

MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu publiquement le 27 mai 2014

Par M. Edouard DUMETZ

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

COMPARAISON DE LA PCR EN TEMPS REEL
ET DE LA TECHNOLOGIE LAMP
POUR LA DETECTION DU GENOME DU VARICELLA ZOSTER VIRUS

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur L. DUBREUIL
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Assesseurs : Madame le Professeur K. FAURE
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Madame le Docteur A. GOFFARD
Maître de Conférences Universitaires – Praticien Hospitalier
Madame le Docteur A. DEWILDE
Maître de Conférences Universitaires – Praticien Hospitalier

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.



**Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille**

2

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents : Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Patrick PELAYO
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Monique CAPRON
Professeur Salem KACET
Madame Stéphanie DAMAREY
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Monsieur Edouard DANJOU

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur : Professeur Damien CUNY
Assesseurs : Mme Nadine ROGER
Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs : Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique

Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique

M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mlle	LEONHARD	Julie	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MOUTON	Nicolas	Physique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Melle	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences Associés - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

A mon Président de Jury de Thèse,

Monsieur le Professeur Luc DUBREUIL

Professeur de Microbiologie à l'Université de Lille II,
Doyen de la Faculté de Pharmacie de Lille,
Praticien Hospitalier, Service des Maladies infectieuses et du voyageur,
Hôpital Dron, Tourcoing,
Profesor Illustre Visitante de l'université Inca Garcilaso de la Vega, Lima, Pérou,
Profesor Honorario de la Universidad Católica Santa Maria, Arequipa, Pérou,
Secrétaire du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie,
Expert à l'AFSSAPS et Membre de la commission d'autorisation de mise sur le marché des médicaments anti-infectieux,
Chevalier des Palmes académiques.

*Pour me faire l'Honneur de présider ce jury,
en souvenir des Cérémonies des Vœux
auxquelles vous m'avez accordé le plaisir de participer à ma façon,
pour m'avoir toujours encouragé à continuer à allier les études et la musique,
veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde gratitude
et de mes respects les plus dévoués.*

A ma Directrice de Thèse,
Madame le Docteur Anne GOFFARD

Maître de conférences Universitaires,
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille,
Praticien Hospitalier, laboratoire de Virologie du CHRU de Lille,
Unité Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Molecular & Cellular Virology of Hepatitis C.

*Pour votre disponibilité, vos conseils
et votre aide précieuse tout au long de ce travail,
veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance
et de mes remerciements les plus sincères.*

A mes Juges,
Madame le Professeur Karine FAURE

Professeur des Universités en Maladies Infectieuses et Tropicales
Faculté de Médecine Henri Warembourg, Université de Lille 2
Praticien Hospitalier, Service de Gestion du Risque Infectieux et des Vigilances,
Unité de Maladies Infectieuses, Hôpital Claude Huriez, CHRU de Lille.

*Pour avoir accepté de juger ce travail en siégeant dans ce jury,
pour votre accueil, votre gentillesse
et l'éclairage clinique que vous avez apporté à cette thèse,
je vous remercie sincèrement et vous assure de ma plus haute considération.*

Madame le Docteur Anny DEWILDE

Maître de conférences Universitaires en Virologie,
Faculté de Médecine Henri Warembourg, Université de Lille 2
Praticien Hospitalier, Laboratoire de Virologie, CHRU de Lille.

*Pour votre accueil au laboratoire de Virologie,
votre formation au cours du semestre et votre encadrement de ce travail,
soyez assurée de ma reconnaissance et de mon estime.*

A mes parents et grands-parents,
A François et Camille,
A Marc,
A Laura,
A mes neveux et nièces, en particulier Eugénie et Agathe pour leurs photos de varicelle,
A toute ma famille,
A Pierre-Emmanuel,
A mes très chers amis de fac et d'avant...

*Pour votre patience, vos conseils et votre soutien,
tant au fil de mes études qu'au cours de l'élaboration de ma thèse,
je vous dédie ce travail,
signe de mon affection.*

A l'équipe du laboratoire de Virologie du CBP, pour m'avoir formé à manipuler en bio mol,
A Stéphanie, pour tes conseils techniques et pour m'avoir aidé à « Grubser » par la suite,
A Eric Charbonnier pour son aide dans l'étude de métrologie,
Aux équipes des laboratoires des centres hospitaliers d'Amiens, de Tourcoing, d'Armentières
et de Lens,
Aux enseignants et personnels de la Faculté de Pharmacie de Lille avec qui j'ai eu la chance
d'avoir un relationnel privilégié au cours de mes études et qui se reconnaîtront,

*Pour votre contribution à ma formation et les bons souvenirs partagés ensemble,
soyez assurés de mon amitié et de mes remerciements sincères.*

Au laboratoire DiaSorin, et à Madame M. Perrotte,

Pour votre participation matérielle à ce travail.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	11
INTRODUCTION.....	15
I. Généralités	16
A. Herpesviridae	16
B. Structure du virus et réplication.....	18
C. Epidémiologie.....	19
1. Varicelle	19
2. Zona	21
II. Physiopathologie	22
A. Primo-infection par le VZV : la varicelle	22
B. Latence virale.....	24
C. Réactivation : le Zona.....	25
III. Manifestations cliniques de l'infection par le VZV	25
A. Primo-infection par le VZV	25
1. Varicelle typique bénigne	25
2. Complications de la primo-infection par le VZV	26
B. Manifestations cliniques observées au cours des réactivations	32
1. Le Zona	32
2. Complications du zona.....	33
IV. Traitement des infections par le VZV	36
A. Traitements disponibles	36
1. Analogues nucléosidiques.....	36
2. Immunothérapie	37
B. Prise en charge des infections par le VZV.....	38
1. Primo-infection : Varicelle	38
2. Latence virale.....	38
3. Réactivation : Zona	39
V. Vaccination.....	41
VI. Méthodes diagnostiques du VZV	44
A. Types de prélèvements	44
B. Méthodes de diagnostic indirect	44

C.	Méthodes de diagnostic direct	45
1.	Culture cellulaire.....	45
2.	Immunofluorescence indirecte.....	46
3.	Recherche du génome viral.....	47
	OBJECTIFS DU TRAVAIL	65
	MATERIELS ET METHODES.....	66
I.	Souches virales, échantillons biologiques et contrôles.....	67
A.	LCR.....	67
B.	Vésicules et prélèvements cutanés.....	67
C.	Souches virales	67
D.	Culture cellulaire du VZV	68
E.	Contrôles de qualité	69
1.	Contrôle calibré Acrometrix®	69
2.	QCMD.....	69
II.	Extraction des acides nucléiques	69
III.	Dosage des acides nucléiques totaux.....	72
IV.	Métrologie du bloc chauffant	72
V.	Méthodes d'amplification.....	72
A.	VZV R-gene TM (Argène)	72
1.	Caractéristiques du kit.....	72
2.	Interprétation des courbes de fluorescence	74
B.	PCR maison	76
C.	<i>LIAISON® Iam VZV</i> (DiaSorin).....	77
1.	Traitement des échantillons avec le kit Iam VZV (Annexe 6)	77
2.	Détection de la fluorescence et interprétation des courbes	79
VI.	Analyse statistique des données	82
A.	Dosage des acides nucléiques totaux	82
1.	Test des variances	82
2.	Test des moyennes	82
B.	Etude de corrélation	83
1.	Etude des points aberrants	83
2.	Régression linéaire.....	84
3.	Calcul du coefficient de corrélation linéaire de Pearson ρ	85
4.	Test du coefficient de corrélation	85

