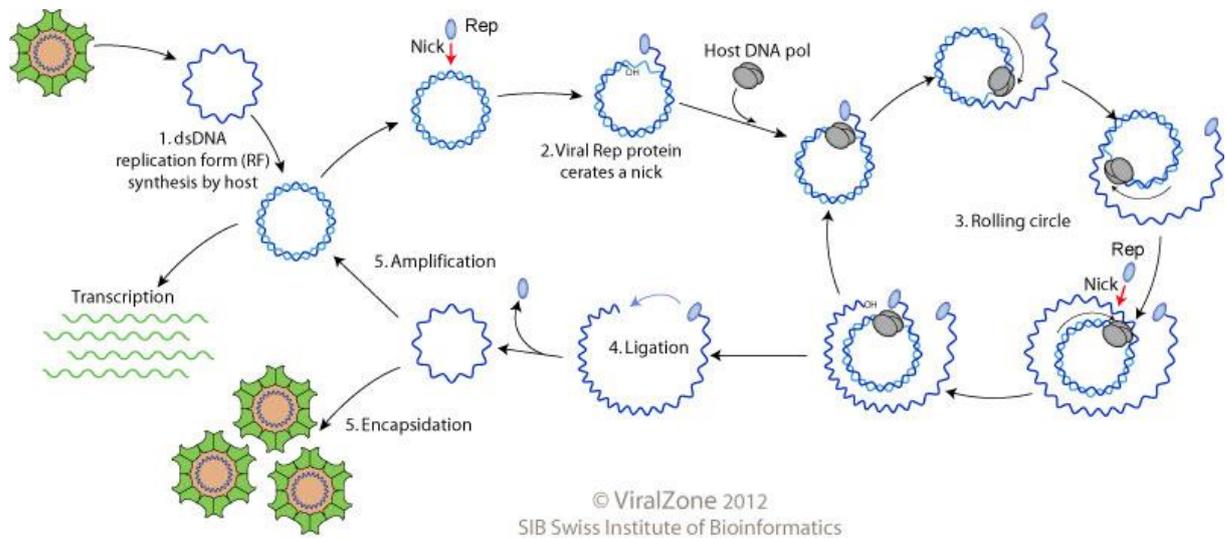


Figure 5 – Schéma du mécanisme de réplication du cercle roulant
(SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2012)

E. Variabilité génétique

La famille des *Anelloviridae* est caractérisée par une diversité génétique importante, diversité qui n'est pas commune chez les virus à ADN. En effet, ces virus à ADN utilisent pour leur réplication l'ADN polymérase des cellules hôtes qui possède un haut niveau de fidélité (fonction de correction d'épreuves, *proof-reading*).

Historiquement, deux génotypes différents de torque teno virus ont été caractérisés, avec une variabilité génétique pouvant atteindre 30% de divergence en nucléotides (Okamoto et al., 1998b). Depuis, la caractérisation de nombreuses séquences complètes a permis d'identifier plus de 30 génotypes différents avec une divergence en nucléotides pouvant parfois dépasser les 50%. La classification a ainsi évolué et les différents virus sont maintenant classés au sein du genre *Alphatorquevirus* en groupes phylogénétiques (Figure 6). A ce jour, il existe 7 groupes phylogénétiques majeurs (Hsiao et al., 2016; Peng et al., 2002). L'ICTV, dans son 9^{ème} rapport, précise d'ailleurs qu'une divergence en nucléotides de plus de 35% entraîne la distinction d'une nouvelle espèce de TTV, et une divergence en nucléotides de plus de 56% permet de classer la souche dans un genre différent au sein de la famille des *Anelloviridae*.

F. Epidémiologie et pouvoir pathogène

1. Epidémiologie

a. Prévalence

La prévalence de l'infection à TTV a initialement été évaluée à l'aide d'une PCR basée sur des amorces permettant d'amplifier la région ORF1 (Nishizawa et al., 1997). Plusieurs enquêtes épidémiologiques effectuées chez des donneurs sains ont ainsi révélé de faibles prévalences variant entre 1% et 12% au Japon, en Europe et aux Etats-Unis (Biagini et al., 1998; Charlton et al., 1998; Simmonds et al., 1998).

Cependant, la même année, l'étude de Takahashi *et al* rapportait une prévalence de 92% chez des individus sains japonais en utilisant de nouvelles amorces localisées au niveau de la région conservée UTR. Parallèlement, les amorces spécifiques de la région ORF1 élaborées par Okamoto *et al* testées sur cette même population révélaient une prévalence de seulement 23% (Takahashi et al., 1998).

D'autres travaux ont ainsi comparé les prévalences observées en fonction du choix des amorces et ont révélé que l'amplification de la région non codante UTR, très conservée dans cette famille des *Anelloviridae*, était à privilégier lors d'une étude de prévalence puisqu'elle permet la détection d'un nombre beaucoup plus important de génotypes. Plusieurs études de prévalence des TTV chez des volontaires sains dans le monde sont détaillées dans le Tableau 1 ; la Figure 7 représente la prévalence des TTV dans le monde en fonction du couple d'amorces choisi. Au total, la prévalence des TTV est élevée dans le monde entier puisqu'elle est en moyenne supérieure à 80%.

Cible amplifiée	Prévalence	Pays	Référence
ORF1 (clone N22)	12%	Japon	(Okamoto et al., 1998b)
	5,3%	France	(Biagini et al., 1998)
	1,9%	Ecosse	(Simmonds et al., 1998)
	1%	Etats-Unis	(Charlton et al., 1998)
UTR	92%	Japon	(Takahashi et al., 1998)
	93%	Japon	(Okamoto et al., 1999)
	91%	Japon	(Shibayama et al., 2001)
	89%	Italie	(Maggi et al., 2005)
	66%	France	(Biagini et al., 2006)
	60,1%	Etats-Unis	(Walton et al., 2014)
	79%	Uruguay	(Cancela et al., 2016)
	95%	Taiwan	(Hsiao et al., 2016)
	69%	Suisse	(Masouridi-Levrat et al., 2016)
	45%	France	(Kulifaj et al., 2018)

Tableau 1 – Méta-analyse de plusieurs études de prévalence des TTV chez des volontaires sains en fonction de la cible amplifiée

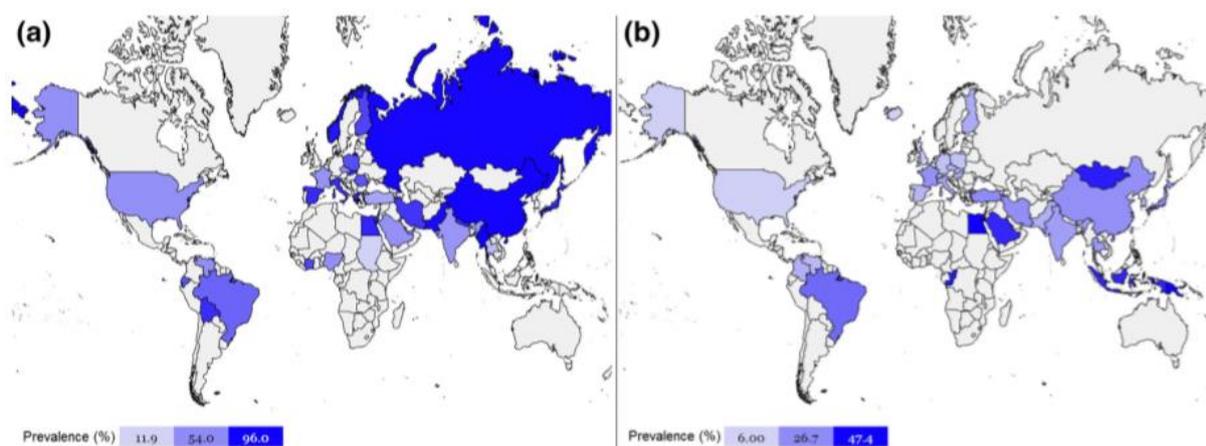


Figure 7 – Répartition des prévalences des TTV dans le monde en utilisant des amorces spécifiques de UTR (a) ou de ORF (b)

(Spandole et al., 2015)

La prévalence des TTV dans la population semble augmenter avec l'âge et les charges virales des TTV sont plus importantes chez les personnes âgées (Fernández-Ruiz et al., 2019; Haloschan et al., 2014; Saback et al., 1999).

Quelques études se sont intéressées à la répartition des TTV au sein de chaque groupe phylogénétique, notamment des prévalences retrouvées au sein de chacun de ces groupes : les groupes phylogénétiques les plus fréquemment retrouvés sont les groupes 1, 3 et 5. Les groupes 2 et 4 sont les moins fréquents, avec une prévalence de l'ordre de 2% (Biagini et al., 2006).

La séroprévalence des torque teno virus reste difficile à évaluer aujourd'hui. Quelques études ont évalué le caractère immunogène des protéines ORF1 et ORF2 et ont essayé de développer des techniques sérologiques (immunoprécipitation, immunoblots). Aucune méthode n'est pour l'instant reconnue comme référence et des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la séroprévalence des TTV dans la population mondiale (Maggi and Bendinelli, 2009).

b. Répartition géographique

Les TTV ont initialement été découverts au Japon (Nishizawa et al., 1997) mais de nombreuses études ont depuis montré la répartition cosmopolite des TTV puisqu'ils ont été retrouvés sur les cinq continents (Spandole et al., 2015). La répartition géographique des différents géotypes des TTV est une question encore en cours d'étude.

c. Transmission

Le génome des TTV est présent dans de nombreux organes et tissus de l'organisme, suggérant ainsi un vaste tropisme cellulaire. Il a en effet été détecté dans les cellules sanguines mononucléées (PBMC) (Maggi et al., 2001; Mariscal et al., 2002), dans les cellules de la moëlle osseuse (Okamoto et al., 2000), dans les sécrétions nasales et la salive (Maggi et al., 2003), dans le foie, ou encore dans les fèces.

Une des principales voies de transmission des TTV est probablement la voie parentérale. En effet, dès sa découverte, on a supposé que le virus se transmettait par les transfusions sanguines puisque sa prévalence chez les donneurs de sang, chez les patients hémodialysés et

dans les produits dérivés du sang était élevée. Cela lui a d'ailleurs valu son appellation transitoire de *transfusion-transmitted virus* pour TT-virus (Nishizawa et al., 1997; Simmonds et al., 1998). Mais du fait d'une prévalence très importante des TTV dans la population mondiale et ce dès la petite enfance, il est probable que les voies de transmission des TTV soient multiples. Ainsi, une transmission aérienne est fortement probable, comme le montre une étude de 2000 où la fréquence de détection des TTV était plus importante dans la salive que dans le sang (Deng et al., 2000). Une autre voie de transmission fortement probable est la voie féco-orale (Okamoto et al., 1998a). La transmission materno-fœtale est également possible puisque les TTV ont été détectés dans le sang de cordon et le liquide amniotique. La transmission des TTV à la naissance serait liée à la transmission materno-fœtale et à la transmission périnatale par l'environnement ou l'allaitement maternel (Bagaglio et al., 2002; Morrica et al., 2000).

2. Pouvoir pathogène

Depuis leur découverte, de nombreuses études se sont intéressées à l'implication des virus TTV en pathologie humaine. Si l'on a d'abord pensé que les TTV pourraient être responsables d'hépatites post-transfusionnelles, ils ont aussi été étudiés dans des pathologies respiratoires, cancéreuses ou auto-immunes.

a. Pathologies hépatiques

Initialement, les virus TTV ont été suspectés d'être des agents d'hépatites post-transfusionnelles. En effet, le premier isolat caractérisé N22 et plus tard renommé génotype 1 a été retrouvé chez des patients présentant une hépatite non A-G post-transfusionnelle d'origine indéterminée, avec des charges virales qui semblaient être corrélées avec le taux des ALAT (Nishizawa et al., 1997). Cette observation a par la suite été contredite par d'autres études, en ne montrant aucune association entre les charges virales des TTV et les taux d'ALAT ou n'importe quelle forme d'hépatite. Au final, une réplique hépatique des TTV est très probable mais en l'absence d'identification d'un effet cytopathogène lié à leur réplique, il reste encore difficile de les classer dans la catégorie des virus hépatotropes (Okamoto, 2009; Spandole et al., 2015).

b. Pathologies respiratoires

D'autres études se sont intéressées à l'implication des TTV dans certaines pathologies respiratoires. En effet, chez des enfants atteints de pathologies respiratoires aiguës, de fortes charges virales TTV ont été observées dans les sécrétions nasales et ces charges virales étaient plus élevées que les charges virales plasmatiques concomitantes. De plus, la présence de charges virales TTV supérieures chez les enfants déjà infectés par un virus respiratoire communautaire par rapport à des enfants non infectés a permis de supposer l'implication des TTV dans l'aggravation d'une pathologie respiratoire pré-existante (Maggi et al., 2003).

c. Cancers et pathologies hématologiques

La question de l'implication des TTV dans la pathogenèse de certains cancers a été posée suite à la mise en évidence des TTV dans de nombreux tissus néoplasiques. Certaines études ont évoqué l'hypothèse selon laquelle les infections persistantes à TTV pourraient augmenter le nombre de translocations spécifiques et ainsi jouer un rôle dans le développement de certains cancers ou leucémies. Par ailleurs, la présence des TTV dans les lymphocytes circulants dans les ganglions lymphatiques de patients atteints de lymphomes B a permis de formuler l'hypothèse selon laquelle les TTV pourraient moduler les lymphocytes T infectés et ainsi jouer un rôle dans la pathogenèse des lymphomes (Spandole et al., 2015).

d. Pathologies auto-immunes

L'étude des TTV dans certaines pathologies auto-immunes a permis d'approfondir la connaissance des liens potentiels qui existeraient entre les TTV et le système immunitaire. Plusieurs études cas-témoins ont montré des charges virales plus importantes chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, et une détection plus fréquente des TTV chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé que chez des volontaires sains. Chez des patients atteints de sclérose en plaques, on a pu identifier des lymphocytes T autoréactifs qui avaient pour cible des régions riches en arginine. Des motifs similaires sont par ailleurs retrouvés dans la région N-terminale de la protéine ORF1 des TTV. L'hypothèse ainsi formulée serait que l'infection à TTV pourrait entraîner, en association avec des facteurs prédisposants, l'expansion des lymphocytes T autoréactifs et donc impacter le développement de la maladie (Spandole et al., 2015).

A ce jour, aucune association définitive n'est encore établie entre l'infection à TTV et les pathologies décrites précédemment. En effet, la détection des TTV est très fréquente dans la population mondiale, y compris chez les individus sains, et cette virémie est en général prolongée dans le temps (Okamoto, 2009). Aucun effet cytopathogène n'a d'ailleurs été clairement démontré (Spandole et al., 2015). Il existe néanmoins un lien entre l'histoire naturelle de l'infection par les TTV et le système immunitaire qu'il convient d'approfondir.

