

Intérêt de la PCR quantitative EBV dans le suivi des greffés de moelle osseuse en pédiatrie.



Geneviève Billaud (1), Alix Force (1), Abed Babik (2), Vanessa Escuret (1), Nicolas Lévêque (1), Valérie Mialou (2), Bruno Lina (1), Yves Bertrand (2).
(1) Laboratoire de Virologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Lyon, (2) Service d' Hématologie Pédiatrique, Hôpital Debrousse, Lyon

Introduction

L'EBV appartient à la famille des *Herpesviridae*. Plus de 95% de la population adulte en France a une sérologie EBV positive. La primo-infection est le plus souvent asymptomatique, ou elle peut parfois prendre la forme d'une mononucléose infectieuse. Au décours de la primo-infection le virus reste latent dans les lymphocytes B. Cette latence est normalement contrôlée par le système immunitaire.

Au cours de réactivations, l'infection virale devient productive. Cette réactivation chez une personne immunocompétente n'aura en principe pas de manifestation clinique. Chez les patients immunodéprimés et en particulier chez les **patients greffés**, le système immunitaire ne parvient parfois pas à contenir une réactivation virale avec pour conséquence l'apparition d'une Charge Virale (CV) positive plus ou moins élevée. Cette persistance peut à son tour être responsable du développement d'un **Syndrome Lymphoprolifératif Post Transplantation (SLPT)**. Les enfants greffés de moelle osseuse présentent un risque non négligeable de développer un SLPT, c'est pourquoi la CV EBV est un marqueur important.

Matériel et méthodes

Patients

Nous avons suivi la CV EBV de 5 patients hospitalisés dans le service d'Hématologie Pédiatrique de l'Hôpital Debrousse entre mars et septembre 2007.

Tous les patients avaient bénéficié d'une greffe de moelle osseuse allogénique dans les 6 mois précédents (Tableau 1).

La CV EBV faisait partie du bilan virologique systématique de leur suivi hebdomadaire. L'augmentation de la CV EBV + ou - associée à des signes cliniques (Tableau 2), ont entraîné la mise en place d'un traitement. Ces 5 patients ont bénéficié de plusieurs cures de Rituximab et nous avons pu suivre l'évolution de la CV EBV après le traitement.

Tableau 1: Liste des patients allogreffés de moelle

Patients	Age	Maladie initiale	Date de greffe
1-AS	13 ans	Leucémie Aiguë	26/04/07
2-BT	2 ans	Leucémie Myéломocyttaire Juvenile	31/05/07
3-QL	7 mois	Lymphohistiocytose Familiale	07/03/07
4-TA	14 ans	Anémie de Fanconi	04/05/07
5-BY	4 ans	Déficit en Alfa.aspartylglutaminase	14/03/07

Tableau 2: Traitement immunosuppresseur et signes cliniques au moment de l'augmentation de la CV EBV

Patients	Traitement immunosuppresseur	Signes cliniques
1-AS	SAL en cours de conditionnement, Corticothérapie, Ciclosporine	Fièvre, Tableau d'encéphalite
2-BT	SAL en cours de conditionnement, Corticothérapie, Ciclosporine	Fièvre, AEG, douleurs abdominales
3-QL	SAL en cours de conditionnement, Corticothérapie, Ciclosporine	Choc, troubles de conscience, troubles digestifs
4-TA	SAL en cours de conditionnement, Ciclosporine	Pas de signes
5-BY	SAL en cours de conditionnement, Corticothérapie, Ciclosporine	Fièvre modérée

Prélèvements

Des prélèvements de sang sur EDTA ont été envoyés au laboratoire de Virologie.

Charge Virale EBV

Extraction:

L'ADN des échantillons a été extrait avec la trousse commerciale « **High Pure Viral Nucleic Acid Kit de ROCHE®** » selon les recommandations du fournisseur. Au total, 200 µl de prélèvement de sang total ont été extraits.

PCR Temps réel

Les ADN extraits ont été amplifiés par une technique de PCR en temps réel avec la trousse commerciale « **Argene EBV R-gene kit** » selon les recommandations du fournisseur. L'amplification est réalisée au moyen de la technique des sondes TaqMan® (fluorophores FAM et TAMRA). Les 4 standards QS1 à QS4 permettent d'obtenir une gamme d'étalonnage de 5.10³ à 5.10⁶ copies /ml de sang total. La trousse contient un contrôle de sensibilité (500 copies/ml) et les prémix d'amplification.

Les manipulations ont été réalisées sur automate « 7500 Applied Biosystem® » .

Discussion

Les patients **greffés de moelle osseuse** sont très exposés aux infections virales, primo-infection (surtout chez les enfants) et réactivations. Les cliniciens doivent reconnaître et traiter l'infection virale le plus précocement possible car **le pronostic du patient va dépendre de la gestion de l'infection**.

Pour traiter les infections à EBV, il n'existe **pas d'antiviral**. Le traitement repose sur l'utilisation du **Rituximab** qui est un **anticorps monoclonal anti-CD20** chimérique qui va détruire les lymphocytes B, siège de la répllication de l'EBV.

Dans le cas des infections à EBV outre le problème infectieux se pose le risque pour les patients de développer un Syndrome Lymphoprolifératif Post Transplantation (le plus souvent lymphocytes B dépendant). La survenue de ce syndrome est favorisée par l'immunodépression sévère nécessaire pour éviter les problèmes de réaction de greffon contre l'hôte (GVH). Les cliniciens doivent trouver le bon équilibre en modulant les traitements immunosuppresseurs en particulier dans les semaines qui suivent la greffe.

La CV EBV est un outil biologique particulièrement utile dans le suivi des greffés de moelle osseuse en pédiatrie. Elle peut être réalisée soit de façon systématique dans les semaines qui suivent la greffe soit devant l'apparition de signes cliniques anormaux. **Une CV élevée permettra de mettre en place un traitement adapté par Rituximab et / ou une modulation de l'immunodépression.**

Dans notre étude le dépistage précoce de la positivité ou de l'augmentation de la CV EBV a conduit les cliniciens à traiter les patients par du Rituximab. Ce traitement a permis une baisse voire une négativation rapide de la CV et une évolution favorable de cet épisode infectieux chez tous les patients.

Résultats

Pour 4 des 5 patients, l'élévation de la CV correspondait à l'apparition de signes cliniques.

Nous avons retrouvé une CV élevée (1,2.10⁵ à 3,8.10⁵) chez 3 des 5 patients suivis (3-QL, 4-TA et 5B-Y). La CV du patient 2-BT est restée en dessous de 2,3.10³ copies/ml, et la CV du patient 1-AS s'est positivée tout en restant en dessous du seuil de quantification de 500 copies/ml.

Le traitement par Rituximab s'est avéré efficace puisque dans les 5 cas il a permis de diminuer la CV de façon significative dans des délais rapides (Figures 1-AS, 2BT, 3-QL, 4-TA, 5-BY).