RESULTATS	86
I. Dosage des acides nucléiques totaux.....	87
II. Métrologie du bloc chauffant	88
III. Limites de détection et de quantification.....	88
IV. Tests de contamination	89
A. Extraction.....	89
B. Amplification.....	89
V. Comparaison des résultats	91
A. Prélèvements cutanés.....	91
B. LCR.....	91
1. Prélèvements détectés positifs par la PCR maison	91
2. Prélèvements testés négatifs par la PCR maison	91
VI. Résultats des QCMD 2013	92
VII. Corrélation des résultats positifs	92
DISCUSSION	95
I. Dosage des acides nucléiques totaux.....	96
II. Métrologie du bloc chauffant	97
III. Limites de détection et de quantification.....	97
IV. Tests de contamination	98
A. Extraction.....	98
B. Amplification.....	99
V. Praticabilité.....	100
A. Extraction.....	100
B. Utilisation et stabilité des extraits non-dénaturés	100
C. Préparation et conservation du milieu réactionnel.....	101
D. Contrôles internes et inhibiteurs	101
E. Temps nécessaire	102
F. Nombre d'échantillons testés.....	102
G. Interprétation des résultats	103
VI. Echantillons d'origine humaine.....	103
A. Résultats obtenus avec le kit VZV R-Gene TM (Argène).....	103
B. Résultats obtenus avec le kit Iam VZV (DiaSorin)	104
VII. Résultats des QCMD 2013	105
VIII. Corrélation des résultats positifs	105

IX.	Etude bibliographique	107
A.	Limites de détection.....	108
B.	Test de contamination.....	108
C.	Concordance des résultats.....	108
D.	Corrélation entre les prélèvements positifs.....	109
E.	Aspects pratiques	109
	CONCLUSION	110
	ANNEXES	111
	BIBLIOGRAPHIE	117

INTRODUCTION

I. Généralités

A. Herpesviridae

Le virus Varicella Zoster (VZV ou Herpesvirus 3) appartient à la famille des *Herpesviridae*. Cette famille comprend trois sous-familles, les α , β et γ -herpesvirinae : le VZV appartient à la sous-famille des α -herpesvirinae, genre varicellovirus ; cette sous-famille comporte également les Herpes simplex Virus (HSV-1 et 2). A l'inverse des virus Herpes Simplex, le VZV est un virus exclusivement humain. La famille des *Herpesviridae* comporte 120 virus dont 8 sont pathogènes pour l'homme, pouvant induire des pathologies très diverses allant de la simple éruption cutanée jusqu'à l'encéphalite [1].

Les *Herpesviridae* sont capables de latence : suite à une primo-infection pendant laquelle ces virus se répliquent activement, ils sont capables d'infester des cellules de l'hôte et d'y rester en dormance. Ce phénomène permet de pallier leur fragilité dans le milieu extérieur. Sous l'influence de divers facteurs, la réplication virale peut reprendre : ces récurrences peuvent s'accompagner de signes cliniques ou être asymptomatiques mais, le virus étant quand même répliatif, il est excrété, permettant la contamination de nouveaux hôtes. Les herpesvirus dermoneurotropes comme l'Herpes Simplex Virus et le Virus de la Varicelle et du Zona, établissent leur latence dans les ganglions nerveux, et les virus leucotropes, comme l'Epstein Barr Virus, dans les cellules du système immunitaire [1]. Les caractéristiques des huit Herpesvirus humains (HHV pour Human Herpes Virus) sont résumées dans le tableau 1 [2].

Classification		Nom	Site de latence	Physiopathologie	Mode de contamination
Alpha-herpesvirinae	HHV-1	Herpes simplex virus (HSV-1)	Ganglions nerveux sensitifs Virus dermoneurotropes	Herpes oral (HSV-1 prédominant) et génital (HSV-2 prédominant), herpès néonatal, encéphalite à Herpes simplex, infections oculaires, dermatite & panaris herpétique	Contact direct, salive / lésions
	HHV-2	Herpes simplex virus (HSV-2)			Contact direct, salive / lésions
	HHV-3	Varicella-Zoster virus (VZV)		Varicelle, zona, encéphalite varicelleuse, syndrome de varicelle congénitale	Contact direct lésions, aérosols, transmission verticale
Gamma-herpesvirinae	HHV-4	Epstein-Barr virus (EBV)	Lymphocytes B Virus leucotrope	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, lymphome du système nerveux central associé au VIH, syndrome lymphoprolifératif post-transplantation, carcinome nasopharyngé, maladie de Hodgkin	Transfusion, contact direct, salive
	HHV-8	Kaposi's sarcoma associated herpes virus	Lymphocytes Virus leucotrope	Sarcome de Kaposi	Contact direct, salive, aérosol, allaitement
Bêta-herpesvirinae	HHV-5	Human cytomegalovirus	Macrophages, lymphocytes, cellules épithéliales Virus leucotrope	Syndrome mononucléosique, infection congénitale, colite, rétinite, hépatite, encéphalite et pneumonie à CMV chez les patients immunodéprimés	Contact direct, salive / urine, allaitement, transmission verticale, transfusion
	HHV-6A et 6B	Roseola virus	Lymphocytes T-CD4+, monocytes, macrophages Virus leucotrope	Roséole infantile ou exanthème subit, fièvre, encéphalite, hépatite et pneumonie chez les patients immunodéprimés	Contact direct, salive, aérosol, allaitement
	HHV-7	Roseola virus	Lymphocytes T-CD4+ Virus leucotrope	Roséole infantile ou exanthème subit	Contact direct, salive, aérosol, allaitement

Tableau 1: Principales données concernant les Herpesvirus humains [2]

B. Structure du virus et réplication

Le VZV est un virus enveloppé d'environ 200 nm présentant une capsidie icosaédrique composée de 162 capsomères. La nucléocapsidie est séparée de l'enveloppe virale par un tégument, structure amorphe et fibreuse comportant des protéines virales exprimées au cours du cycle de réplication du VZV. L'enveloppe est composée quant à elle de polyamines, de glycoprotéines et de lipides insérés au sein d'une bicouche lipidique [3, 4].

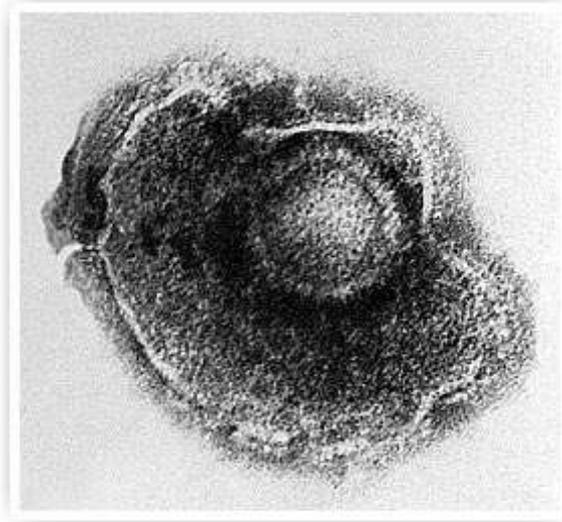


Figure 1: Structure du VZV en microscopie électronique [5]

Lors de la primo-infection par le VZV, le virus pénètre par les voies aériennes et infecte les cellules épithéliales des muqueuses respiratoires. Les protéines exprimées à la surface de la particule virale interagissent avec la membrane externe des cellules hôtes, permettant la pénétration du virion et sa dissémination de cellule en cellule [6]. La liaison glycoprotéines-récepteurs initie un changement conformationnel, permettant une interaction de haute affinité entre les deux membranes amenées à fusionner : la liaison du virus à un protéoglycane de type héparane-sulfate permettrait l'adhésion du virion alors que le récepteur aux groupements Mannose 6-Phosphate présents à la surface de l'enveloppe virale semblerait impliqué dans la pénétration du virus dans la cellule-cible [6, 7]. La dé-tégumentation se produit dans le cytoplasme lors du transport du virion jusqu'au noyau, dans lequel l'ADN pénètre par l'intermédiaire des nucléopores. L'ADN bicaténaire prend alors une forme circulaire [9].

Le génome du VZV est constitué d'un ADN bicaténaire linéaire de 125 kilo paires de bases (kpb) et de GC% égal à 46,02, codant 73 protéines [10]. Il s'agit du plus petit génome des Herpesvirus humains [9]. Ce génome est constitué de deux régions codantes principales:

- la séquence unique longue (U_L), constituée d'environ 105 kpb et encadrée de petits éléments répétitifs inversés interne et terminal (I et TR_L) de 88 paires de bases (pb)
- la séquence unique courte (U_S), mesurant environ 52 kpb et entourée d'éléments de 7,3 kpb (I et TR_S - Fig. 2) [9].