G. Lien entre TTV et système immunitaire

L'étude de la composition et de l'évolution du virome sanguin, plus particulièrement de la part des virus de la famille des *Anelloviridae*, chez les patients immunodéprimés a été étayée par plusieurs études et notamment chez les patients greffés d'organe solide.

1. Evolution du virome et de la part des Anellovirus en fonction du statut immunitaire

Les patients ayant subi une greffe d'organe solide reçoivent un traitement immunosuppresseur afin de réduire le risque de rejet du greffon. Un équilibre doit alors être trouvé entre une immunosuppression trop importante favorisant des infections opportunistes, et une immunosuppression insuffisante, favorisant un risque de rejet du greffon. Outre les infections bactériennes et fongiques, il existe un risque d'infections et de réactivations virales, notamment du cytomégalovirus (CMV), qui favorise le risque de rejet et augmente la morbidité et la mortalité liées à la greffe. Les patients greffés peuvent alors être soumis à un traitement antiviral ciblant le CMV, soit prophylactique avant tout signe d'infection et de virémie, soit préemptif dès l'apparition d'une virémie sans signes infectieux (Slifkin et al., 2004).

En 2013, l'équipe de De Vlaminc *et al* s'est intéressé à la composition et à l'évolution du virome sanguin chez 96 patients receveurs d'organes (cœur et poumons) en réponse aux traitements immunosuppresseurs et antiviraux. 656 échantillons plasmatiques ont été séquencés et analysés avant la greffe et au cours du suivi. Au premier jour de la greffe, la composition du virome chez les patients était similaire à celle chez des volontaires sains, et

était composée majoritairement de virus des classes des Herpesvirales, des Caudovirales et de la famille des *Adenoviridae* (Figure 8) (De Vlaminck et al., 2013).

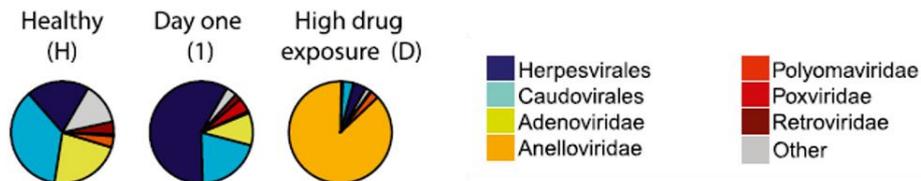


Figure 8 – Composition du virome plasmatique

Répartition des principaux virus circulants chez des volontaires sains (H) et chez des patients transplantés au premier jour (1) et après exposition prolongée aux immunosuppresseurs et antiviraux (D) (De Vlaminck et al., 2013)

Au cours de leur suivi et en relation avec une exposition aux immunosuppresseurs et aux antiviraux, on observe une diminution très importante des proportions des virus de la classe des Herpesvirales et des Caudovirales, en partie liée à l'exposition aux traitement antiviraux actifs sur de nombreux virus de la classe des Herpesvirales, et une augmentation des virus de la famille des *Anelloviridae*, représentant alors plus de 80 % des virus circulants (Figure 9).

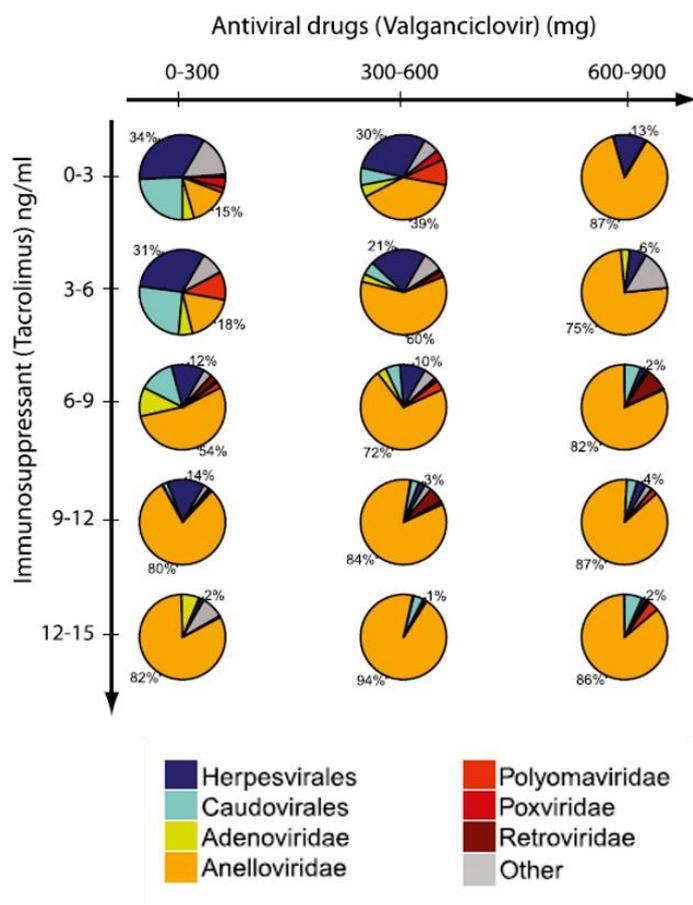


Figure 9 – Composition du virome plasmatique en fonction de l'exposition à des doses croissantes en immunosuppresseurs et antiviraux

(De Vlaminck et al., 2013)

L'augmentation de la proportion et des charges virales des virus de la famille des *Anelloviridae* circulants a ensuite été observée dans plusieurs populations de patients immunodéprimés.

Au vu de la variabilité inter-individuelle importante face aux traitements immunosuppresseurs et la difficulté à maintenir cet équilibre entre le risque de rejet et le risque infectieux, l'utilisation des TTV comme biomarqueurs en transplantation d'organe est aujourd'hui un sujet en développement. Ainsi, plus les charges virales des TTV seraient hautes, plus le patient serait immunodéprimé entraînant un risque majoré d'infections opportunistes. Au contraire, plus les charges virales des TTV seraient basses, plus le patient serait immunocompétent et plus le risque de rejet du greffon serait alors important (Figure

10). Le suivi de la charge virale des TTV pourrait ainsi participer au monitoring du système immunitaire post-greffe, en complément de la surveillance pharmacologique des médicaments immunosuppresseurs (Focosi et al., 2016).

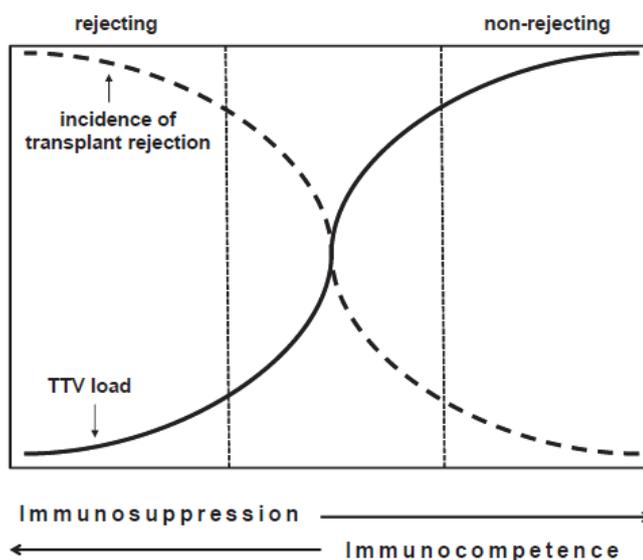


Figure 10 – Relations entre l'intensité de l'immunosuppression et les taux de TTV dans la prédiction du rejet de greffe

(Focosi et al., 2016)

2. Etude des TTV chez les patients immunodéprimés

a. Méthodes de détection et de quantification de l'ADN des TTV

Dans les travaux récents, la technique majoritairement utilisée pour la quantification de l'ADN des TTV est une PCR « maison » élaborée par Maggi *et al* (Maggi et al., 2003). Depuis 2016, la trousse TTV R-gene[®] (bioMérieux) est la première trousse commercialisée pour la quantification de l'ADN des TTV. Ces deux techniques utilisent la technologie des sondes Taqman et amplifient la zone non codante 5'-UTR. Tous les géotypes des TTV sont ainsi détectés à l'aide de ces deux techniques. La trousse TTV R-gene[®] peut s'utiliser sur des échantillons de plasma, comme la PCR « maison », mais aussi sur sang total. La limite de détection est par ailleurs plus basse dans cette technique (Tableau 2).

	PCR « maison » (Maggi et al., 2003)	Trousse commerciale TTV R-gene® (bioMérieux) (Kulifaj et al., 2018)
Nature de l'échantillon	Plasma	Plasma ou Sang total
Volume d'échantillon	200 µL	200 µL
Méthode d'extraction	QIAamp DNA minikit (Qiagen)	- MaGNA Pure Compact Instrument (Roche) - NucliSENS easyMAG (Biomérieux) - eMAG
Région amplifiée	Zone non codante UTR	Zone non codante UTR
Amorces	AMTS (pos 177-194) : 5'-GTGCCGIAGGTGAGTTTA-3' AMTAS (pos 226-239) : 5'-AGCCCGGCCAGTCC-3'	Non précisé
Thermocycleur	ABI Prism 7700 (Applied Biosystems)	- LightCycler 480 System II (Roche) - Applied Biosystems 7500 Fast, 7500 Fast Dx, StepOne - Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 6000 (Qiagen) - Dx Real-Time System, CFX96 Real-Time System
Technologie de PCR	PCR temps réel, sonde Taqman	PCR temps réel, sonde Taqman
Programmes d'amplification	2 min à 50°C, 10 min à 95°C, <u>40 cycles de 2 étapes</u> : 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C	10 sec à 95°C, <u>45 cycles de 2 étapes</u> : 10 sec à 95°C, 40 sec à 60°C
Standard	ADN (plasmide) (génotype 1b)	ADN (plasmide) (génotype 8)
Limite de détection	500 cp/mL	Sang total : 146 cp/mL ; Plasma : 167 cp/mL
Linéarité	10 ¹ -10 ⁶ cp/mL	3,32-7,32 log (échantillons) ; 1,61-10,61 log (gamme)
Génotypes détectés	Tous les génotypes	Tous les génotypes

Tableau 2 – Comparaison des deux principales techniques de quantification des TTV

b. Cinétique de réplication des TTV chez les patients immunodéprimés

Il a été décrit une réplication plus intense des TTV chez des patients infectés par le VIH avec un faible taux de lymphocytes T CD4+ (Shibayama et al., 2001) et chez des patients septiques en réanimation (Walton et al., 2014).

Le Tableau 3 résume les données issues de la littérature chez les patients immunodéprimés depuis 2010. Parmi les études portant sur les patients greffés d'organes solides, les charges virales TTV basales avant transplantation oscillent autour de 3 à 4 log copies/mL. Un pic de réplication des TTV est observé entre 2 et 3 mois après transplantation, correspondant au pic d'immunosuppression. Les charges virales mesurées oscillent alors autour de 7 à 8 log copies/mL. Une corrélation entre des charges virales TTV plus élevées et un risque de complications infectieuses est la conclusion principale des études récentes. La détermination de seuils de charges virales TTV serait alors intéressante et indiquerait quelles charges virales favoriseraient la survenue de complications infectieuses. Ainsi, des charges virales supérieures à 9,49 log cp/mL chez des greffés rénaux (Strassl et al., 2018), à 9,5 log cp/mL chez des greffés pulmonaires (Jaksch et al., 2018) et à 7,5 log cp/mL chez des greffés hépatiques (Ruiz et al., 2019) seraient associées à une immunodépression trop importante. Des charges virales plus faibles ont été observées chez des patients n'ayant pas présenté de virémie à CMV au cours du suivi (Maggi et al., 2018) tandis que des patients présentant une infection ou une maladie à CMV au cours de leur suivi avaient des charges virales TTV plus importantes (Ruiz et al., 2019). Ainsi, des charges virales supérieures à 3,45 log cp/mL lors des 10 premiers jours après la greffe étaient associées à un risque plus important de réactivation du CMV chez des patients greffés rénaux et hépatiques (Maggi et al., 2018). Une corrélation inverse a été observée entre les charges virales TTV et les sous-populations lymphocytaires T (CD3+, CD4+ et CD8+) à 1 mois et à 3 mois après la greffe (Fernández-Ruiz et al., 2019).

Inversement, des charges virales inférieures à 7 log cp/mL chez des greffés pulmonaires (Jaksch et al., 2018) ou inférieures à 4,75 log cp/mL chez des greffés hépatiques (Ruiz et al., 2019) seraient au contraire associées à un risque plus important de rejet du greffon.

Par ailleurs, les patients plus âgés présentent des charges virales plus élevées que les plus jeunes (Fernández-Ruiz et al., 2019; Haloschan et al., 2014).

Population	Charge virale TTV basale (log cp/mL)	Charge virale TTV maximale (log cp/mL)	Délai au pic	Lien des TTV avec...	Technique de quantification des TTV	Référence
Patients autogreffés (n=47)	Moyenne 4,81 log (3,1 - 7,8 log)	Moyenne 7,04 log (5 - 8,5 log)	100 jours	Lymphocytes T CD8+57+	Amplification UTR (Maggi et al., 2003)	(Focosi et al., 2010)
Patients greffés pulmonaires (n=46)	Médiane 4,4 log (2 - 6,4 log)	Médiane 9,4 log (7,6 - 10,7 log)	67 jours	/	Amplification UTR (Maggi et al., 2003)	(Görzer et al., 2015)
Patients allogreffés (n=121)	Médiane 2,39 log (1,4 - 4 log)	Médiane 5,48 log (4,9 - 6,3 log)	2-3 mois	/	Amplification UTR (Moen et al., 2003)	(Masouridi- Levrat et al., 2016)
Patients greffés rénaux (n=715)	Médiane 5,36 log (4,28 - 6,28 log)			Rejet médié par les anticorps	Amplification UTR (Maggi et al., 2003)	(Schiemann et al., 2017)
Patients greffés rénaux (n=169)	Médiane 4,28 log (3,38 - 4,90 log)	Médiane 8,63 log (7,56 - 9,46 log)	92 jours	Infections	Amplification UTR (Maggi et al., 2003)	(Strassl et al., 2018)
Patients greffés pulmonaires (n=143)	3,6 ± 1,9 log	9,5 ± 0,56 log	134 jours	Infections Dysfonction chronique du greffon	Amplification UTR (Maggi et al., 2003)	(Jaksch et al., 2018)

Greffés rénaux (n=146)	3,9 ± 0,1 log	6,9 ± 0,2 log	90 jours	Réactivation CMV	Amplification UTR (Maggi et al., 2003)	(Maggi et al., 2018)
Greffés hépatiques (n=134)	4,2 ± 0,1 log	6,5 ± 0,3 log	80 jours			
Patients greffés rénaux (n=42)	4,3 ± 1,2 log	7,9 ± 1,35 log	75 jours	/	Amplification UTR (TTV R-gene®, Biomérieux)	(Kulifaj et al., 2018)
Patients greffés rénaux (n=221)	2,9 ± 1,6 log	5,7 ± 1,9 log	6 mois	Infections Cancers	Amplification UTR (TTV R-gene®, Biomérieux)	(Fernández-Ruiz et al., 2019)
Patients greffés hépatiques (n=63)	4,14 log (3,42 - 5,08)	7,01 log (6,05 - 8,08 log)	3 mois	Infection CMV Rejet aigu cellulaire modéré	Amplification UTR (Maggi et al., 2003)	(Ruiz et al., 2019)

Tableau 3 - Cinétique de réplication des TTV chez les patients immunodéprimés

III. L'immunodépression post-traumatique

A. Physiopathologie

Les infections représentent une cause importante de morbi-mortalité en réanimation après lésion cérébrale aiguë. Les lésions cérébrales aiguës regroupent les traumatismes crâniens, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les hémorragies sous-arachnoïdiennes et les processus expansifs intracrâniens. Outre les causes liées à la prise en charge réanimatoire, comme les gestes médicaux invasifs ou les pneumopathies d'inhalation, il existe une altération de l'homéostasie immunitaire post-traumatique responsable d'une immunodépression pouvant ainsi favoriser les infections. Cette immunodépression s'explique par la présence de deux réactions opposées : une réaction inflammatoire systémique immédiate rapidement suivie d'une réaction anti-inflammatoire dont l'objectif est de limiter l'expansion de l'inflammation initiale (Roquilly et al., 2015).