Figure 2: Génome du VZV

Trois types de protéines sont successivement exprimés lors de l'infection des cellules hôtes par le virus. Les protéines « très précoces » sont exprimées 4 à 6h après l'infection : les gènes très précoces sont transcrits par l'ARN polymérase II cellulaire et les transcrits sont ensuite traduits dans le cytoplasme. Il s'agit de protéines régulatrices qui sont ré-adressées vers le noyau pour induire l'expression des gènes « précoces » et atténuer la transcription des gènes « très précoces ». Les protéines « précoces » sont nécessaires à la réplication virale : il s'agit entre autres de l'ADN polymérase virale ou de la thymidine kinase. Les protéines de structure permettant la formation des nouveaux virions sont codées par les gènes d'expression « tardive ». L'ADN viral est intégré dans des nouvelles capsides formées par un mécanisme auto-catalytique. Ces nucléocapsides vont sortir du noyau de la cellule infectée et acquérir une enveloppe « transitoire » au niveau de la membrane nucléaire interne. Suite à un passage dans le réticulum endoplasmique rugueux, puis par le réseau trans-golgien, le virus enveloppé va être transporté par des vésicules d'exocytose jusqu'à la membrane cellulaire d'où il va être libéré par bourgeonnement [7, 9].

C. Epidémiologie

1. Varicelle

La varicelle correspond à la primo-infection par le VZV. C'est une maladie quasi-obligatoire de l'enfance : en France, plus de 90% des enfants de plus de 15 ans présentent des anticorps contre le virus, le pic d'incidence étant entre 5 et 9 ans [11].

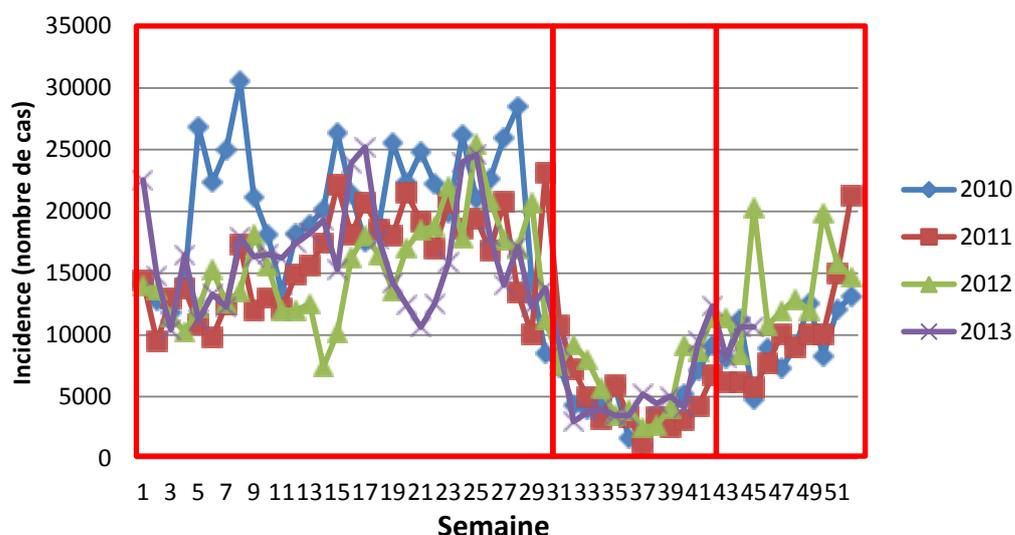
Il s'agit d'un virus présentant peu de variabilité moléculaire : trois géotypes sauvages sont actuellement identifiés. La souche européenne Dumas, la souche vaccinale japonaise Oka et le virus dont elle dérive ont toutes les trois été séquencées [12].

L'épidémiologie de la varicelle diffère selon le climat et la densité de population : dans les régions tempérées, la primo-infection a lieu dans la majorité des cas dans la petite enfance, alors que dans les régions tropicales, elle aurait plutôt tendance à se produire à l'adolescence, voire à l'âge adulte [13].

Au niveau du territoire Français, un réseau de médecins surveille l'épidémiologie de la varicelle et du zona : il s'agit du réseau Sentinelles de l'Inserm. Selon leurs données, on peut distinguer trois phases épidémiques distinctes et reproductibles d'année en année pour la varicelle: son incidence est très importante au cours des périodes scolaires (du printemps au début de l'été), s'atténue pendant les grandes vacances, puis augmente de nouveau au moment de la reprise scolaire en automne [14]. La diminution de la transmission virale au cours de l'été peut être expliquée par divers paramètres :

- L'infection étant transmise par voie respiratoire, le virus circule mieux lorsque les températures sont plus basses,
- S'agissant d'une maladie contagieuse quasi-obligatoire de l'enfance, le contexte scolaire favorise nécessairement sa propagation,
- Un biais peut être rencontré au niveau de la déclaration du nombre de cas au cours de l'été, beaucoup de médecins du réseau prenant leurs congés à cette période.

Incidence de la varicelle au cours de l'année



réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, <http://www.sentiweb.fr>

Figure 3: Incidence de la varicelle au cours de l'année [14]

Présentation des données de 2010 à 2013

2. Zona

Bien que surveillée par le réseau depuis 2004, l'incidence du zona dans la population générale ne présente pas une saisonnalité aussi marquée puisqu'il s'agit d'une récurrence de la maladie. Alors que les autres Herpesvirus peuvent se réactiver à de multiples reprises, la récurrence du VZV est généralement unique dans la vie [15]. L'incidence du zona au cours de la vie est fortement corrélée à l'âge: dans la population générale, elle est de l'ordre de 1,5 à 3 pour 1000 personnes, alors que chez les sujets âgés de plus de 75 ans, elle se situe aux alentours de 10 pour 1000 personnes [16, 17, 18]. En plus de l'âge, d'autres facteurs favorisent les réactivations du VZV, notamment une immunodépression, le diabète ou encore un stress [15].

II. Physiopathologie

A. Primo-infection par le VZV : la varicelle

Les *Herpesviridae* sont des virus enveloppés ; cela implique qu'ils sont peu résistants dans l'environnement, donc transmis par contact proche. Un à deux jours avant l'apparition du *rash* cutané, le sujet infecté est déjà contagieux *via* ses sécrétions respiratoires ; la maladie va se présenter le plus souvent sous la forme caractéristique d'une éruption cutanée généralisée, dont les vésicules seront également vectrices de virions infectieux jusqu'à leur cicatrisation par formation d'une croûte. Globalement, le sujet sera contagieux pendant une dizaine de jours, cette période pouvant se prolonger jusqu'à plusieurs semaines pour les patients immunodéprimés [12].

Lors de la primo-infection par le VZV, le virus pénètre par voie respiratoire au niveau des muqueuses des voies aériennes supérieures et de l'oropharynx. La période d'incubation dure en moyenne 14 jours avant l'apparition de l'éruption cutanée caractéristique [19]. Bien que le virus puisse être transmis par voie aérienne, il a rarement été mis en évidence au niveau des muqueuses du tractus respiratoire. Les glycoprotéines d'enveloppe interagissent avec les récepteurs des cellules épithéliales pour que le virus puisse y pénétrer et disséminer dans l'organisme; ces protéines induisent également une stimulation du système immunitaire de l'hôte, permettant d'initier une réponse immunitaire adaptative [12]. Le virus va rejoindre les ganglions lymphatiques régionaux qui seront le siège d'une réplication virale intense. On observera ensuite une première virémie, permettant au virus de disséminer vers divers organes où il va se multiplier dans les cellules du système réticulo-endothélial, notamment au niveau hépatique. Le tropisme cellulaire au cours de la virémie a été délicat à établir du fait du faible nombre de cellules infectées et de la haute spécificité de l'infection par le VZV pour les cellules humaines, ce qui a rendu son étude *in vitro* difficile [19]. Il semble toutefois que le virus infecte préférentiellement les lymphocytes T, qu'ils soient CD4+ ou CD8+, ainsi que les monocytes et macrophages [15, 20, 21]. Malgré une réponse immune spécifique, le virus dissémine par voie hématogène jusqu'à la peau où il va induire une vascularite en infectant les cellules endothéliales des vaisseaux capillaires. Il va également atteindre la muqueuse oropharyngée, où son portage permettra sa propagation à d'autres hôtes [15]. Au niveau cutané, il va infecter les cellules de l'épiderme, provoquant trois phases : maculo-papuleuse, vésiculeuse et dessèchement. Les transformations initiales donnant lieu à la phase maculo-papuleuse sont liées à la vascularite des capillaires, ainsi qu'à une fusion des cellules

épithéliales débouchant sur la formation de cellules multi-nucléées comprenant souvent des inclusions éosinophiles intranucléaires ainsi que des vacuoles cytoplasmiques. Cela peut être lié au fait que la réplication virale se déroule dans le noyau [19]. La transition vers la phase vésiculeuse est due à une ballonnisation des kératinocytes et à une dégénérescence réticulaire de l'épiderme, ainsi qu'à la formation d'espaces liquidiens intercellulaires. Les cellules infectées par le virus vont enfler et se rompre, contribuant à la formation de vésicules contenant de la fibrine, des débris cellulaires, ainsi que du virus libre en grande quantité, responsable de leur infectiosité [22]. La vésicule est ensuite envahie par des polynucléaires et d'autres leucocytes, induisant une résorption du liquide et la formation d'une croûte. Les lésions causées par la varicelle ne provoquent généralement pas de cicatrice car les cellules infectées sont relativement superficielles [19].

On observera ainsi l'éruption maculo-papuleuse caractéristique de la varicelle alors que le portage au niveau ORL permettra la propagation du virus.



Figure 4: Eruption varicelleuse typique - éléments d'âge différents: macules, vésicules et croûtes

© All Rights Reserved - [23]

L'infection virale va être contrôlée par le système immunitaire : la guérison de la varicelle est associée à une réponse cellulaire T spécifique, constituée de lymphocytes T CD4, CD8 et mémoires. Les lymphocytes T CD4 activés s'orientent principalement vers une réponse de type Th1 avec production de taux élevés d'IFN γ .

Les lymphocytes Natural Killer (NK) sont également stimulés par la production d'IFN γ et d'IL-2 et concourent à détruire les cellules infectées en coopération avec les CTL activées par la présentation de l'antigène par le CMH de classe I [18].

On observe également une réponse humorale avec l'apparition d'IgM puis d'IgG : la séroconversion a lieu entre 1 et 3 jours après l'exanthème. Les anticorps neutralisants bloquent les phénomènes d'adsorption, de fusion et de pénétration du virus dans la cellule hôte ; ils interviennent également dans la destruction des cellules infectées par le VZV, notamment par le phénomène de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) [18].

B. Latence virale

Le VZV atteint les ganglions sensitifs au niveau des nerfs crâniens et rachidiens par voie neurogène et/ou par voie hématogène par le biais des cellules mononuclées infectées par le virus. Il va établir sa latence au niveau des ganglions trijumeaux, géniculés ou thoraciques. A partir des lésions cutanéomuqueuses, le virus peut atteindre son site de latence par voie ascendante le long de l'axone innervant le territoire atteint. Au cours de la latence, le génome viral se trouve sous forme épisomale [18]. A l'inverse de l'infection initiale, l'ADN du virus latent ne se réplique pas, moins d'une douzaine de gènes sont exprimés et il n'y a pas production de nouveaux virions [24]. L'expression d'un nombre limité de gènes permet au virus de masquer sa présence au système immunitaire de l'hôte [25]. Les cellules infectées par le virus durant cette phase sont aussi bien des cellules neuronales que satellites. Les neurones n'expriment pas ou faiblement le CMH de classe I, les Herpesvirus ont évolué pour établir leur latence dans ces « sites privilégiés » moins sensibles au système immunitaire de l'hôte [26]. Les antiviraux seront inactifs durant cette phase car la réplication virale est très faible.

Les mécanismes maintenant la latence du VZV sont peu connus du fait de la haute spécificité d'espèce du virus pour son hôte : étant difficilement cultivable, l'étude de sa biologie reste délicate. L'immunité cellulaire semble cependant être essentielle [15]. En effet, bien que des anticorps soient détectés suite à la primo-infection, le VZV peut se réactiver et induire un zona. A l'inverse, les patients agammaglobulinémiques, ne développant pas de réaction humorale contre ce virus, sont protégés contre les réactivations par leur importante réponse

cellulaire [17]. Enfin, il semblerait que des réactivations subcliniques puissent se produire au cours de la vie : dans une population de sujets sains âgés de plus de soixante ans, l'ADN du VZV a été détecté par PCR dans des cellules mononucléées sanguines dans 21% des cas, cette virémie étant transitoire et asymptomatique [27].

C. Réactivation : le Zona

Dans un contexte d'affaiblissement du patient (immuno-sénescence liée à l'âge, immunodépression ou diminution de l'immunité cellulaire), on pourra observer une réactivation du virus sous la forme d'un zona : par le biais du nerf sensitif, le virus latent dans un ganglion rejoint l'épiderme. A l'inverse de la varicelle, pour laquelle l'éruption est généralisée, le zona se manifeste par une éruption dans une zone bien délimitée. Lorsque le virus se réactive, celui-ci va disséminer de cellule en cellule au niveau du ganglion, provoquant une réaction inflammatoire intense associée à une destruction neuronale et microgliale, puis migrer *via* l'axone jusqu'à la peau. Cela provoquera une éruption cutanée localisée au dermatome innervé. La multiplication virale va s'accompagner d'une inflammation aiguë et de la démyélinisation du nerf touché, ainsi que d'une dégénérescence morphologique des cellules neuronales. Il est à noter que le zona n'est pas contagieux, sauf pour un sujet réceptif par l'intermédiaire des vésicules [19].

III. Manifestations cliniques de l'infection par le VZV

A. Primo-infection par le VZV

1. Varicelle typique bénigne

Contrairement aux autres Herpesvirus, la primo-infection par le VZV s'exprime presque toujours cliniquement. Elle se manifeste après une incubation de 14 jours par une éruption vésiculeuse de topographie généralisée, associée à une fièvre modérée. Vingt-quatre à 48 heures avant l'éruption survient une phase prodromique associant fièvre, maux de tête et douleurs abdominales parfois associées à des vomissements. L'éruption débute au niveau du cuir chevelu et de la nuque, avant d'atteindre le tronc, les muqueuses puis de diffuser au visage. Les régions palmo-plantaires sont respectées. Les lésions touchant l'oropharynx, le vagin ou parfois la conjonctive sont généralement ulcératives et douloureuses [19]. L'éruption se présente sous la forme de macules rosées rapidement surmontées d'une vésicule en « goutte de rosée ». Au bout de 24h, le liquide se trouble, la vésicule s'ombilique puis se

dessèche en formant une croûte. Celle-ci cicatrisera lors de la régénération des cellules épithéliales situées à la base de la vésicule. La croûte tombera en une semaine, laissant une tache hypo-pigmentée transitoire. Plusieurs poussées éruptives se succédant, des éléments d'âge différent coexistent au cours de la varicelle. Cette forme évolue favorablement sans complication dans la majorité des cas [11]. Le nombre de lésions varie entre 10 et 1500 chez les enfants sains ; le *rash* sera plus important chez les enfants d'âge plus avancé. En cas de traumatisme cutané préexistant (coup de soleil, eczéma), les lésions semblent plus nombreuses, mais la fréquence des formes graves ne semble pas plus importante [19, 28].

2. *Complications de la primo-infection par le VZV*

a. Surinfections cutanées

Les lésions cutanées de la varicelle étant très prurigineuses, celles-ci sont régulièrement surinfectées à cause du grattage. Les germes les plus fréquemment incriminés sont le Staphylocoque doré et les Streptocoques bêta-hémolytiques (notamment *Streptococcus pyogenes*, du groupe A de la classification de Lancefield). Ces surinfections se présentent sous la forme d'une lymphadénite régionale, localisée aux pourtours des lésions concernées, se compliquant généralement d'abcès sous-cutanés [19]. Les complications majeures de ces surinfections sont liées aux toxines pouvant être secrétées par ces pyogènes, telles que les exfoliatines de *Staphylococcus aureus* (épidermiolyse staphylococcique) ou les toxines érythrogènes de *Streptococcus pyogenes* (dermo-hypodermite, voire fasciite nécrosante). Enfin, ces lésions peuvent être un point d'entrée pour une dissémination des germes, induisant une infection des tissus profonds (bactériémie, arthrite septique...) [11].