1. Rappels sur l'immunité innée

Face à des agressions extérieures telles que la présence de pathogènes ou la destruction tissulaire, l'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme. Il s'agit d'une réponse immédiate, non spécifique, qui met en jeu plusieurs acteurs : les barrières épithéliales, les phagocytes (polynucléaires neutrophiles et macrophages), les lymphocytes NK (*natural killer*) et le complément. L'immunité innée va avoir pour principales fonctions la reconnaissance des pathogènes afin d'initier la phagocytose, l'induction d'une réponse inflammatoire et le déclenchement de l'immunité adaptative qui sera plus spécifique et générera une mémoire immunitaire qui permettra une réponse plus rapide et plus intense en cas de réinfection par le même pathogène.

Lors d'une infection, le déclenchement de la réponse immunitaire innée est basé sur la détection de motifs moléculaires présents chez les microorganismes pathogènes. Ces motifs sont appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), ils sont très conservés (par exemple le lipopolysaccharide bactérien, le peptidoglycane ou l'ADN bactérien) et sont présents uniquement chez les micro-organismes. Les PAMPs vont se lier à des récepteurs reconnaissant les motifs moléculaires (*pattern*

recognition receptor, PRRs) présents à la surface des cellules de l'hôte (phagocytes, cellules dendritiques, lymphocytes). Parmi ces PRRs, il existe des récepteurs de signalisation appelés TLRs (*toll-like receptors*). La fixation d'un PAMP sur son TLR peut entraîner les trois fonctions suivantes :

- induction de l'inflammation via la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages : $TNF-\alpha$ (*Tumor Necrosis Factor*), $IL-1\beta$ (Interleukine), $IL-6$ et $IL-12$. L'augmentation de la perméabilité des vaisseaux permet alors aux cellules recrutées d'adhérer à l'endothélium puis de traverser les vaisseaux
- activation de la phagocytose (médiée par les macrophages et les polynucléaires) entraînant la destruction des pathogènes
- induction de la réponse immunitaire adaptative : après phagocytose d'un pathogène par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) (cellules dendritiques, monocytes), des peptides antigéniques internalisés par la cellule seront exprimés à leur surface en association avec une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (nommé HLA-DR). Ils pourront ainsi être reconnus par les TCR (*T-cell receptor*) des lymphocytes T CD4 naïfs. La reconnaissance des molécules CD80 et CD86 à la surface des CPA par la molécule CD28 du lymphocyte naïf constitue un deuxième signal de costimulation. La cellule T naïve pourra alors se différencier en cellule effectrice, lymphocyte T helper Th1, Th2 ou Th17 en fonction de l'environnement cytokinique (Figure 11) (Medzhitov, 2007).

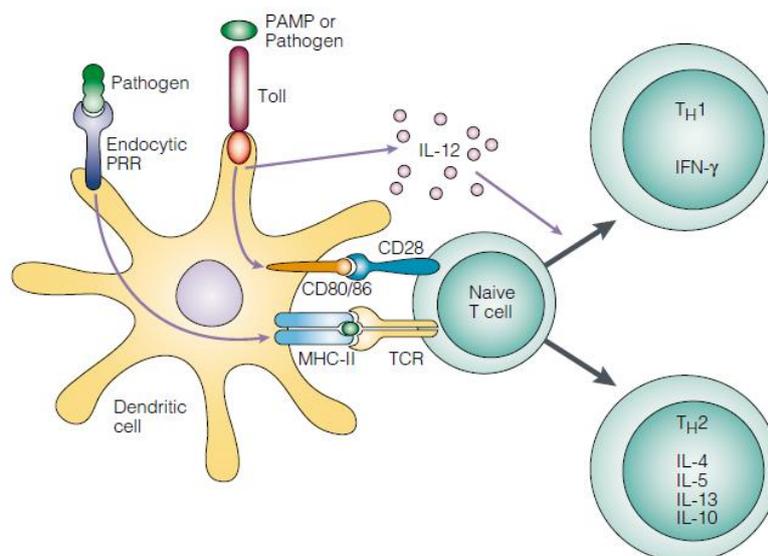


Figure 11 – Rôle des TLR dans l'induction de l'immunité adaptative

(Medzhitov, 2001)

2. Réponse immunitaire post-traumatique

Après une agression cérébrale, les tissus lésés vont libérer des molécules intracellulaires, les *damaged-associated molecular patterns* (DAMPs) : ce sont des protéines cytosoliques, nucléaires ou mitochondriales qui, lorsqu'elles sont libérées dans le milieu extracellulaire, vont entraîner, à l'image des PAMPs pour les pathogènes, l'activation des cellules de l'immunité par l'intermédiaire des TLRs. L'activation de ces TLRs va engendrer la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) qui pourront ainsi recruter les cellules de l'immunité innée et acquise sur le site de l'infection, en favorisant leur maturation et leur multiplication. Cet état pro-inflammatoire va également permettre la maturation et l'activation des cellules présentatrices d'antigène entraînant l'augmentation de l'expression de CD80 et CD86 à leur surface, qui seront nécessaires à l'activation des cellules de l'immunité adaptative. Cette première phase inflammatoire débute immédiatement après le traumatisme et est caractérisée cliniquement par un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS), dont les critères clinico-biologiques sont rappelés dans le Tableau 4. Cette réponse inflammatoire initiale est donc déclenchée en réponse à une agression de l'organisme par des tissus lésés. Si cette réaction persiste et s'amplifie, elle peut en revanche s'avérer délétère et entraîner des défaillances d'organe précoces mais aussi des infections nosocomiales augmentant la morbidité et la mortalité des patients.

SRIS
Au moins 2 éléments parmi :
- Température > 38°C ou < 36°C
- Fréquence cardiaque > 90/min
- Polypnée > 20 cycles/min ou PaCO ₂ < 32 mmHg
- Leucocytes > 12 G/L ou < 4 G/L ou > 10% de granuleux immatures

Tableau 4 – Critères clinico-biologiques du SRIS

(Martinet et al., 2009)

En parallèle de ce SRIS s'instaure une réponse anti-inflammatoire compensatrice (CARS) qui va entrer en équilibre avec le SRIS afin de limiter cette réponse inflammatoire initiale. Elle est médiée par la production de cytokines anti-inflammatoires, principalement l'IL-10,

qui vont limiter la production des cytokines pro-inflammatoires. Plusieurs phénomènes sont alors observés :

- une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) mais conservation de la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires (IL-10)
- l'altération de la fonction de présentation des antigènes des CPA liée à une diminution d'expression du CMH de classe II (HLA-DR) à la surface des monocytes ainsi qu'à une diminution de l'expression de CD80 et CD86 nécessaires au signal de co-stimulation lors de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T naïfs
- une lymphopénie importante avec diminution des lymphocytes circulants et des lymphocytes présents au niveau des organes lymphoïdes, touchant principalement les lymphocytes T et les lymphocytes NK

La CARS, dont le but premier est de limiter l'expansion de la réponse inflammatoire, peut également se prolonger et entraîner une immunodépression post-traumatique favorable à l'apparition d'infections nosocomiales.

Tout déséquilibre en faveur du SRIS ou de la CARS entraîne alors une majoration du risque infectieux, avec apparition principalement de pneumopathies acquises à l'hôpital, mais aussi un risque plus élevé de défaillances multi-viscérales (*multiple organ failure*, MOF) expliquant la morbidité et la mortalité importantes des patients traumatiques en réanimation (Figure 12) (Asehnoune et al., 2012; Roquilly et al., 2015; Ward et al., 2008).

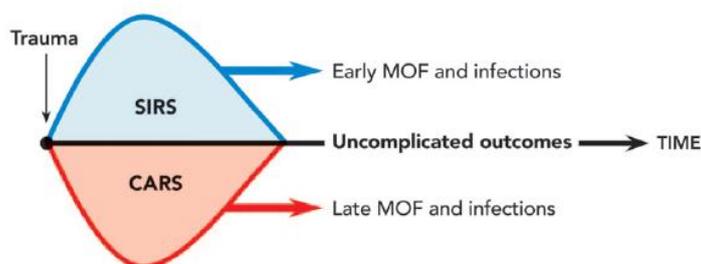


Figure 12 – Equilibre entre le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) et la réponse anti-inflammatoire compensatrice (CARS) dans la morbi-mortalité des patients traumatiques

(Asehnoune et al., 2012)

B. Infections et réactivations virales en réanimation

En France, les infections nosocomiales concernent environ 10% des patients admis en réanimation (Réseau REA-Raisin, 2019), les pneumopathies étant les plus fréquentes. Vingt-huit à 67% des patients cérébro-lésés présentent une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique. Ces réactivations virales sont associées à une augmentation de la mortalité, de la durée de ventilation mécanique et de la durée de séjour en réanimation et pourraient ainsi affecter le devenir neurologique. (Reizine et al., 2019). Les infections sont très majoritairement d'origine bactérienne, parfois fongiques et plus rarement d'origine virale. Parmi les infections respiratoires virales, il faut distinguer deux cas de figure : les infections communautaires provoquées par les virus respiratoires (influenzae, parainflunzae, rhinovirus, adénovirus, virus respiratoire syncytial (VRS), coronavirus, métapneumovirus), et les infections nosocomiales retrouvant majoritairement les virus de la famille des *Herpesviridae* (virus Herpès simplex (HSV) et cytomégalovirus (CMV) principalement) (Luyt, 2012). Au vu de la séroprévalence importante des virus HSV et CMV dans la population générale, il s'agit vraisemblablement de réactivations endogènes et non de primo-infections.

L'isolement de l'HSV dans la salive se retrouve dans 1 à 5% de la population générale, et peut aller jusqu'à 22% chez les patients en réanimation. La détection de l'HSV dans la gorge n'est pas forcément synonyme de pathogénicité : il peut s'agir d'une contamination des voies aériennes par la salive, d'une réactivation locale du virus sans atteinte parenchymateuse associée, ou d'une véritable bronchopneumonie herpétique (Luyt, 2012). Plusieurs études ont associé la réactivation herpétique à l'augmentation de la durée de ventilation mécanique et de la durée de séjour en réanimation ainsi qu'à une augmentation de la morbi-mortalité. Ces observations restent encore discutées et peu d'arguments justifient l'instauration d'un traitement antiviral chez des patients non immunodéprimés (Luyt et al., 2007).

Une virémie à CMV est détectée chez environ un tiers des patients immunocompétents en réanimation (Limaye et al., 2008). Tout comme l'HSV, la détection du CMV dans le sang ou les prélèvements respiratoires ne signe pas nécessairement une maladie pulmonaire à CMV mais peut simplement être le signe d'une réactivation virale locale. Ces réactivations du CMV semblent néanmoins être associées à une augmentation de la durée de ventilation mécanique, de la durée de séjour en réanimation et de la mortalité chez les patients non immunodéprimés. (Coisel et al., 2012; Luyt, 2012).

Deuxième partie : Travail personnel

I. Objectifs

Les infections sont une cause importante de morbi-mortalité chez les patients traumatiques en réanimation. L'existence d'une immunodépression post-traumatique immédiate favoriserait l'apparition de ces infections bactériennes, fongiques et réactivations virales. Les réactivations virales du virus HSV seraient d'ailleurs associées à un moins bon devenir neurologique des patients et à une augmentation de la durée de séjour en réanimation.

L'identification de marqueurs biologiques permettant de différencier les patients susceptibles ou non de faire une infection en réanimation est donc importante et permettrait une meilleure prise en charge des patients à risque d'infection.

Les TTV sont des virus de la famille des *Anelloviridae* et font partie du virome circulant. Leur prévalence est importante, plus de 80% dans la population mondiale, et leur pathogénicité n'est jusqu'à maintenant pas clairement démontrée. Des charges virales très élevées ont été mesurées chez des patients immunodéprimés après une greffe d'organe solide, ce qui en fait des biomarqueurs prometteurs dans la surveillance de la fonction immunitaire chez les patients immunodéprimés.

L'objectif de notre étude préliminaire était donc de s'intéresser à l'évolution des charges virales des TTV dans une cohorte de patients cérébro-lésés hospitalisés en réanimation. L'objectif secondaire était d'essayer de corrélérer ces charges virales des TTV au devenir des patients et à la survenue de réactivations virales.

II. Matériels et méthodes

A. Matériels

1. Population

Les échantillons sélectionnés pour cette étude proviennent de patients inclus dans la cohorte observationnelle et prospective « IBIS-virus », visant à évaluer l'impact des réactivations virales sur le devenir des patients cérébro-lésés en réanimation. Ces patients ont été hospitalisés dans le service de réanimation du CHU de Nantes entre juillet 2015 et octobre 2017. Les critères d'inclusion dans l'étude étaient une hospitalisation en réanimation pour lésion cérébrale aiguë avec un score de Glasgow inférieur ou égal à 12, un âge compris entre 18 et 75 ans, et une durée de ventilation mécanique supérieure à 24 heures. Les différents types de lésions cérébrales aiguës retrouvées sont le traumatisme crânien, l'hémorragie sous-arachnoïdienne par rupture d'anévrisme, les accidents vasculaires cérébraux ischémiques ou hémorragiques (incluant les hématomes intra-parenchymateux spontanés et ruptures de malformations artério-veineuses), et les processus expansifs intracrâniens (hématome sous-dural, empyème, tumeur cérébrale).

Dans notre étude ancillaire, nous avons sélectionné 54 patients issus de cette cohorte en fonction de leur statut sérologique vis-à-vis des virus HSV et CMV et de la présence ou non d'une réactivation du virus HSV. En parallèle, nous avons étudié une population de volontaires sains composée de 40 donneurs de sang de l'Etablissement Français du Sang (EFS).

2. Echantillons biologiques

Dans le cadre de l'étude IBIS-virus, des échantillons de sang périphérique des patients ont été prélevés sur tube EDTA au premier (J1), quatrième (J4), septième jour (J7) et à 6 mois (M6) de l'inclusion. Certains patients sont décédés ou ont été perdus de vue, c'est pourquoi nous n'avons pu analyser que 26 prélèvements à J7 et à M6 (Figure 13). Les échantillons plasmatiques ont été centrifugés et décantés par le Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Nantes puis conservés en aliquots de 1 mL à -80°C . Pour notre étude, la détection et la quantification de l'ADN des TTV a été réalisée à partir de ces plasmas congelés.

Des plasmas EDTA ont également été récupérés pour les 40 volontaires sains.

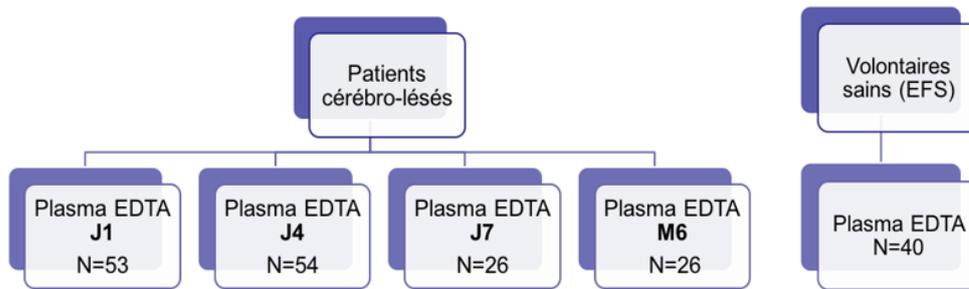


Figure 13 – Schéma de notre étude ancillaire

3. Trousse diagnostique pour la quantification génomique des TTV

Nous avons utilisé la trousse commerciale TTV R-gene[®] de chez Biomérieux pour effectuer la détection et la quantification de l'ADN des TTV. Les amorces choisies permettent d'amplifier une séquence de 128 paires de base dans la région 5'-UTR, région la plus conservée du génome.

Le coffret renferme différents réactifs :

- Le mix d'amplification qui contient les désoxyribonucléotides (dNTP), le tampon d'amplification, la Taq polymérase, les amorces et les sondes spécifiques des TTV et du contrôle interne (IC2).
- Le contrôle interne (IC2) qui, ajouté à chaque échantillon, permet de valider l'extraction des acides nucléiques, et de s'assurer de l'absence d'inhibiteurs de PCR dans les extraits d'ADN.
- Une gamme plasmidique de 4 standards de quantification du génome du TTV-8. La gamme de quantification s'étend de 5000 copies/ μ L à 5 copies/ μ L.

- Un contrôle de sensibilité titré à 1 copie/ μ L de plasmide contenant une partie du génome du TTV-8, afin d'évaluer la performance de la technique au cours du temps.
- Un contrôle négatif (eau distillée) qui permet de vérifier l'absence de contamination pendant l'extraction et l'amplification des acides nucléiques.

4. Thermocycleur

Le thermocycleur utilisé pour l'amplification de l'ADN est le Rotor-Gene Q commercialisé par la société Qiagen. Ce thermocycleur s'utilise avec un carrousel de 36 ou 72 places, qui permet aux échantillons d'être en rotation constante à 400 tours par minute, garantissant une température optimale et une uniformité optique. Le système de refroidissement fait intervenir un flux d'air de la base de la chambre, qui sera ensuite évacué pour être renouvelé.

Le modèle de notre Rotor-Gene Q présente 6 sources d'excitation de type diodes électroluminescentes (LED) permettant l'excitation des fluorochromes. Y sont associés 6 filtres de détection reliés à des photomultiplicateurs permettant de collecter la fluorescence émise. Ce système permet une lecture à 6 longueurs d'ondes différentes, et donc la détection de 6 cibles différentes dans des canaux de lecture, en particulier les canaux « Green » et « Yellow » qui seront utilisés dans notre PCR pour détecter respectivement l'ADN des TTV et l'ADN du contrôle interne.

B. Méthodes

1. Recueil de données

Les données administratives et cliniques des patients ont été recueillies à partir du système d'information hospitalier Cerner Millennium. Les données biologiques ont été récupérées à partir du système informatisé des laboratoires (DxLab).

a. Recueil de données de l'étude IBIS-virus

Dans le cadre du protocole IBIS-virus, des échantillons sanguins sur tubes secs et des sécrétions endo-trachéales ont été prélevés pour chaque patient à J1, J7 et J15 de l'inclusion en réanimation, afin d'évaluer leur statut sérologique vis-à-vis des virus HSV et CMV, puis pour faire le diagnostic ou non de réactivation virale.

Les IgG vis-à-vis des virus HSV-1 et/ou 2 et CMV ont été recherchées à partir de sérums prélevés à J1 de l'inclusion en réanimation, sur l'automate Liaison XL® (DiaSorin) selon les instructions du fournisseur.

Le diagnostic de réactivation virale a été posé par la détection du génome des virus HSV-1 ou 2 ou CMV dans le sang et/ou dans les sécrétions endo-trachéales. Pour cela, il a été effectué 2 PCR « maison » : une PCR duplex qualitative en temps réel détectant les virus HSV-1 et HSV-2 et une PCR quantitative en temps réel détectant spécifiquement le CMV.

b. Recueil des données administratives, cliniques et biologiques

Pour chaque patient, nous avons récupéré des données administratives (âge, sexe, durée de séjour en réanimation, statut vivant/décédé à 6 mois), des données cliniques (type de lésion cérébrale, durée de ventilation mécanique) et des données biologiques (numération formule sanguine, survenue de pneumopathie nosocomiale et autres infections nosocomiales).

2. Extraction des acides nucléiques

L'extraction des acides nucléiques en vue de la détection de l'ADN des TTV a été réalisée sur l'automate MagNA Pure Compact Instrument (Roche) à l'aide du kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, selon les instructions du fournisseur.

Le principe de l'extraction repose sur la séparation des acides nucléiques à l'aide de billes magnétiques. Les échantillons sont d'abord incubés en présence de protéinase K et d'un tampon de lyse contenant des sels chaotropiques. Les acides nucléiques sont ensuite immobilisés par addition de billes magnétiques. Une série de lavages permet ensuite

d'éliminer les protéines, débris cellulaires et inhibiteurs de PCR. Les acides nucléiques sont enfin élués et séparés des billes magnétiques à hautes températures (Figure 14).

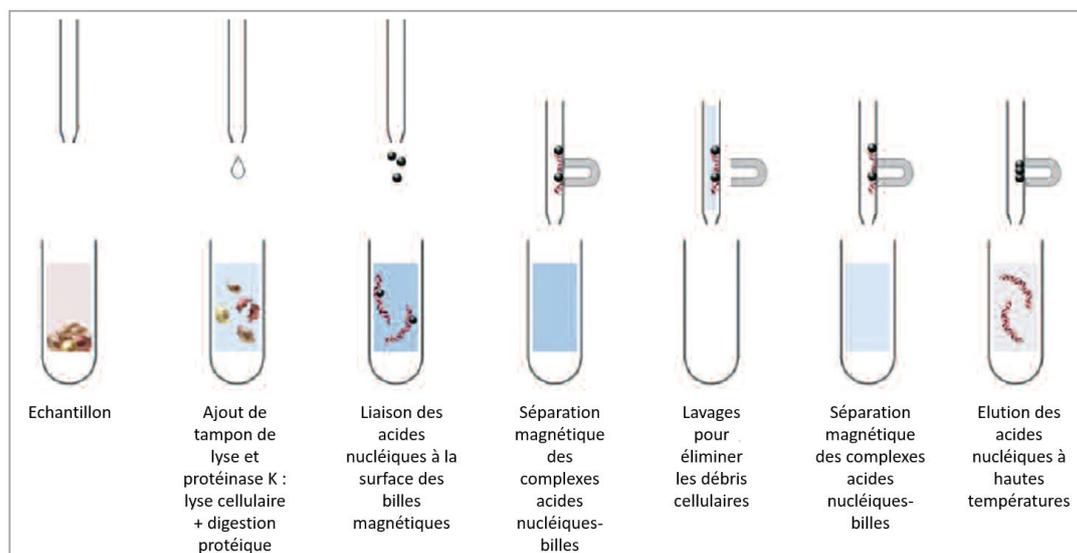


Figure 14 – Principe de l'extraction des acides nucléiques par le MagNA Pure Compact Instrument

Pour extraire chaque échantillon, nous avons utilisé 200 μ L de plasma EDTA, additionné de 10 μ L de contrôle interne ; les acides nucléiques ont été élués dans un volume final de 50 μ L de tampon d'éluion. Les extraits ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

3. Amplification des acides nucléiques

La PCR est une technique de biologie moléculaire qui permet l'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN. Le principe repose sur une succession de cycles de dénaturation, hybridation et élongation de l'ADN générant des produits d'amplification qui serviront de matrice pour le cycle suivant. Au cours de chaque cycle, chaque molécule d'ADN est donc dupliquée, et on obtient alors une concentration théorique exponentielle de 2^n molécules d'ADN, n étant le nombre de cycles de PCR. La PCR en temps réel permet le suivi de l'amplification grâce à la détection de la fluorescence émise par un fluorochrome. Ainsi, on observe au cours de la réaction 3 phases distinctes (Figure 15) :

- Une phase d'initiation : intensité très faible de fluorescence permettant de définir la ligne de base de la courbe

- Une phase exponentielle : accumulation des produits de PCR entraînant une augmentation de la fluorescence qui dépasse la ligne seuil et est symbolisée par le Ct (cycle seuil)
- Une phase de plateau : limitation de certains composants ralentissant la formation de nouveaux produits de PCR

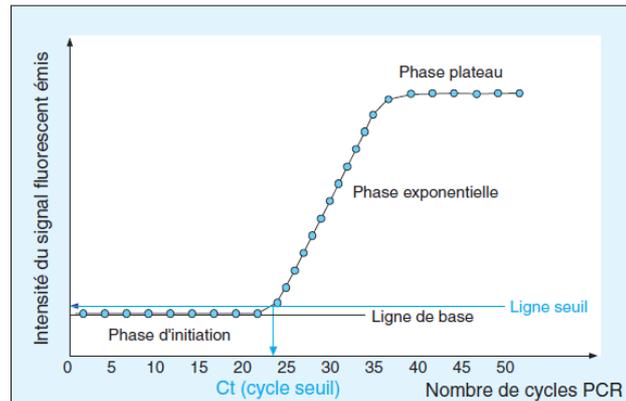


Figure 15 – Différentes phases de la PCR
(Tse and Capeau, 2003)

Dans cette étude, la fluorescence est émise par une sonde nucléotidique spécifique de la séquence à amplifier, appelée sonde Taqman. Cette sonde est marquée en 5' par un premier fluorophore donneur qui va émettre sa fluorescence qui sera ensuite absorbée par le fluorophore *quencher* à l'autre extrémité 3'. Aucune fluorescence n'est donc émise en présence des deux fluorophores. Au cours de l'élongation, la Taq polymérase, à l'aide de son activité 5'-3' nucléase, va hydrolyser la sonde et éloigner ainsi les deux fluorophores, entraînant l'émission d'une fluorescence par le donneur (Figure 16) (Tse and Capeau, 2003).

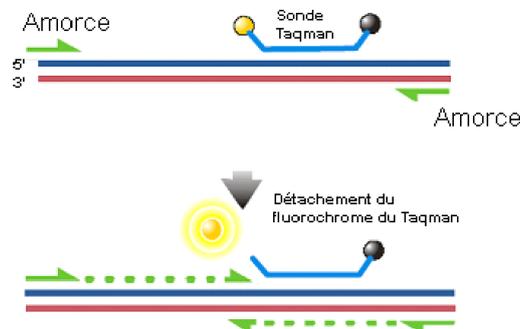


Figure 16 – Principe de l'émission de fluorescence par la sonde Taqman

L'amplification de l'ADN des TTV nécessite 15 µL de mélange réactionnel et 10 µL d'extrait d'ADN.

Le programme d'amplification utilisé débute par une étape de 15 minutes à 95°C afin d'activer la Taq polymérase ; elle est suivie par 45 cycles de 2 étapes, l'une de 10 secondes à 95°C pour la dénaturation de l'ADN, et l'autre de 40 secondes à 60°C pour l'hybridation et l'élongation des acides nucléiques.

4. Critères de validation de la PCR

Afin de valider chaque série de PCR, les conditions suivantes doivent être vérifiées :

- Aspect général des courbes d'amplification avec définition du cycle seuil (Ct) correspondant au point d'inflexion des courbes
- Absence de détection du contrôle négatif (IC2W0) sur le canal Green
- Amplification du contrôle interne du contrôle négatif (IC2W0) sur le canal Yellow :
 $Ct \leq 32$
- Amplification du témoin positif (QS3) sur le canal Green : $26 \leq Ct \leq 32$
- L'efficacité de la réaction doit être comprise entre 0,8 et 1,1
- Pour chaque échantillon, vérification de l'amplification du contrôle interne sur le canal Yellow : $Ct (IC2) \leq Ct (IC2W0) + 3 \text{ cycles}$

5. Analyse statistique

Le logiciel GraphPad Prism® a été utilisé pour les tests statistiques (Test de Mann-Whitney). Un résultat $p < 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif.

III. Résultats

A. Caractéristiques de la population étudiée

Les patients étaient âgés de 18 à 75 ans, avec un âge médian de 50 ans (IQR 33-65). Le sexe ratio était de 1,7. Quarante-sept (87%) patients ont été pris en charge pour traumatisme crânien, 5 (9%) patients présentaient une hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA), 1 (2%) patient un accident vasculaire cérébral (AVC) hémorragique et 1 (2%) patient un méningiome.

Parmi les 54 patients sélectionnés à partir de la cohorte IBIS-virus, 16 (30%) étaient séronégatifs pour l'HSV, tandis que 38 (70%) étaient séropositifs vis-à-vis de l'HSV. Des réactivations virales ont été observées uniquement pour le virus HSV : 16 (41%) patients séropositifs pour l'HSV ont réactivé l'HSV durant leur hospitalisation en réanimation (Figure 17). On a observé 14 réactivations de l'HSV-1 et 1 réactivation de l'HSV-2. Onze (69%) réactivations virales ont eu lieu à J7 de l'admission en réanimation (Figure 18). 15 (94%) réactivations virales ont été observées sur les aspirations trachéales *versus* 3 (19%) réactivations virales observées sur le sang.