En cas de surinfections cutanées, une antibiothérapie anti-staphylococcique et anti-streptococcique doit être prescrite par voie orale [3].

b. Pneumopathie varicelleuse

Dans le cas où le système immunitaire ne maîtrise pas l'infection et la réplication virale, le tropisme cellulaire du VZV est élargi et l'infection s'étend vers d'autres organes.

La pneumopathie varicelleuse est la principale complication « systémique » de la primo-infection par le VZV ; son incidence varie entre les populations de moins de 5% chez l'enfant jusqu'à 20% chez les sujets immunodéprimés, et elle touche préférentiellement les adultes et les enfants de moins de 5 ans, particulièrement avant 6 mois [29]. Le tabagisme est un facteur

de risque majeur par diminution de la clairance muco-ciliaire bronchique et l'altération des fonctions macrophagiques alvéolaires. La grossesse, une immunodépression et une atteinte cutanée importante préexistante sont également des facteurs en faveur du développement de cette complication [30]. Les pneumopathies varicelleuses peuvent être causées par une surinfection bactérienne, ou par l'infection par le VZV lui-même. Les germes les plus fréquemment en cause dans les surinfections sont *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* [29]. Lorsque l'infection est liée au VZV, le virus infecte les cellules alvéolaires par le biais des cellules mononuclées, provoquant une hypoxémie sévère par diminution du transfert d'oxygène des alvéoles aux capillaires. Les symptômes surviennent 1 à 6 jours après l'éruption : on observe une toux associée à une dyspnée, une hyperthermie, pouvant se compliquer d'hémoptysies et d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë. L'image radiographique révèle une pneumonie interstitielle nodulaire avec infiltrats bilatéraux diffus et péri-hilaires.



Figure 5: opacités nodulaires à contours flous, pouvant entrer dans le cadre d'une pneumopathie varicelleuse - © Atlas d'Imagerie Médicale - [31]

La prise en charge thérapeutique est prioritairement symptomatique (ventilation assistée si besoin). L'aciclovir est le traitement de référence de cette pathologie ; selon certaines études, le taux de décès pour les patients non-traités par cette molécule est 3,6 fois supérieur à celui des patients traités [32].

La pneumopathie peut être résolutive en 48h mais elle reste responsable de 30% des décès des varicelles adultes par nécrose focale des capillaires, des cellules alvéolaires et des artéoles [3, 7, 12, 15].

c. Complications neurologiques de la varicelle

Trois syndromes principaux sont décrits dans le cadre des primo-infections par le VZV : l'ataxie cérébelleuse aiguë, l'encéphalite et le syndrome de Reye. Les deux premières manifestations touchent principalement les enfants de moins de 5 ans ou les adultes de plus de 20 ans. Les signes cliniques apparaissent généralement entre 2 à 6 jours après le début du *rash* [19].

L'ataxie cérébelleuse aiguë est caractérisée par l'installation progressive de troubles comportementaux (irritabilité...), associés à une ataxie, des tremblements, un nystagmus, ainsi qu'à des troubles de la parole [4, 19]. Les symptômes peuvent persister quelques jours à quelques semaines. Cette pathologie de pathogénèse inconnue est spontanément résolutive sans séquelle [15]. On peut retrouver une hyperprotéinorachie associée à une pléiocytose au niveau du liquide céphalo-rachidien (LCR). L'imagerie est le plus souvent normale. Un traitement par aciclovir peut être indiqué si une répllication virale au niveau du LCR est avérée [4].

L'encéphalite varicelleuse est la complication neurologique la plus grave mais sa pathogénèse demeure peu claire : une répllication virale active a toutefois été mise en évidence grâce à la détection du virus dans le LCR par microscopie électronique, ainsi que par la synthèse intrathécale d'immunoglobulines [15]. Les symptômes sont d'apparition brutale et caractérisés par un changement soudain du niveau de conscience. On observe un infiltrat péri-vasculaire de cellules mononuclées, associée à une démyélinisation, une prolifération microgliale, une dégénérescence neuronale et des hémorragies focales [15].

Le risque de syndrome de Reye au cours de la varicelle est lié à la prise d'aspirine ; il est principalement rencontré en pédiatrie. Ce syndrome se caractérise par une stéatose hépatique, des vomissements, une augmentation de la pression intracrânienne évoluant vers une encéphalopathie aiguë non-inflammatoire mortelle dans 80% des cas. La prise d'aspirine doit donc formellement être contre-indiquée lors de la survenue d'une varicelle [19].

D'autres complications neurologiques moins fréquentes ont également été relevées lors de la varicelle. Ces manifestations s'orientaient plutôt vers un caractère auto-immun chez des

adultes sans facteur de risque particulier : paralysie associée à une neuropathie démyélinisante, méningite, myélite ou encore polyradiculonévrite tel que le syndrome de Guillain-Barré [4, 7, 23]...

d. Varicelle de la femme enceinte et varicelle néonatale

La survenue de la varicelle chez les femmes enceintes est un phénomène rare vu que, dans les pays de climats tempérés, 95% des personnes en âge de procréer sont immunisées contre le virus : elle est estimée entre 5 et 7 cas pour 10.000 grossesses [11]. L'incidence du zona est, quant à elle, estimée à 1,5 cas pour 10.000 grossesses, mais cette récurrence ne semble pas causer de pathologies malformatives chez le fœtus ou de complication chez le nouveau-né. Seul l'allaitement sera contre-indiqué si les lésions concernent le métamère correspondant au mamelon [34].

Les femmes enceintes non-immunisées contre le VZV semblent plus à risque de développer une pneumopathie varicelleuse comparativement à la population générale, notamment lorsque la contamination a lieu au cours du troisième trimestre. Ce constat pourrait être lié à la diminution relative de l'immunité maternelle lors de cette phase de la grossesse [34]. Les autres facteurs de risque associés sont le tabagisme et une éruption avec plus de 100 vésicules [35].

En ce qui concerne les risques pour le fœtus, les complications rapportées sont des fausses-couches spontanées et la mort *in utero*, principalement lorsque la primo-infection survient avant 20 semaines d'aménorrhées. La menace d'accouchement prématuré concerne les patientes atteintes après ce délai [36]. Ces complications sont rares : la majorité des nouveau-nés est indemne à la naissance, soit parce que le virus n'a pas été transmis au cours de la grossesse, soit parce que l'infection a été contrôlée avec succès [36].

Les conséquences d'une varicelle pergravidique incluent trois types de problèmes pour le fœtus viable:

- l'embryofoetopathie ou syndrome de varicelle congénitale
- le zona de la petite enfance
- la varicelle néonatale.

La fréquence du syndrome de varicelle congénitale est rare (< 1% des enfants atteints au cours d'une varicelle pergravidique) et le risque semble maximal si la contamination a lieu avant la vingtième semaine d'aménorrhée. La physiopathologie serait plutôt liée à une réactivation du VZV *in utero* plutôt qu'à l'invasion initiale : la courte période de latence suivant la primo-infection serait dûe à l'immaturation des cellules embryonnaires du fœtus. Les symptômes observés seraient liés à la réactivation touchant un dermatome précis (comme un zona), associée à une encéphalite à VZV [15, 36]. L'atteinte la plus fréquemment rencontrée chez le nouveau-né est la présence de lésions cutanées similaires à celles d'une varicelle de l'enfant : les vésicules se situent le long d'un trajet métamérique, et sont parfois associées à des anomalies des extrémités (atrophie musculaire, hypoplasie osseuse, pied bot...). Les nouveau-nés présentent fréquemment une microcéphalie, une atrophie corticale ainsi que des calcifications intracrâniennes, conséquences d'une encéphalite à VZV se produisant *in utero* [28]. Ces manifestations neurologiques sont fréquemment associées à des troubles nerveux (paralysies partielles...), ou encore à des perturbations du système nerveux autonome, tel qu'un reflux gastro-oesophagien ou des troubles de la déglutition... Enfin, des manifestations oculaires ont souvent été rapportées, à titre de chorioretinite, de cataracte ou de microphthalmie. Ce syndrome reste associé à une mortalité de 30% au cours des premiers mois de vie, ainsi qu'à un risque de 15% de survenue de zona dans les premiers mois ou les premières années de vie [36].



Figure 6: syndrome de varicelle congénitale [37]

Dans le cas d'une contamination au-delà de 20 semaines d'aménorrhées, la majorité des enfants ne présentera pas de signe clinique : la seule séquelle de l'infection par le VZV sera la persistance d'IgG au-delà de 2 ans de vie. Dans certains cas, l'enfant fera une varicelle *in utero* et présentera un zona dans les premières semaines ou les premiers mois de vie car le système immunitaire sera dans l'incapacité de maintenir une latence efficace après exposition intra-utérine au VZV [38].

Enfin, si la transmission du VZV se produit à la période périnatale (dans une période de 7 jours entourant l'accouchement), le risque majeur est la varicelle néonatale : les IgG maternelles n'étant encore ni qualitativement, ni quantitativement efficaces, elles ne protégeront pas le nouveau-né qui présentera une forme de varicelle grave avec un risque important de complications pulmonaires et neurologiques, pouvant évoluer vers le décès dans 30% des cas [11, 37].

Le diagnostic d'une infection materno-fœtale par le VZV sera d'abord clinique mais, en cas de besoin, une amniocentèse pourra être effectuée pour détecter la présence du virus dans le liquide amniotique par biologie moléculaire. Ce prélèvement pouvant induire des fausses-couches spontanées, il sera nécessaire d'en évaluer le rapport bénéfice-risque. Par ailleurs, il

ne peut être effectué qu'après 18 semaines d'aménorrhées ; de ce fait, dans certaines situations cliniques, la recherche du génome viral pourra être retardée par rapport aux symptômes. Enfin, la présence de l'ADN viral dans le liquide amniotique ne signe pas forcément une contamination fœtale. Ce résultat devra donc être confronté aux données cliniques et échographiques, principaux éléments de suivi des patientes [37].

B. Manifestations cliniques observées au cours des réactivations

1. Le Zona

Le zona se présente comme une éruption de vésicules groupées en bouquet sur fond érythémateux, de topographie radiculaire et unilatérale localisée au niveau du dermatome innervé par le ganglion sensitif où siège la réactivation. Le *rash* est régulièrement précédé de douleurs nerveuses, caractérisant la phase prodromique de la réactivation. L'intervalle de temps entre les douleurs et l'apparition du *rash* correspond au délai nécessaire au virus pour se répliquer dans les ganglions, migrer jusqu'au dermatome innervé *via* l'axone et se multiplier au niveau cutané [39]. Les vésicules sont similaires à celles observées lors de la varicelle ; elles se dessèchent en 2 à 3 jours en formant des croûtes érosives qui cicatriseront et tomberont en une dizaine de jours, laissant parfois une cicatrice atrophique et hypochromique. Le zona peut toucher n'importe quel territoire ; l'éruption se localise le plus fréquemment au niveau abdominal, intercostal ou dorso-lombaire mais peut parfois toucher le visage lors d'une réactivation au niveau du nerf trijumeau ou ophtalmique [11].

Cette éruption est fréquemment accompagnée d'un syndrome infectieux modéré, associant une hyperthermie à 38°C à une adénopathie satellite du ganglion touché. Des placards érythémateux ainsi que des douleurs nerveuses peuvent précéder de quelques jours l'apparition de l'éruption (phase prodromique). Ces douleurs, à type de brûlure, persistent jusqu'à cicatrisation des lésions. Elles peuvent parfois être plus vives, donnant la sensation d'un « coup de poignard » [11]. Dans certains cas, elles peuvent également persister après l'éruption. On parlera d'algies post-zostériennes lorsqu'elles persistent au-delà de 120 jours, sous la forme de douleurs intenses, lancinantes, d'étiologie multifactorielle, touchant préférentiellement le sujet âgé. Les neurones désafférentés vont présenter des décharges épileptiformes associées à une inflammation locale. Une hypersensibilité des nocicepteurs centraux a également été mise en cause pour expliquer ces douleurs persistantes. Le risque de survenue d'algies post-zostériennes augmente avec l'âge et l'immunodépression et affecte grandement la qualité de vie de ces patients [11, 19]. Les autres facteurs de risque de

développer ces algies post-zostériennes sont la présence de douleurs marquées au cours de la phase prodromique, ainsi qu'un *rash* de forte intensité associé à une douleur importante lors de la phase aiguë du zona ; la mise en place retardée du traitement antiviral est également un facteur favorisant l'apparition de ces douleurs [39].

Enfin, on peut parfois observer des douleurs typiques du zona sans *rash* cutané associé : cette entité dénommée « zoster sine herpette » peut être étayée par une recherche virologique positive (séroélévation des anticorps anti-VZV, PCR positive dans le sang ou le LCR) [4, 16].

2. *Complications du zona*

a. Zona de l'immunodéprimé

Les patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques, ayant un cancer sous-jacent ou encore les sujets séropositifs pour le VIH seront plus à risque de développer un zona par rapport à la population générale. Ils présenteront en outre des formes plus graves : les lésions pourront prendre un aspect ulcéro-hémorragique, s'étendre à plusieurs métamères, et leur cicatrisation sera prolongée. Les vésicules deviennent fréquemment verruqueuses, avec apparition de cellules géantes multinucléées, une hyperplasie de l'épiderme et une hyperkératose. Parfois, le zona pourra être généralisé : l'éruption débutera au niveau d'un dermatome, puis des vésicules varicelliformes apparaîtront sur l'ensemble du corps. La dissémination du virus par voie hématogène est également parfois observée, pouvant conduire à des atteintes viscérales telles qu'une pneumopathie, une hépatite ou encore des formes neurologiques. Enfin, certains sujets présentent des formes de zona chronique, pouvant durer plusieurs mois [11, 15, 19].



Figure 7: Vésicules ulcéro-hémorragiques - zona du sujet immunodéprimé [11]

b. Complications neurologiques

i. *Atteintes du système nerveux périphérique*

Les atteintes neurologiques liées à la réactivation virale pourront être très diverses selon la zone où siègera la réactivation. Ainsi, un déficit moteur touchant les membres supérieurs pourra être observé lors d'une atteinte des nerfs cervicaux, tandis qu'un zona au niveau dorso-lombaire pourra se compliquer d'une paralysie des membres inférieurs, d'un iléus paralytique ou encore de dysfonctionnements vésicaux [16, 19].

Une symptomatologie très variée a également été relatée lors des récurrences au niveau des nerfs crâniens : ainsi, le zona ophtalmique est causé par l'atteinte de la branche V1 du nerf trijumeau, et peut se compliquer d'une kératite zostérienne. La prise en charge ophtalmologique de cette manifestation représente une urgence car il s'agit d'un facteur de risque majeur de cécité. D'autres symptômes peuvent également être rencontrés lors d'une atteinte de ce nerf, telles qu'une conjonctivite ou une uvéite, pouvant aller jusqu'à la nécrose rétinienne. L'atteinte du ganglion géniculé au niveau du nerf facial est la cause du syndrome de Ramsay-Hunt, associant une otite avec éruption cutanée dans la conque de l'oreille à une paralysie faciale homolatérale. Ces signes caractéristiques peuvent être accompagnés

d'acouphènes, d'une hypoacousie, de nausées et vomissements ou encore de vertiges [16]. Enfin, d'autres signes cliniques ont été rapportés, à type d'agueusie, de paralysie faciale isolée (appelée « paralysie de Bell » par les Anglo-Saxons) ou encore d'ostéonécrose [40].

ii. Atteintes du système nerveux central (SNC)

Les complications touchant le système nerveux central après un zona sont rares mais leur gravité potentielle nécessite de les diagnostiquer et les prendre en charge le plus précocement possible.