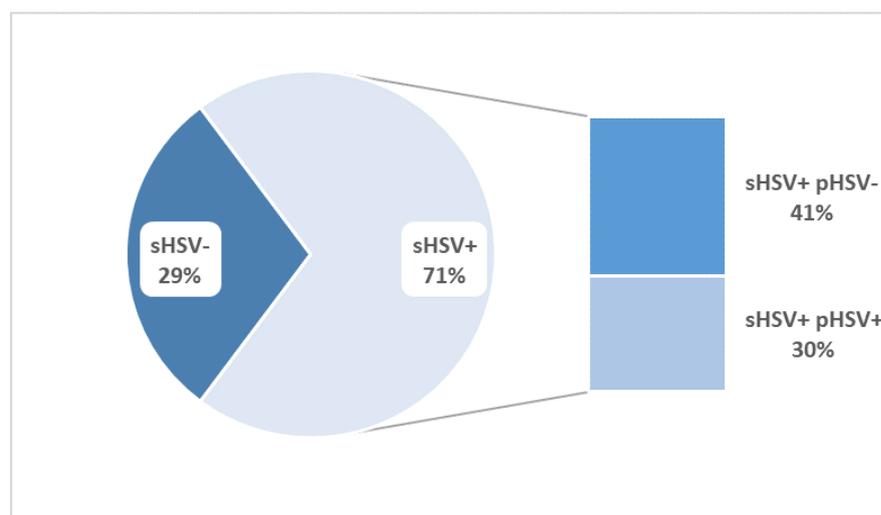


Figure 17 – Statuts sérologiques (sHSV) et réactivations virales HSV (pHSV) des patients

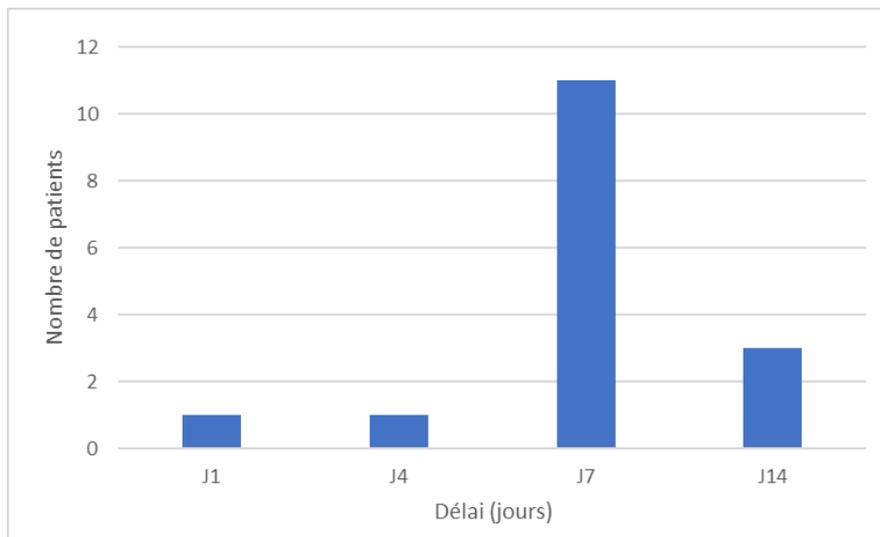


Figure 18 – Délai de réactivation du virus HSV chez les patients séropositifs

Trente et un (58%) patients étaient séronégatifs pour le CMV, 22 (42%) étaient séropositifs pour le CMV. Aucune réactivation du CMV n'a été observée au cours du suivi.

Notre population de patients ne représente qu'un échantillonnage de la cohorte IBIS-virus et les liens observés entre chaque groupe ne sont donc pas représentatifs de la cohorte en elle-même. Nous avons néanmoins observé que les patients présentant une réactivation du virus HSV au cours de leur séjour en réanimation étaient plus âgés (âge médian 65 (58-71) ans) que les patients n'ayant pas réactivé l'HSV (âge médian 45 (32-65) ans) et que les patients séronégatifs (âge médian 41 (23-55) ans). La durée moyenne d'hospitalisation en réanimation était de 25 ± 13 jours, avec des durées d'hospitalisation s'étendant de 6 à 64 jours. La durée de ventilation mécanique moyenne en réanimation était de 17 ± 12 jours, avec des durées minimales et maximales entre 2 et 51 jours. Nous n'avons pas observé de différence sur la durée d'hospitalisation en réanimation et sur la durée de ventilation mécanique entre les différents groupes. Les patients ayant réactivé l'HSV ont présenté plus de pneumopathies bactériennes acquises à l'hôpital : 15 (94%) patients ayant réactivé l'HSV ont présenté une pneumopathie bactérienne acquise à l'hôpital *versus* 9 (41%) chez les patients n'ayant pas réactivé l'HSV et 12 (75%) chez les patients séronégatifs. Sur les 54 patients suivis, 46 (85%) ont survécu et 8 (15%) sont décédés. Les données sont rassemblées dans le Tableau 5.

	sHSV- (n=16)	sHSV+pHSV- (n=22)	sHSV+pHSV+ (n=16)
Age (médiane, IQR)	41 (23-55) ans	45 (32-65) ans	65 (58-71) ans
Sexe masculin (n, %)	12 (75)	14 (64)	8 (50)
Type de lésion			
- Traumatisme crânien	15 (94)	18 (82)	14 (88)
- HSA	1 (6)	3 (14)	1 (6)
- AVC	0	0	1 (6)
- Méningiome	0	1 (4)	0
Durée d'hospitalisation en réanimation (médiane, IQR)	25 jours (21-32)	18 jours (9-26)	26 jours (20-31)
Durée de ventilation mécanique (médiane, IQR)	18 jours (11-28)	11 jours (6-20)	17 jours (9-22)
Infections			
- Pneumopathie bactérienne acquise à l'hôpital	12 (75%)	9 (41%)	15 (94%)
- Autres infections ²	2 (13%)	13 (59%)	1 (6%)
Leucocytes (G/L)			
- J1	13,83 (12,53-21,17)	14,41 (10,34-20,09)	13,11 (10,13-16,21)
- J4	10,17 (7,50-11,50)	11,44 (9,54-12,69)	9,68 (8,03-12,55)
- J7	10,74 (8,67-12,67)	11,36 (9,53-13,75)	11,27 (10,36-12,33)
- M6	6,20 (5,75-7,60)	6,37 (4,76-7,24)	6,68 (5,06-8,74)
Lymphocytes (G/L)			
- J1	1,83 (1,45-2,43)	2,16 (1,13-3,17)	1,42 (0,83-1,98)
- J4	/ ¹	0,86 (0,63-1,09)	/ ¹
- J7	1,16 (1,06-1,35)	2,89 (2,37-3,40)	/ ¹
- M6	2,33 (1,71-2,36)	2,02 (1,87-2,28)	1,65 (1,23-2,40)
Devenir à M6			
- Vivant	14 (87%)	17 (77%)	15 (94%)
- Décédé	2 (13%)	5 (23%)	1 (6%)

Tableau 5 – Caractéristiques de la population étudiée

¹ : Absence de données sur la formule leucocytaire

² Infection urinaire, bactériémie, méningite, orchite

B. Quantification des torque teno virus

1. Quantification des TTV avec la trousse TTV R-gene®

Dans cette étude préliminaire, nous avons utilisé la trousse TTV R-gene® qui s'est avérée d'utilisation simple et rapide. Nous avons réalisé au total 5 séries de PCR dont les résultats sont détaillés ci-dessous.

a. Contrôles négatifs

Pour chaque série de PCR, l'absence d'amplification du contrôle négatif (IC2W0) sur le canal Green était bien vérifiée, témoignant de l'absence de contamination lors de la manipulation.

b. Contrôles internes

Afin de vérifier l'absence d'inhibiteurs de PCR, nous avons vérifié l'amplification du contrôle interne du contrôle négatif (IC2W0) sur le canal Yellow. Le Ct moyen de l'IC2W0 était de 25,15, ce qui est bien inférieur à 32, comme le préconise le fournisseur (Tableau 6).

	Moyennes des Ct	Ecart type	CV (%)
IC2W0	25,15	0,87	3,48

Tableau 6 – Résultats de l'amplification de l'IC2W0

Afin de vérifier une extraction correcte des échantillons et de s'assurer de l'absence d'inhibiteurs de PCR, nous avons évalué l'amplification du contrôle interne des échantillons (IC2) sur le canal Yellow : le Ct moyen du contrôle interne des échantillons était de 24,79 (Tableau 7).

	Moyennes des Ct	Ecart type	CV (%)
IC2	24,79	0,61	2,44

Tableau 7 – Résultats de l'amplification de l'IC2 des échantillons

Le fournisseur préconise une valeur de l'IC2 inférieure ou égale à la valeur de l'IC2W0 + 3 cycles, ce qui est bien le cas. Pour 5 échantillons, l'absence de détection de l'IC2 sur le canal Yellow ou une détection trop tardive ($Ct > 28$) avec une diminution de la fluorescence de plus de 50% par rapport au signal de l'IC2W0 nous a fait suspecter la présence d'un inhibiteur de PCR (Figure 19). Après une nouvelle extraction de chaque échantillon, l'amplification du contrôle interne était correcte et les échantillons ont ainsi pu être analysés.

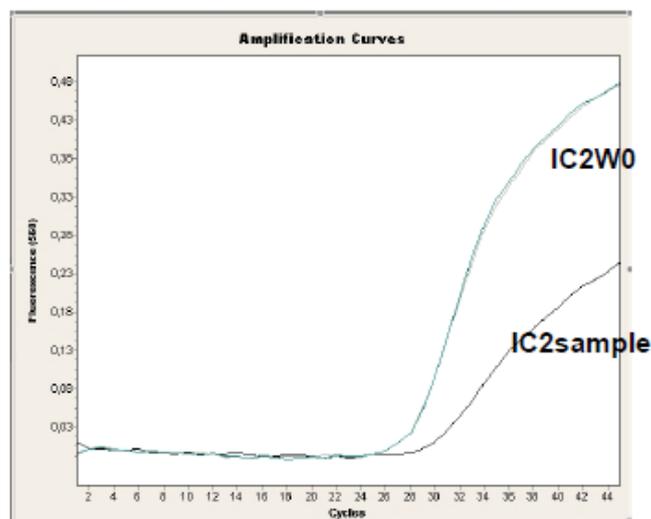


Figure 19 – Inhibiteur de PCR

Exemple d'une courbe d'amplification du contrôle interne avec présence d'un inhibiteur de PCR dans l'extrait de l'échantillon (IC2sample) en comparaison avec le contrôle négatif (IC2W0)

c. Contrôles positifs

Deux contrôles nous ont permis de s'assurer d'une amplification correcte de l'ADN des TTV sur le canal Green : le contrôle positif QS3 et le témoin de sensibilité SC. L'amplification du contrôle positif (QS3) était correcte : le Ct moyen était de 26,41, pour des valeurs comprises entre 26 et 32 selon les instructions du fournisseur (Tableau 9). Le témoin de sensibilité est sorti positif dans chaque série de PCR effectuée, avec un Ct moyen de 32,62 (Tableau 8).

	Concentration calculée (log copies/mL)	Moyennes des Ct	Ecart type	CV (%)
SC	2,35	32,62	0,43	1,33

Tableau 8 – Résultats de l'amplification du témoin de sensibilité

d. Reproductibilité de la gamme plasmidique

L'amplification de la gamme plasmidique était correcte, les valeurs moyennes des Ct de chaque point de gamme sont présentées dans le tableau 9, associées aux concentrations calculées correspondantes exprimées en log copies/mL.

	QS4		QS3		QS2		QS1	
	Ct	Concentration calculée (log cp/mL)						
Moyenne	30,03	3,08	26,41	4,12	22,98	5,10	19,51	6,09
Ecart type	0,36	0,04	0,27	0,04	0,30	0,04	0,17	0,04
CV (%)	1,21	1,29	1,04	0,90	1,29	0,73	0,85	0,63

Tableau 9 – Résultats de l'amplification de la gamme plasmidique

L'efficacité de la réaction était satisfaisante, avec une efficacité moyenne de 0,93 (Tableau 10) pour des valeurs préconisées entre 0,8 et 1,1.

	Moyenne	Ecart type	CV (%)
Efficacité	0,93	0,03	3,09

Tableau 10 – Résultats de l'efficacité des réactions de PCR

2. Quantification des TTV dans la cohorte

a. Fréquence de détection des TTV

Sur les 199 échantillons plasmatiques analysés, patients et volontaires sains confondus, une virémie à TTV était détectable pour 114 (57%) d'entre eux et est restée stable à J1, J4 et J7. La fréquence de détection des TTV était un peu plus élevée (65%) à M6 (Figure 20).

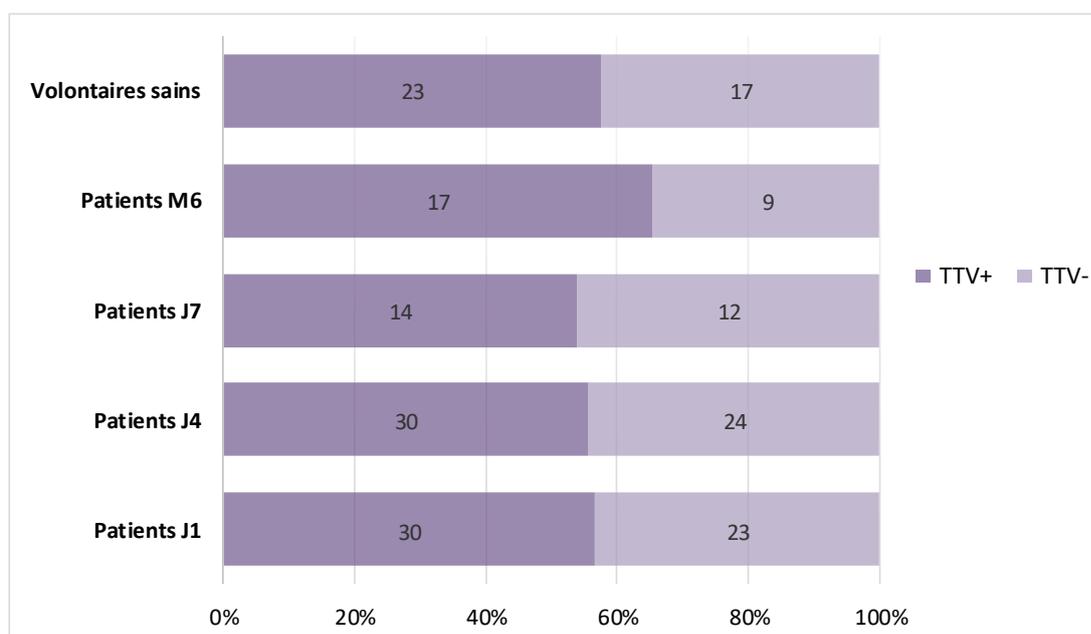


Figure 20 – Pourcentages de PCR TTV positives chez les volontaires sains et les patients au cours du suivi

Une virémie à TTV est détectée de manière plus fréquente chez les patients et les volontaires sains séropositifs vis-à-vis de l'HSV (sHSV+) que chez les séronégatifs (sHSV-). La fréquence de détection des TTV est par ailleurs encore plus fréquente chez les patients ayant réactivé l'HSV (sHSV+pHSV+) que chez ceux ne l'ayant pas réactivé (sHSV+pHSV-) (Figure 21).