Chez les sujets immunocompétents, le passage du VZV au niveau du système nerveux central sera régulièrement asymptomatique : la présence du VZV dans le LCR a été mise en évidence par biologie moléculaire et / ou détection d'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines chez plusieurs patients après une réactivation du virus, sans manifestation clinique apparente [41]. Par ailleurs, le zona est une cause fréquente de méningite aseptique, atteinte bénigne, spontanément et complètement résolutive en une à deux semaines [39].

Les facteurs de risque associés au développement de complications impliquant le SNC sont l'immunodépression, la réactivation au niveau d'un nerf crânien ou encore un zona « disséminé ».

Chez les sujets immunodéprimés, l'atteinte du SNC la plus fréquente après un zona est une artérite touchant les vaisseaux de petits calibres, encore appelée « vasculopathie multifocale ». Les lésions vasculaires peuvent être ischémiques ou hémorragiques, associées à des atteintes démyélinisantes de la substance blanche. Ses manifestations cliniques sont variables (aphasie, signes d'encéphalite...) et d'installation subaiguë, en l'absence d'éruption cutanée préalable dans un tiers des cas [42]. De ce fait, sa prise en charge est souvent retardée, évoluant le plus souvent vers le décès [16].

Une artérite granulomateuse des gros vaisseaux peut également se déclarer suite à un zona : on parle alors de « vasculopathie unifocale ». Elle suit le plus souvent de plusieurs semaines à plusieurs mois une réactivation au niveau du nerf trijumeau et touche préférentiellement les sujets âgés immunocompétents. Ce syndrome se manifeste sous forme d'un AVC ischémique provoqué par l'artérite, induisant une encéphalopathie pouvant associer des symptômes caractéristiques (fièvre, céphalées, troubles du comportement...) à une perte visuelle uni- ou bilatérale [16, 42].

Le diagnostic de ces vasculopathies peut être étayé par une angiographie, l'imagerie ou par la recherche du génome viral par biologie moléculaire au niveau du LCR.

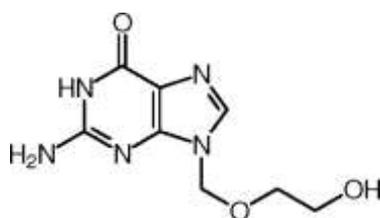
Enfin, de rares cas de myélites aiguës transverses ont été relatés (moins de 1 zona sur 1000). Les symptômes apparaissent en quelques jours à quelques semaines après le *rash*, souvent à type de paraparésie, de déficits sensitifs et de troubles sphinctériens. Chez les sujets immunodéprimés, l'évolution de ce syndrome est le plus souvent insidieuse et mortelle par nécrose médullaire liée à la prolifération du VZV dans le parenchyme [16].

IV. Traitement des infections par le VZV

A. Traitements disponibles

1. Analogues nucléosidiques

L'aciclovir est un analogue nucléosidique acyclique de la 2'-désoxyguanosine et le valaciclovir est sa prodrogue (L-valine ester d'aciclovir). L'aciclovir est phosphorylé par la thymidine kinase virale puis par les kinases cellulaires, aboutissant à la formation d'aciclovir triphosphate. Ce métabolite inhibe compétitivement l'ADN polymérase virale et joue un rôle de terminateur de chaîne lié à l'absence de groupement hydroxyl en 3', empêchant la fixation de nouveaux nucléotides au brin d'ADN en cours de synthèse [2]. De par leur mécanisme d'action, il s'agit d'agents virostatiques, actifs uniquement sur les populations virales en phase de répllication active et leur sélectivité des cellules infectées par le virus est garantie par la première phosphorylation par l'enzyme virale [2, 3]. Le valaciclovir et le famciclovir présentent l'intérêt d'une meilleure biodisponibilité, permettant d'utiliser des posologies plus faibles, notamment en cas d'atteinte rénale ; cependant, leur coût est également plus important [2]. Ces molécules sont bien tolérées et peu d'effets indésirables ont été rapportés [4]; la précaution principale reste l'adaptation de la posologie de l'aciclovir en cas d'insuffisance rénale [43]. Des cas de résistances aux analogues nucléosidiques par sélection de souches déficientes en thymidine kinase virale ont été rapportés chez des patients infectés par le VIH ou recevant des traitements par aciclovir au long cours. D'autres molécules antivirales actives sur les *Herpesviridae* peuvent alors servir d'alternative (comme par exemple le foscarnet) [43].



aciclovir

Figure 8: Structure chimique de l'aciclovir

Les indications thérapeutiques de l'aciclovir par voie intraveineuse pour le traitement de la varicelle, telles que recommandées dans la conférence de consensus sur la prise en charge des infections à VZV de 1998, sont le traitement

- des varicelles des sujets immunodéprimés : hémopathies, patients séropositifs pour le VIH, chimiothérapie anticancéreuse,
- des varicelles néo-natales,
- des nouveau-nés dont la mère a fait une varicelle entre 5 jours avant et 2 jours après l'accouchement, même en l'absence de *rash*,
- des formes graves de l'enfant de moins de 1 an,
- des varicelles compliquées, notamment en cas de pneumopathie varicelleuse,
- des femmes enceintes dont la varicelle survient dans les 8 à 10 jours avant l'accouchement [3].

2. Immunothérapie

Les immunoglobulines anti-VZV sont efficaces contre la varicelle si elles sont administrées au moment de la multiplication dans les ganglions lymphatiques régionaux de la zone d'entrée du virus, juste avant la première virémie. Cela limiterait la progression de la pathologie [32]. Leur action est optimale si elles sont injectées dans les 96 heures suivant l'exposition [44]. Leur injection est recommandée lors d'un risque de varicelle pour

- les sujets immunodéprimés (enfants et adultes) non-immunisés,
- les femmes enceintes non-immunisées,
- les nouveau-nés dont la mère non-immunisée a été en contact avec le VZV dans les cinq jours avant ou dans les deux jours suivant l'accouchement,
- les prématurés dont la mère n'a pas été atteinte de la varicelle avant l'accouchement mais qui doivent rester à l'hôpital pour un certain laps de temps;
- les prématurés de moins de 28 semaines de grossesse ou de moins de 1000 g de poids de naissance, quel que soit le statut sérologique de la mère par rapport au VZV [2, 45].

Leur utilisation est également conseillée dans le cas des zonas à risque de dissémination à l'ensemble du corps [45].

Suite à des problèmes de sécurité virale, ces immunoglobulines ont été retirées du marché en 1994 [3] avant d'être de nouveau commercialisées en 2006 (Varitect® - Biotest Pharma GMBH pour l'Union Européenne) [45]. Elles sont actuellement disponibles sous ATU nominative pour les indications citées ci-dessus [46].

L'utilisation de l'IFN- α pour réduire la gravité et limiter l'évolution de la varicelle chez les enfants immunodéprimés par stimulation de l'immunité cellulaire semble être une piste intéressante [26]. Cependant, son utilisation n'est pas reconnue officiellement à l'heure actuelle.

B. Prise en charge des infections par le VZV

1. Primo-infection : Varicelle

La varicelle de l'enfant immunocompétent ne nécessite pas de traitement antiviral spécifique : de simples mesures d'hygiène, notamment afin d'éviter les surinfections bactériennes, sont suffisantes : une à deux douches par jour à l'eau tiède et nettoyage avec un savon dermatologique sans antiseptique, nettoyage des lésions avec de la chlorhexidine, couper les ongles courts... Les produits induisant une macération doivent être évités (talc, pommades...). En cas de prurit très intense, l'utilisation d'anti-histaminiques de classe anti-H1 sédatifs peut être envisagée (hydroxyzine, dexchlorphéniramine). L'administration d'aspirine est à proscrire en raison du risque de syndrome de Reye, ainsi que les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, possiblement à risque d'induire une fasciite nécrosante [11].

L'éviction des collectivités est une mesure réglementaire d'efficacité modérée, la contagiosité de la maladie étant maximale dans les quelques jours précédant l'apparition des lésions [11].