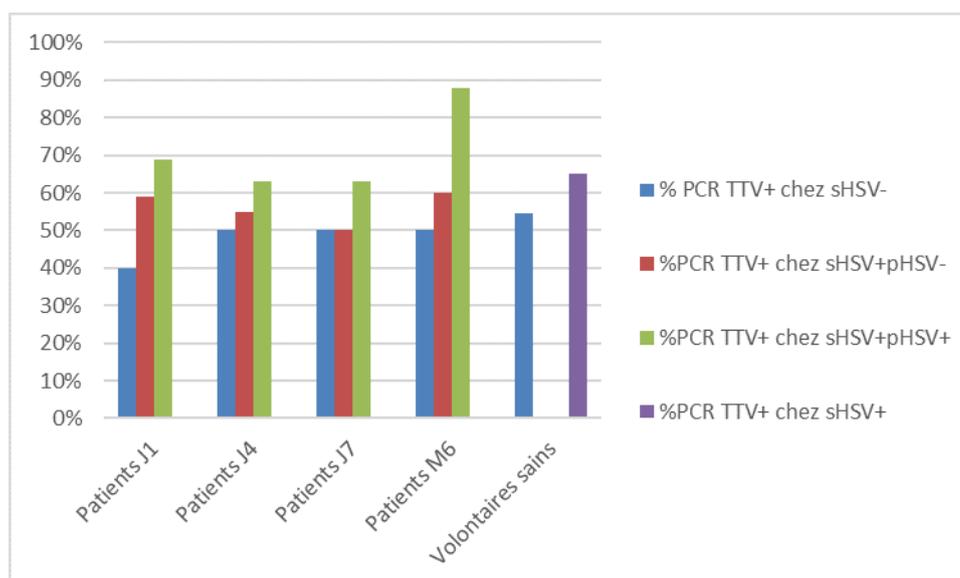


Figure 21 - Pourcentages de PCR TTV positives en fonction du statut sérologique (sHSV) et de la réactivation du virus HSV (pHSV) chez les volontaires sains et les patients au cours du suivi

b. Charges virales des TTV

Les charges virales moyennes des 199 échantillons plasmatiques étaient de $1,50 \pm 1,42$ log cp/mL (médiane 1,70 log cp/mL (IQR 0 – 2,64)) avec des charges virales allant de 0 à 4,28 log cp/mL. Les charges virales moyennes des volontaires sains et des patients semblaient supérieures chez les séropositifs vis-à-vis de l'HSV et chez les patients ayant réactivé l'HSV (Tableau 11).

	sHSV-	sHSV+	
		sHSV+pHSV-	sHSV+pHSV+
Charges virales TTV Patients (log cp/mL)	$1,10 \pm 1,26$	$1,54 \pm 1,46$	$1,85 \pm 1,47$
Charges virales TTV Volontaires sains (log cp/mL)	$1,38 \pm 1,34$	$1,68 \pm 1,47$	

Tableau 11 – Comparaison des charges virales TTV moyennes entre les volontaires sains et les patients à tous les points du suivi en fonction du statut sérologique et de la réactivation du virus HSV

Les charges virales totales étaient plus élevées chez les patients ayant réactivé l'HSV (moyenne : 1,85 log copies/mL) que chez les patients séronégatifs pour l'HSV (1,10 log copies/mL) ($p=0,015$) (Figure 22).

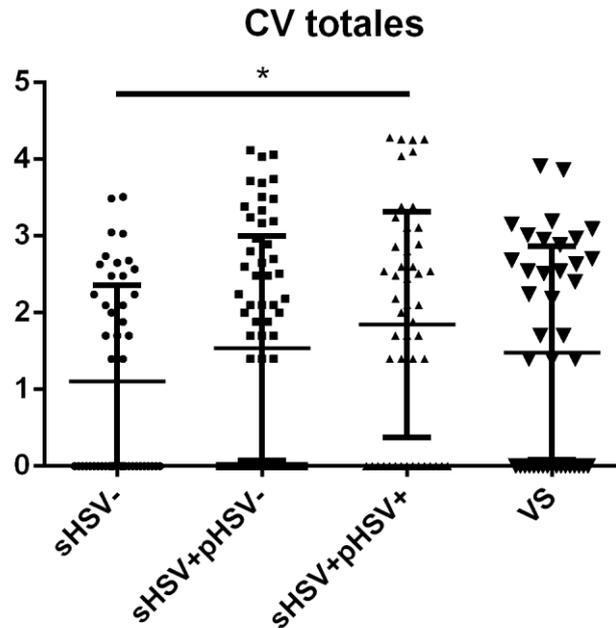


Figure 22 – Comparaison des charges virales à tous les points du suivi

Comparaison des charges virales à tous les points du suivi entre les 4 groupes : patients séronégatifs, patients séropositifs sans réactivation, patients séropositifs avec réactivation, volontaires sains

Les charges virales moyennes ne variaient pas entre les patients séronégatifs pour le CMV ($1,50 \pm 1,38$ log cp/mL) et les patients séropositifs ($1,54 \pm 1,53$ log cp/mL).

c. Cinétique de répliation des TTV au cours du suivi

L'évolution des charges virales TTV au cours du temps sont présentées dans le Tableau 12 et la Figure 23. Les charges virales TTV moyennes ont tendance à être plus élevées chez les patients ayant réactivé l'HSV que chez ceux ne l'ayant pas réactivé et chez les patients séronégatifs, à tous les points du suivi.

	sHSV-	sHSV+pHSV+	p
J1	1,04 ± 1,38	1,76 ± 1,51	0,23
J4	1,18 ± 1,31	1,76 ± 1,57	0,27
J7	1,10 ± 1,21	1,79 ± 1,63	0,36
M6	1,06 ± 1,19	2,25 ± 1,23	0,07

Tableau 12 – Charges virales TTV moyennes au cours du suivi

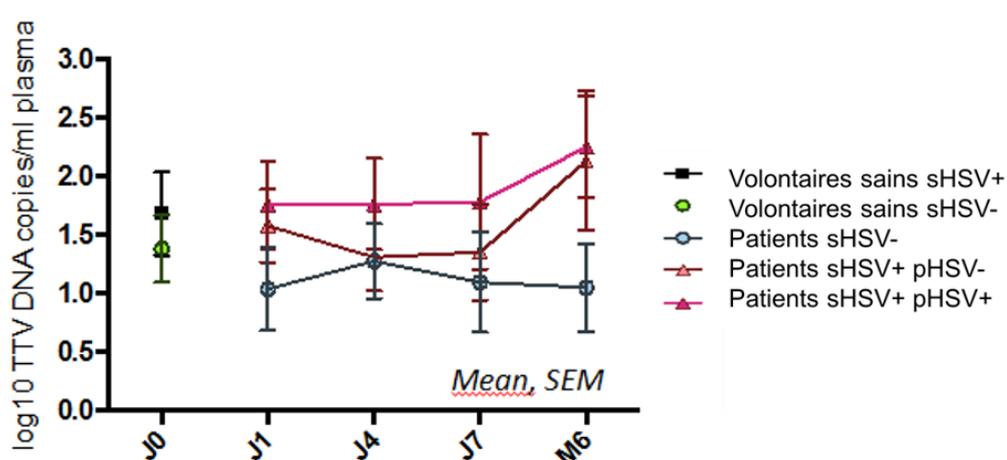


Figure 23 – Evolution des charges virales TTV au cours du temps en fonction du statut sérologique et de la réactivation du virus HSV

Nous n'avons pas observé de cinétique d'évolution particulière lors du suivi précoce (entre J1 et J7) chez les patients quelque soit leur statut sérologique et leur réactivation de l'HSV. Les charges virales TTV semblaient néanmoins plus élevées 6 mois après l'admission en réanimation.

d. Corrélation de la réplication des TTV à l'évolution clinique des patients

Afin d'essayer de corréler l'évolution clinique des patients en fonction de la réplication des TTV, nous les avons classé en 3 groupes : les patients pour lesquels nous n'avons observé aucune virémie au cours du suivi (TTV-); les patients pour lesquels une

virémie TTV a été détectée à au moins un point du suivi (TTV+ à au moins un point du suivi) ; et les patients pour lesquels une virémie a été détectée tout au long du suivi (TTV+ à tous les points du suivi). Vingt-six patients avaient une virémie TTV détectable tout au long du suivi. Ces patients étaient plus âgés (56 (40-65) ans) que les patients non virémiques (42 (23-60) ans). Il y avait également plus de patients virémiques à au moins un point du suivi étant séropositifs pour l'HSV et ayant réactivé l'HSV. Aussi, plus de patients présentant une virémie à TTV étaient également séropositifs pour le CMV. Nous n'avons pas observé davantage d'épisodes infectieux chez les patients répliquant le TTV que chez les patients non virémiques, de même pour le statut vivant/décédé à 6 mois. Les données sont rassemblées dans le Tableau 13.

	TTV- (n=15)	TTV+ à au moins 1 point du suivi (n=39)	TTV+ à tous les points du suivi (n=26)
Age (médiane, IQR)	42 (23-60) ans	57 (40-68) ans	56 (40-65) ans
Sexe masculin (n, %)	9 (60)	25 (64)	16 (62)
Patients séropositifs pour l'HSV	8 (53%)	30 (77%)	20 (77%)
Réactivation HSV	2 (25%)	14 (36%)	8 (40%)
Patients séropositifs pour le CMV	5 (33%)	17 (44%)	10 (38%)
Durée d'hospitalisation en réanimation (médiane, IQR)	25 jours (19-35)	22 jours (14-29)	21 jours (12-26)
Durée de ventilation mécanique (médiane, IQR)	19 jours (11-28)	13 jours (8-21)	11 jours (6-18)
Infections			
- Pneumopathie bactérienne acquise à l'hôpital	11 (73%)	25 (64%)	17 (65%)
- Autres infections ²	4 (27%)	13 (33%)	6 (23%)
Leucocytes (G/L)			
- J1	15,06 (12,08-19,70)	13,53 (10,18-17,45)	13,40 (12,58-16,55)
- J4	11,80 (10,94-12,83)	9,88 (7,82-12,15)	9,55 (8,06-11,65)
- J7	12,07 (10,20-14,69)	11,09 (8,75-12,53)	11,18 (8,94-12,65)
- M6	5,92 (5,41-6,84)	6,37 (5,04-8,26)	7,47 (5,27-8,31)
Lymphocytes (G/L)			
- J1	1,48 (1,08-2,28)	1,77 (1,15-3,12)	1,62 (1,13-3,12)
- J4	/ ¹	0,95 (0,77-1,09)	0,95 (0,77-1,09)
- J7	/ ¹	1,16 (0,95-1,53)	1,53 (1,35-2,72)
- M6	1,98 (1,58-2,25)	1,99 (1,64-2,44)	2,13 (1,65-2,57)
Devenir à M6			
- Vivant	13 (87%)	33 (85%)	21 (81%)
- Décédé	2 (13%)	6 (15%)	5 (19%)

Tableau 13 – Caractéristiques des patients et évolution clinique en fonction de la réplication des TTV au cours du suivi

¹ : Absence de données sur la formule leucocytaire

² Infection urinaire, bactériémie, méningite, orchite

IV. Discussion

Les patients cérébro-lésés en réanimation présentent un état d'immunodépression post-traumatique favorisant les infections nosocomiales, notamment des réactivations virales, pouvant allonger la durée de ventilation mécanique et la durée de séjour en réanimation mais aussi augmenter la morbidité et la mortalité. Trouver des marqueurs biologiques permettant de surveiller et monitorer la fonction immunitaire de ces patients permettrait alors une prise en charge optimisée quant à l'apparition d'infections (Roquilly et al., 2015). Les TTV font partie de la famille des *Anelloviridae*, appartiennent au virome circulant et ont un lien avec le système immunitaire. Cette propriété en fait d'eux des marqueurs prometteurs pour le suivi du statut immunitaire.

Le premier objectif de notre étude était d'évaluer les charges virales des TTV dans une cohorte de patients cérébro-lésés qui présentent un état d'immunodépression post-traumatique, à risque de complications infectieuses. Pour cela, nous avons utilisé la trousse commerciale TTV R-gene[®] de chez bioMérieux. La séquence nucléotidique amplifiée se situe dans la zone conservée 5'-UTR, afin de détecter tous les génotypes. En effet, de nombreuses études ont utilisé des amorces situées en zone codante (ORF1) mais au vu de la variabilité de cette séquence, tous les génotypes n'étaient pas détectés. Dans la littérature, la majorité des études utilisent des PCR « maisons ». La PCR mise au point par Maggi *et al* (Maggi et al., 2003) a été utilisée dans de nombreuses études par la suite et a ainsi été considérée comme méthode de référence.

La fréquence de détection globale des TTV était de 57% sur la totalité des échantillons testés. Une prévalence de 45% a par ailleurs été retrouvée chez des volontaires sains à l'aide de cette même trousse d'amplification TTV R-gene[®] (Kulifaj et al., 2018). Il n'y avait pas de différence significative entre volontaires sains et patients à tous points du suivi. Ces résultats sont inférieurs à ceux retrouvés dans la majorité des études chez les volontaires sains, détaillés dans le Tableau 1, p. 28. La majorité de ces études présentent en effet des prévalences de détection des TTV au niveau plasmatique supérieures ou égales à 85%. La trousse ne semble pourtant pas manquer de sensibilité, puisque la limite de détection est fixée à 167 copies/mL (2,2 log copies/mL) sur plasma, ce qui est inférieur à la technique « maison » (Kulifaj et al., 2018; Maggi et al., 2003).

Les charges virales mesurées dans notre cohorte de patients étaient également faibles (médiane 1,70 log cp/mL (IQR 0 – 2,64)), sans différence significative entre les volontaires sains et les patients au cours du suivi. En se basant sur la limite de détection annoncée par le fournisseur, 63% de nos charges virales étaient inférieures à la limite de détection de la technique : nous avons donc choisi d’extrapoler nos charges virales et d’interpréter toutes les valeurs obtenues.

Dans la littérature, les charges virales TTV mesurées chez des volontaires sains ou des patients non immunodéprimés oscillent autour de 3 log cp/mL. A l’aide de la même trousse commerciale, les charges virales moyennes mesurées chez des volontaires sains étaient de $2,8 \pm 1,09$ log cp/mL (Kulifaj et al., 2018) (Tableau 14).

Population	Charges virales TTV	Technique	Référence
Volontaires sains au Japon (n=178)	3,1 ± 0,9 log cp/mL	Amplification UTR	(Shibayama et al., 2001)
Volontaires sains aux Etats-Unis (n=165)	4,32 log cp/mL	Amplification UTR	(Walton et al., 2014)
Patients non septiques en réanimation aux Etats-Unis (n=160)	4,43 log cp/mL	Amplification UTR	(Walton et al., 2014)
Volontaires sains en Suisse (n=74)	2,23 log cp/mL (1,4-3,24 log cp/mL)	Amplification UTR	(Masouridi-Levrat et al., 2016)
Volontaires sains en France (n=31)	2,8 ± 1,09 log cp/mL	Amplification UTR	(Kulifaj et al., 2018)
Volontaires sains en France (n=40)	1,48 ± 1,39 log cp/mL	Amplification UTR	Résultats issus de notre étude

Tableau 14 – Charges virales moyennes des TTV sur plasma chez des volontaires sains

Les échantillons de sang total des patients de notre cohorte ont été décantés puis congelés à -80°C au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nantes. Ils n’ont été décongelés qu’une seule fois lors de l’extraction de l’ADN. Il est peu probable qu’une

dégradation de l'ADN des TTV ait pu avoir lieu, et n'explique donc pas nos résultats de charges virales plus faibles.

La trousse TTV R-gene[®] a par ailleurs été évaluée par d'autres centres chez des patients greffés rénaux. Les charges virales avant transplantation sont présentées dans le Tableau 15.

Population	Charges virales basales TTV	Référence
Patients greffés rénaux (n=70)	2,89 log cp/mL	(Solis et al., 2017)
Patients greffés rénaux (n=42)	4,3 ± 1,2 log cp/mL	(Kulifaj et al., 2018)
Patients greffés rénaux (n=221)	2,9 ± 1,6 log cp/mL	(Fernández-Ruiz et al., 2019)

Tableau 15 – Charges virales moyennes des TTV avant transplantation rénale

En parallèle de notre étude, nous avons testé notre trousse sur 3 patients greffés rénaux. Les échantillons plasmatiques testés avaient été prélevés dans le cadre du suivi sanguin du BK virus après transplantation, et ont été recueillis à respectivement J30, J180 et J37 après la greffe. La moyenne des charges virales TTV mesurées était de $4,46 \pm 0,74$ log copies/mL (Tableau 16). Ces charges virales sont plus élevées que celles observées dans la cohorte de patients cérébro-lésés, ce qui laisse penser qu'il ne s'agit pas d'un problème technique, mais que les charges virales sont réellement faibles chez les patients de l'étude.

	Charges virales TTV (log cp/mL)	Délai post-greffe
Patient 1	4,14	J30
Patient 2	3,94	J180
Patient 3	5,30	J37

Tableau 16 – Charges virales TTV mesurées chez des patients greffés rénaux

Chez les patients greffés d'organes solides et greffés de cellules souches hématopoïétiques, les charges virales maximales sont observées autour du pic

d'immunodépression, soit 1 à 2 mois après la greffe. Les 3 prélèvements initiaux recueillis pour chaque patient de notre cohorte étaient à J1, J4 et J7 de l'admission en réanimation, c'est-à-dire très précoces. La durée de suivi est peut être insuffisante ; la durée moyenne d'hospitalisation en réanimation était de 25 jours. De plus, les charges virales TTV avaient tendance à augmenter au point M6 chez les patients cérébro-lésés et séropositifs HSV de notre étude. Ces résultats seront à confirmer sur un plus grand nombre de patients.

Il n'existe à ce jour aucune étude comparant la trousse TTV R-gene[®] avec des PCR « maison ». Il pourrait être intéressant de retester nos échantillons à l'aide d'une PCR « maison » en se procurant les amorces utilisées par Maggi *et al.* Nous pourrions ainsi évaluer si nos faibles charges virales sont liées à la technique que nous avons utilisé ou s'il existe réellement une faible répllication des TTV chez ces patients. La commercialisation de la trousse TTV R-gene[®] et la mise en place d'un programme de contrôle de qualité externe par la société QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostic) vont ainsi permettre la standardisation des résultats et une comparaison des charges virales TTV entre les différentes études (Focosi and Maggi, 2018).

Le deuxième objectif de notre étude était d'essayer d'établir un lien entre les charges virales des TTV chez les patients cérébro-lésés et leur devenir et la survenue de réactivations virales. La répllication des TTV était plus fréquente chez les patients séropositifs pour l'HSV et plus fréquente encore chez les patients ayant réactivé l'HSV. Du fait de notre petit échantillonnage de patients, les résultats n'étaient pas significatifs. Par ailleurs, les charges virales totales étaient significativement plus élevées chez les patients ayant réactivé l'HSV que chez les patients séronégatifs pour l'HSV. Nous avons de plus observé une tendance à une répllication plus importante chez les patients ayant réactivé l'HSV à tous les points du suivi. La réactivation de l'HSV semble être associée à une immunodépression plus importante chez les patients en réanimation entraînant une augmentation de la durée de ventilation mécanique, de la durée de séjour en réanimation et de la morbi-mortalité. Des charges virales TTV plus fréquentes et plus élevées chez ces patients seraient donc en accord avec les observations faites chez des patients immunodéprimés après transplantation d'organe solide. Ainsi, la quantification des charges virales TTV dans notre cohorte de patients cérébro-lésés pourrait permettre d'évaluer les patients plus à risque de réactivation virale. La présence de faibles charges virales nous fait considérer ces observations avec prudence et une extension de l'étude à un plus grand nombre de patients est évidemment nécessaire.

La fréquence de détection des TTV semble un peu plus élevée chez les patients séropositifs vis-à-vis du CMV que chez les séronégatifs, nous n'avons pas observé de profil d'évolution particulier dans ces deux groupes de patients au cours du suivi. Plusieurs études montrent une prévalence plus importante des TTV chez les patients séropositifs vis-à-vis du CMV (Fernández-Ruiz et al., 2019; Haloschan et al., 2014).

Les patients présentant une virémie à TTV étaient plus âgés que les patients non virémiques, ce qui est en accord avec d'autres études (Haloschan et al., 2014). Nous n'avons par contre pas observé de lien entre une répllication des TTV et un moins bon devenir des patients cérébro-lésés.

La répllication des TTV a été recherchée uniquement dans le plasma de nos patients. Or, des études ont montré la répllication plus importante des TTV dans les prélèvements nasopharyngés de patients atteints d'affections respiratoires aiguës (Maggi et al., 2003) ou dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients transplantés pulmonaires (Young et al., 2015). La recherche d'une répllication des TTV dans les prélèvements respiratoires de nos patients aurait pu être intéressante : il est possible qu'une répllication des TTV au niveau du tractus respiratoire ait eu lieu, même en l'absence de répllication plasmatique.

En conclusion, nos résultats sont préliminaires et nécessitent d'être étendus à un plus grand nombre de patients. Au vu du coût de la trousse et des faibles charges virales mesurées, il serait intéressant de mettre au point une PCR « maison » à l'aide des amorces de Maggi *et al* afin de continuer cette étude et nous permettre ainsi de retester nos patients avec cette autre technique. Enfin, une étude plus étendue du virome sanguin serait intéressante chez ces patients cérébro-lésés.

Références bibliographiques

Asabe, S., Nishizawa, T., Iwanari, H., Okamoto, H., 2001. Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT virus genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 298–304.

Asehnoune, K., Roquilly, A., Abraham, E., 2012. Innate immune dysfunction in trauma patients: from pathophysiology to treatment. *Anesthesiology* 117, 411–416.

Bagaglio, S., Sitia, G., Prati, D., Cella, D., Hasson, H., Novati, R., Lazzarin, A., Morsica, G., 2002. Mother-to-child transmission of TT virus: sequence analysis of non-coding region of TT virus in infected mother-infant pairs. *Arch. Virol.* 147, 803–812.

Bernardi, F., Timchenko, T., 2008. Réplication des géminivirus : le mécanisme du cercle roulant chez les plantes. *Virologie* 12, 117–135.

Biagini, P., 2009. Classification of TTV and Related Viruses (Anelloviruses), in: de Villiers, E.-M., Hausen, H. zur (Eds.), *TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogens, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 21–33.

Biagini, P., de Micco, P., 2010. La famille des Anelloviridae : virus TTV et genres apparentés. *Virologie* 14, 3–16.

Biagini, P., Gallian, P., Cantaloube, J.-F., Attoui, H., de Micco, P., de Lamballerie, X., 2006. Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in French blood donors. *J. Med. Virol.* 78, 298–304.

Biagini, P., Gallian, P., Cantaloube, J.-F., De Micco, P., de Lamballerie, X., 1998. Presence of TT virus in French blood donors and intravenous drug users. *J. Hepatol.* 29, 684–685.

Cancela, F., Ramos, N., Mirazo, S., Mainardi, V., Gerona, S., Arbiza, J., 2016. Detection and molecular characterization of Torque Teno Virus (TTV) in Uruguay. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 44, 501–506.

Charlton, M., Adjei, P., Poterucha, J., Zein, N., Moore, B., Therneau, T., Krom, R., Wiesner, R., 1998. TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* 28, 839–842.

Coisel, Y., Bousbia, S., Forel, J.-M., Hraïech, S., Lascola, B., Roch, A., Zandotti, C., Million, M., Jaber, S., Raoult, D., Papazian, L., 2012. Cytomegalovirus and herpes simplex virus effect on the prognosis of mechanically ventilated patients suspected to have ventilator-associated pneumonia. *PLoS One* 7, e51340.

De Vlaminc, I., Khush, K.K., Strehl, C., Kohli, B., Luikart, H., Neff, N.F., Okamoto, J., Snyder, T.M., Cornfield, D.N., Nicolls, M.R., Weill, D., Bernstein, D., Valantine, H.A., Quake, S.R., 2013. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell* 155, 1178–1187.

Deng, X., Terunuma, H., Handema, R., Sakamoto, M., Kitamura, T., Ito, M., Akahane, Y., 2000. Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. *J. Med. Virol.* 62, 531–537.

Desai, M., Pal, R., Deshmukh, R., Banker, D., 2005. Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines. *J. Med. Virol.* 77, 136–143.

Fernández-Ruiz, M., Albert, E., Giménez, E., Ruiz-Merlo, T., Parra, P., López-Medrano, F., San Juan, R., Polanco, N., Andrés, A., Navarro, D., Aguado, J.M., 2019. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 19, 1139–1149.

Focosi, D., Antonelli, G., Pistello, M., Maggi, F., 2016. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 589–593.

Focosi, D., Maggi, F., 2018. Torque teno virus monitoring in transplantation: The quest for standardization. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*

Focosi, D., Maggi, F., Albani, M., Macera, L., Ricci, V., Gragnani, S., Di Beo, S., Ghimenti, M., Antonelli, G., Bendinelli, M., Pistello, M., Ceccherini-Nelli, L., Petrini, M., 2010. Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 47, 189–192.

Foulongne, V., 2015. Le virome humain. *Rev. Francoph. Lab., Microbiote humain* 2015, 59–65.

Görzer, I., Jaksch, P., Kundi, M., Seitz, T., Klepetko, W., Puchhammer-Stöckl, E., 2015. Pre-transplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation. *PLoS One* 10, e0122975.

Haloschan, M., Bettesch, R., Görzer, I., Weseslindtner, L., Kundi, M., Puchhammer-Stöckl, E., 2014. TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. *Age Dordr. Neth.* 36, 9716.

Hino, S., 2002. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev. Med. Virol.* 12, 151–158.

- Hino, S., Miyata, H., 2007. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev. Med. Virol.* 17, 45–57.
- Hsiao, K.-L., Wang, L.-Y., Lin, C.-L., Liu, H.-F., 2016. New Phylogenetic Groups of Torque Teno Virus Identified in Eastern Taiwan Indigenes. *PloS One* 11, e0149901.
- Jaksch, P., Kundi, M., Görzer, I., Muraközy, G., Lambers, C., Benazzo, A., Hoetzenecker, K., Klepetko, W., Puchhammer-Stöckl, E., 2018. Torque Teno Virus as a Novel Biomarker Targeting the Efficacy of Immunosuppression After Lung Transplantation. *J. Infect. Dis.* 218, 1922–1928.
- Kakkola, L., Hedman, K., Qiu, J., Pintel, D., Söderlund-Venermo, M., 2009. Replication of and protein synthesis by TT viruses, in: *TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogens, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 53–64.
- Kakkola, L., Tommiska, J., Boele, L.C.L., Miettinen, S., Blom, T., Kekarainen, T., Qiu, J., Pintel, D., Hoeben, R.C., Hedman, K., Söderlund-Venermo, M., 2007. Construction and biological activity of a full-length molecular clone of human Torque teno virus (TTV) genotype 6. *FEBS J.* 274, 4719–4730.
- Kamahora, T., Hino, S., Miyata, H., 2000. Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J. Virol.* 74, 9980–9986.
- Kulifaj, D., Durgueil-Lariviere, B., Meynier, F., Munteanu, E., Pichon, N., Dubé, M., Joannes, M., Essig, M., Hantz, S., Barranger, C., Alain, S., 2018. Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 105, 118–127.
- Leppik, L., Gunst, K., Lehtinen, M., Dillner, J., Streker, K., de Villiers, E.-M., 2007. In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses. *J. Virol.* 81, 9346–9356.
- Limaye, A.P., Kirby, K.A., Rubenfeld, G.D., Leisenring, W.M., Bulger, E.M., Neff, M.J., Gibran, N.S., Huang, M.-L., Santo Hayes, T.K., Corey, L., Boeckh, M., 2008. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 300, 413–422.
- Luyt, C., Combes, A., Nieszkowska, A., Chastre, J., 2007. Infections respiratoires à virus herpes simplex en réanimation. *Réanimation* 16, 219–225.
- Luyt, C.-E., 2012. Infections respiratoires virales à herpesviridae en réanimation. *Réanimation* 21, 331–338.
- Maggi, F., Andreoli, E., Lanini, L., Fornai, C., Vatteroni, M., Pistello, M., Presciuttini, S., Bendinelli, M., 2005. Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4807–4810.

Maggi, F., Bendinelli, M., 2009. Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses, in: *TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogens, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 65–90.

Maggi, F., Focosi, D., Statzu, M., Bianco, G., Costa, C., Macera, L., Spezia, P.G., Medici, C., Albert, E., Navarro, D., Scagnolari, C., Pistello, M., Cavallo, R., Antonelli, G., 2018. Early Post-Transplant Torquetenovirus Viremia Predicts Cytomegalovirus Reactivations In Solid Organ Transplant Recipients. *Sci. Rep.* 8, 15490.

Maggi, F., Fornai, C., Zaccaro, L., Morrica, A., Vatteroni, M.L., Isola, P., Marchi, S., Ricchiuti, A., Pistello, M., Bendinelli, M., 2001. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J. Med. Virol.* 64, 190–194.

Maggi, F., Pifferi, M., Fornai, C., Andreoli, E., Tempestini, E., Vatteroni, M., Presciuttini, S., Marchi, S., Pietrobelli, A., Boner, A., Pistello, M., Bendinelli, M., 2003. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J. Virol.* 77, 2418–2425.

Mariscal, L.F., López-Alcorocho, J.M., Rodríguez-Iñigo, E., Ortiz-Movilla, N., de Lucas, S., Bartolomé, J., Carreño, V., 2002. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology* 301, 121–129.

Martinet, O., Delabranche, X., Aghajanian, M., Hasselmann, M., 2009. SIRS, Sepsis, CARS, SDRA : comprendre différents aspects de l'inflammation en réanimation. *Nutr. Clin. Métabolisme* 23, 185–191.

Masouridi-Levrat, S., Pradier, A., Simonetta, F., Kaiser, L., Chalandon, Y., Roosnek, E., 2016. Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 51, 440–442.

Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826.

Medzhitov, R., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 135–145.

Morrica, A., Maggi, F., Vatteroni, M.L., Fornai, C., Pistello, M., Ciccorossi, P., Grassi, E., Gennazzani, A., Bendinelli, M., 2000. TT virus: evidence for transplacental transmission. *J. Infect. Dis.* 181, 803–804.

Moustafa, A., Xie, C., Kirkness, E., Biggs, W., Wong, E., Turpaz, Y., Bloom, K., Delwart, E., Nelson, K.E., Venter, J.C., Telenti, A., 2017. The blood DNA virome in 8,000 humans. *PLoS Pathog.* 13, e1006292.

Mushahwar, I.K., Erker, J.C., Muerhoff, A.S., Leary, T.P., Simons, J.N., Birkenmeyer, L.G., Chalmers, M.L., Pilot-Matias, T.J., Dexai, S.M., 1999. Molecular and biophysical

characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3177–3182.

Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 92–97.

Okamoto, H., 2009. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses, in: *TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogens, Current Topics in Microbiology and Immunology.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–20.

Okamoto, H., Akahane, Y., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1998a. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J. Med. Virol.* 56, 128–132.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1998b. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology* 10, 1–16.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Kishimoto, J., Sai, T., Sugai, Y., 2000. TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 700–707.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1999. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 259, 428–436.

Peng, Y.H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Ishikawa, T., Yoshikawa, A., Okamoto, H., 2002. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch. Virol.* 147, 21–41.

Qiu, J., Kakkola, L., Cheng, F., Ye, C., Söderlund-Venermo, M., Hedman, K., Pintel, D.J., 2005. Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins following transfection of a full-length clone. *J. Virol.* 79, 6505–6510.

Rascovan, N., Duraisamy, R., Desnues, C., 2016. Metagenomics and the Human Virome in Asymptomatic Individuals. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 125–141.

Reizine, F., Asehnoune, K., Roquilly, A., Laviolle, B., Rousseau, C., Arnouat, M., Dahyot-Fizelier, C., Seguin, P., 2019. Effects of antibiotic prophylaxis on ventilator-associated pneumonia in severe traumatic brain injury. A post hoc analysis of two trials. *J. Crit. Care* 50, 221–226.

Réseau REA-Raisin, 2019. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, Résultats 2017 [Internet]. Santé Publique Fr. [Cité 22 avril 2019]. Disponible sur :

<http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2019/Surveillance-des-infections-nosocomiales-en-reanimation-adulte>.

Roquilly, A., Voure'h, M., Asehnoune, K., 2015. L'immunodépression post-traumatique : de la physiopathologie au traitement. *Réanimation* 24, 285–290.

Ruiz, P., Martínez-Picola, M., Santana, M., Muñoz, J., Pérez-Del-Pulgar, S., Koutsoudakis, G., Sastre, L., Colmenero, J., Crespo, G., Navasa, M., 2019. Torque Teno Virus Is Associated With the State of Immune Suppression Early After Liver Transplantation. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 25, 302–310.

Schiemann, M., Puchhammer-Stöckl, E., Eskandary, F., Kohlbeck, P., Rasoul-Rockenschaub, S., Heilos, A., Kozakowski, N., Görzer, I., Kikić, Ž., Herkner, H., Böhmig, G.A., Bond, G., 2017. Torque Teno Virus Load-Inverse Association With Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation* 101, 360–367.

Shibayama, T., Masuda, G., Ajisawa, A., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tsuda, F., Okamoto, H., 2001. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS Lond. Engl.* 15, 563–570.

SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2012. Rolling circle replication [Internet]. *ViralZone*. [Cité 29 mars 2019]. Disponible sur : <https://viralzone.expasy.org/1941>.

Simmonds, P., Davidson, F., Lycett, C., Prescott, L.E., MacDonald, D.M., Ellender, J., Yap, P.L., Ludlam, C.A., Haydon, G.H., Gillon, J., Jarvis, L.M., 1998. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet Lond. Engl.* 352, 191–195.

Slifkin, M., Doron, S., Snyderman, D.R., 2004. Viral prophylaxis in organ transplant patients. *Drugs* 64, 2763–2792.

Solis, M., Velay, A., Gantner, P., Bausson, J., Filiputti, A., Freitag, R., Moulin, B., Caillard, S., Fafi-Kremer, S., 2017. Long-term follow-up of Torquetenovirus viremia after kidney transplantation. *ESCV*.

Spandole, S., Cimponeriu, D., Berca, L.M., Mihăescu, G., 2015. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Arch. Virol.* 160, 893–908.

Strassl, R., Schiemann, M., Doberer, K., Görzer, I., Puchhammer-Stöckl, E., Eskandary, F., Kikić, Ž., Gualdoni, G.A., Vossen, M.G., Rasoul-Rockenschaub, S., Herkner, H., Böhmig, G.A., Bond, G., 2018. Quantification of Torque Teno Virus Viremia as a Prospective Biomarker for Infectious Disease in Kidney Allograft Recipients. *J. Infect. Dis.* 218, 1191–1199.

Takahashi, K., Hoshino, H., Ohta, Y., Yoshida, N., Mishiro, S., 1998. Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatology Res.* 12, 233–239.

Tse, C., Capeau, J., 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 61, 279–293.

Walton, A.H., Muenzer, J.T., Rasche, D., Boomer, J.S., Sato, B., Brownstein, B.H., Pachot, A., Brooks, T.L., Deych, E., Shannon, W.D., Green, J.M., Storch, G.A., Hotchkiss, R.S., 2014. Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PloS One* 9, e98819.

Ward, N.S., Casserly, B., Ayala, A., 2008. The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (CARS) in Critically ill patients. *Clin. Chest Med.* 29, 617–viii.

Young, J.C., Chehoud, C., Bittinger, K., Bailey, A., Diamond, J.M., Cantu, E., Haas, A.R., Abbas, A., Frye, L., Christie, J.D., Bushman, F.D., Collman, R.G., 2015. Viral Metagenomics Reveal Blooms of Anelloviruses in the Respiratory Tract of Lung Transplant Recipients: Lung Transplant Allograft Virome. *Am. J. Transplant.* 15, 200–209.

Zheng, H., Ye, Linbai, Fang, X., Li, B., Wang, Y., Xiang, X., Kong, L., Wang, W., Zeng, Y., Ye, Li, Wu, Z., She, Y., Zhou, X., 2007. Torque teno virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF-kappaB pathways via interaction with IkappaB kinases. *J. Virol.* 81, 11917–11924.

Liste des annexes

Annexe 1 : Poster présenté aux Journées Nationales d'Infectiologie à Nantes du 13 au 15 juin 2018

PADS2-09



Dynamique de réplication des Torquetenovirus dans une cohorte de patients cérébro-lésés

A. Irimia (1), A. Roquilly (2,4), M. Coste-Burel (1), BM Imbert-Marcille (1,3), C. Bressollette-Bodin (1,3)

(1) Service de Virologie, CHU Nantes (2) Service de Réanimation chirurgicale, CHU Nantes (3) Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (CRTI UMR1064); ITUN, INSERM, Université de Nantes (4) UPRES EA 3826 Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections, Université de Nantes

Introduction

Les Torquetenovirus (TTV) sont des anellovirus qui constituent une part importante du virome humain ; ils sont le reflet de l'état immunitaire et des pics de virémie sont notamment observés dans la population des patients transplantés. Chez les patients cérébro-lésés, il existe un état d'immunodépression post-traumatique précoce qui pourrait favoriser des infections opportunistes.

Objectifs

L'objectif de cette étude est de mesurer la réplication des TTV dans une cohorte de patients cérébro-lésés et de corréler cette réplication à l'évolution du patient et à la survenue de complications infectieuses.

Méthodes

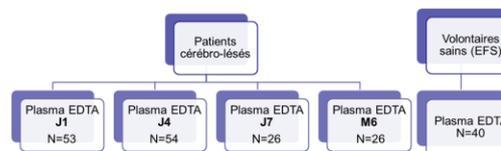
➤ Etude ancillaire sur cohorte de patients cérébro-lésés hospitalisés en réanimation :

- sélection de 54 patients : âge médian 51 ans (IQR 34-67)
- 40 volontaires sains

➤ Informations recueillies :

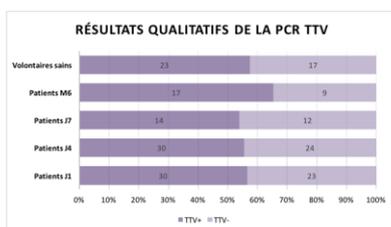
- Statut sérologique HSV (sHSV) chez les patients et les volontaires sains: Trousse IgG Liaison® XL (DiaSorin)
- Diagnostic de réactivation herpétique chez patients (pHSV): Recherche par PCR HSV1/HSV2 temps réel "maison" sur aspirations trachéales et sang à J1, J7, J14 de l'inclusion

➤ Détection et quantification de l'ADN des TTV sur plasma EDTA par PCR en temps réel:

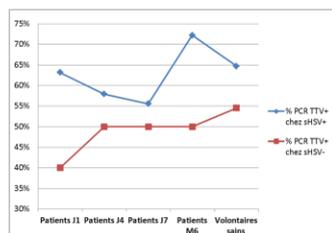


Etape	Automate	Kit	Volume	Nature	Protocole	Volume d'éluat
Extraction de l'ADN	MagNA Pure Compact (Roche)	MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	200µL échantillon + 10µL contrôle interne	Plasma EDTA	/	50µL
Amplification de l'ADN	RotorGene Q (Qiagen)	TTV R-gene® (Biomérieux)	15µL mix + 10µL extrait ADN	/	15min à 95° C [10sec à 95° C - 40sec à 60° C] 45 cycles	/

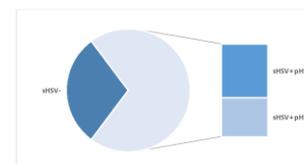
Résultats



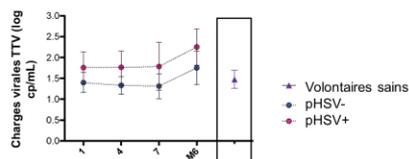
Pourcentage de détection des patients positifs en PCR TTV similaire à tous les points de suivis



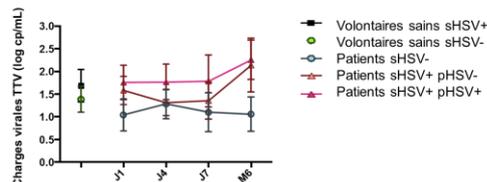
La réplication des TTV est plus fréquente chez les sHSV+ dans les 2 populations et à tous les temps du suivi



Réactivation de l'HSV1 (pHSV+) chez 16/38 (42%) des patients sHSV+



Les charges virales TTV moyennes chez les patients sont plus importantes chez les pHSV+ à tous les points de suivi



Réplication des TTV plus intense chez les patients sHSV+/pHSV+

Conclusions

Dans cette analyse préliminaire, une réplication des TTV est fréquemment détectée dans la première semaine suivant l'admission en réanimation pour traumatisme crânien. Cette réplication est plus fréquente chez les patients séropositifs pour l'HSV et plus intense pour ceux qui réactivent leur HSV1. Ceci suggère que la quantification précoce du TTV pourrait être un marqueur prédictif d'infections opportunistes. Cette analyse va maintenant être étendue à un nombre plus important de patients et sera corrélée à d'autres marqueurs immunologiques et à l'évolution clinique.

Alix Irimia – Laboratoire de Virologie, CHU de Nantes, 9 quai Moncoussu 44093 Nantes, alix.irimia@chu-nantes.fr

Résumé

Les torque teno virus sont des petits virus de la famille des *Anelloviridae* et font partie du virome circulant. Ils possèdent une diversité génétique très importante, sont largement répandus dans la population mondiale et leur caractère pathogène n'est toujours pas clairement prouvé. La réplication des TTV est étroitement liée au statut immunitaire de l'hôte, ce qui fait d'eux des biomarqueurs prometteurs de la fonction immunitaire des patients immunodéprimés. Ainsi, plus les charges virales TTV seraient élevées, plus le risque infectieux serait grand. Les patients présentant une lésion cérébrale aiguë en réanimation sont sujets à une immunodépression post-traumatique entraînant une augmentation des complications infectieuses, notamment des réactivations virales de l'HSV et/ou du CMV, associées à un mauvais devenir. L'objectif de ce travail était donc d'étudier la cinétique de réplication des TTV chez les patients cérébro-lésés en réanimation à l'aide de la trousse TTV R-gene® et d'essayer de la corréler au devenir des patients. Malgré une fréquence de réplication de 57%, plus faible que dans la population générale, la réplication des TTV était plus fréquente et plus importante chez les patients ayant réactivé le virus HSV. Au vu de notre faible échantillonnage de patients, nous n'avons pas observé de lien entre les charges virales des TTV et l'évolution des patients. Cette étude préliminaire nécessite maintenant d'être étendue à un nombre plus important de patients et d'être élargie à tout le virome chez ces patients cérébro-lésés.

Mots-clés : torque teno virus – TTV – virome – biomarqueur – immunodépression – réanimation – réactivations virales – PCR

SERMENT DE GALIEN

~~~~~

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

**D'honorer** ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'exercer**, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De ne jamais oublier** ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

**En aucun cas**, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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

## Résumé

Les torque teno virus sont des petits virus de la famille des *Anelloviridae* et font partie du virome circulant. Ils possèdent une diversité génétique très importante, sont largement répandus dans la population mondiale et leur caractère pathogène n'est toujours pas clairement prouvé. La réplication des TTV est étroitement liée au statut immunitaire de l'hôte, ce qui fait d'eux des biomarqueurs prometteurs de la fonction immunitaire des patients immunodéprimés. Ainsi, plus les charges virales TTV seraient élevées, plus le risque infectieux serait grand. Les patients présentant une lésion cérébrale aiguë en réanimation sont sujets à une immunodépression post-traumatique entraînant une augmentation des complications infectieuses, notamment des réactivations virales de l'HSV et/ou du CMV, associées à un mauvais devenir. L'objectif de ce travail était donc d'étudier la cinétique de réplication des TTV chez les patients cérébro-lésés en réanimation à l'aide de la trousse TTV R-gene® et d'essayer de la corréler au devenir des patients. Malgré une fréquence de réplication de 57%, plus faible que dans la population générale, la réplication des TTV était plus fréquente et plus importante chez les patients ayant réactivé le virus HSV. Au vu de notre faible échantillonnage de patients, nous n'avons pas observé de lien entre les charges virales des TTV et l'évolution des patients. Cette étude préliminaire nécessite maintenant d'être étendue à un nombre plus important de patients et d'être élargie à tout le virome chez ces patients cérébro-lésés.

---

**Mots-clés** : torque teno virus – TTV – virome – biomarqueur – immunodépression – réanimation – réactivations virales – PCR