2. Latence virale

Les antiviraux n'ayant pas d'activité lors de la latence virale, l'intérêt de leur utilisation en prophylaxie des rechutes est restreint et risque d'induire des résistances [47].

3. Réactivation : Zona

La prise en charge des lésions cutanées du zona est similaire à celle de la varicelle. Les traitements antiviraux doivent être mis en place dans les 72 premières heures de l'éruption pour présenter une efficacité optimale [11].

Dans le cas d'un zona de présentation classique, le choix se portera en premier sur le valaciclovir ou le famciclovir per os [16]. Leur utilisation au cours de l'épisode aigu permettrait de limiter l'apparition de nouvelles lésions, en améliorant la cicatrisation et diminuant la durée de l'épisode douloureux [16, 47]. Par ailleurs, ces molécules permettraient de réduire la durée des algies post-zostériennes en limitant la destruction neuronale causée par la réplication du virus lors de sa réactivation [43].

Le valaciclovir est indiqué pour la prévention des complications oculaires en cas de zona ophtalmique, pouvant être associé à une pommade ophtalmique à l'aciclovir après avis spécialisé [11].

Les douleurs associées à la phase aiguë du zona peuvent être prises en charge après une évaluation de la douleur à l'aide d'une échelle visuelle analogique. Les antalgiques non-morphiniques (paracétamol, AINS) présentent une faible efficacité [39]. En cas de douleurs modérées, des antalgiques de classe II pourront être utilisés (par exemple : association paracétamol – codéine ou tramadol). Si leur efficacité est insuffisante, il conviendra de traiter ces sujets par antalgiques morphiniques forts (morphine, fentanyl).

La prise en charge des algies post-zostériennes repose sur des médicaments actifs contre les douleurs neuropathiques : les antidépresseurs tricycliques tels que l'amitryptiline (75 mg/j) ont démontré la meilleure efficacité contre le fond douloureux permanent, à condition d'être prescrits précocement pour être efficaces. L'adjonction de corticoïdes au traitement par aciclovir ne semble pas diminuer la durée des douleurs post-zostériennes; par contre, leur effet antalgique et anti-inflammatoire a été bénéfique pour la prise en charge de la douleur aiguë [39].

La carbamazépine présenterait une efficacité intéressante dans le contrôle des paroxysmes hyperalgiques et les algies trigéminées. La gabapentine et la prégabaline peuvent également être employées [39].

Enfin, la prise en charge psychologique de ces patients est importante du fait de l'impact de ces douleurs sur leur qualité de vie.

Les indications des traitements anti-VZV sont résumées dans le tableau suivant :

Stade de l'infection	Population	Définition du cas	Prise en charge
Primo-infection	Adultes immunocompétents	Varicelle compliquée (surtout si pneumopathie varicelleuse)	Aciclovir IV - 10 mg/kg/8h
	Sujets immunodéprimés*	Adulte	Aciclovir IV - 10 mg/kg/8h – 7 à 10 jours
		Enfant	Aciclovir IV 250 à 500 mg/m ² /8h – 7 à 10 jours
	Femme enceinte	Varicelle < 24 Semaines d'aménorrhées	Surveillance dans un centre de diagnostic anténatal
		Varicelle dans les 8 à 10 jours précédant l'accouchement	Aciclovir IV 15 mg/kg/8h + Varitect® 5-25 UI/kg
	Nouveau-nés	Varicelle néo-natale	Aciclovir IV 20 mg/kg/8h + Varitect® 5-25 UI/kg
		Nouveau-nés dont la mère a fait une varicelle entre 5 jours avant et 2 jours après l'accouchement	Aciclovir IV 20 mg/kg/8h + Varitect® 5-25 UI/kg
		Formes graves de l'enfant de moins de 1 an	Aciclovir IV 20 mg/kg/8h
	Zona**	Sujets immunocompétents	Zona ophtalmique
Aciclovir PO - 800 mg, 5/j – 7 à 10 jours			
Prévention des algies post-zostériennes chez les sujets de plus de 50 ans			Famciclovir - 500 mg, 3/j – 7 jours
Sujets immunodéprimés*		Adulte	Aciclovir IV - 10 mg/kg/8h – 7 à 10 jours
		Enfant	500 mg/m ² /8h – 7 à 10 jours

Tableau 2: Indications des traitements anti-VZV [3, 39, 45]

* Posologies à adapter en cas de complications neurologiques centrales ; administration possible de Varitect® en fonction du contexte

** Traitement devant être débuté dans les 48 à 72 heures post-éruption)

V. Vaccination

Les vaccins contre le VZV sont constitués d'une souche de virus vivant atténué, la souche OKA-P, isolée à partir de vésicules chez un enfant Japonais de 3 ans présentant une varicelle typique (et dont le nom de famille était Oka) [48]. Elle a par la suite été atténuée par passage successifs en culture avec différents types cellulaires (fibroblastes embryonnaires humains, cellules diploïdes humaines...) pour conduire à la souche atténuée : OKA-V [49].

Les recommandations vaccinales varient selon les pays : alors que la vaccination contre le VZV est recommandée en immunisation générale aux Etats-Unis depuis 1996 pour les enfants de plus de 12 mois, le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) n'a pas recommandé cette mesure en France, préférant préconiser la vaccination des populations à risque [50]. Certains autres pays, comme la République Tchèque, recommandent la vaccination pour les enfants, sans toutefois l'intégrer dans un programme universel [49].

Le vaccin est actuellement commercialisé en France sous deux spécialités : Varilrix® (GSK) et Varivax® (Sanofi). Il est également disponible en association tétravalente avec les vaccins contre la rougeole, les oreillons et la rubéole (Priorix tetra® (GSK) et ProQuad® (Merck)) [51, 52].

Le schéma vaccinal comporte deux doses espacées au moins de 1 mois [53, 54]. Les études d'efficacité clinique ont montré que la diminution de l'incidence était meilleure avec ce schéma [49]. Après deux injections, le taux de séroconversion avoisine les 98% chez les enfants [55]. L'instauration du schéma universel à deux injections chez les enfants de plus de 12 mois aux USA a montré une diminution de la mortalité et du nombre d'hospitalisations liées à la varicelle comparativement à l'ère pré-vaccinale [49]. Cependant, cela a eu pour effet de décaler l'âge de survenue des varicelles : les adultes étant plus à risque de développer des complications, la mise en place d'un tel système nécessite une couverture vaccinale maximale (>80%) pour éviter l'augmentation du nombre de cas de varicelles graves [50].

Par ailleurs, le risque de la vaccination de masse dès l'enfance est de voir augmenter le nombre de cas annuel de zozas. En effet, une nouvelle exposition d'un sujet immunisé induit une stimulation de son immunité cellulaire ; dans le cas d'une diminution de la circulation du virus sauvage, les sujets immunisés seront moins fréquemment à son contact et seront donc plus à risque de déclencher un zozon [56].

Ainsi, dans son avis du 5 juillet 2007, « le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) ne recommande pas à ce jour, dans une perspective de santé publique, la vaccination généralisée contre la varicelle des enfants à partir de l'âge de 12 mois. C'est pourquoi il déconseille le remplacement du vaccin trivalent rougeole-rubéole-oreillons par le quadrivalent rougeole-rubéole-oreillons-varicelle » [50].

De plus, le HCSP « précise les recommandations de vaccination contre la varicelle, avec un schéma à deux doses :

- en rappelant les recommandations spécifiques préalablement émises dans son avis du 19 mars 2004 [57];

- en recommandant de plus la vaccination contre la varicelle :

- pour les adolescents de 12 à 18 ans n'ayant pas d'antécédent clinique de varicelle ou dont l'histoire est douteuse ; un contrôle sérologique préalable peut être pratiqué
- pour les femmes en âge de procréer, notamment celles ayant un projet de grossesse, et sans antécédent clinique de varicelle ; un contrôle sérologique préalable peut être pratiqué
- pour les femmes n'ayant pas d'antécédent clinique de varicelle (ou dont l'histoire est douteuse) dans les suites d'une première grossesse, sous couvert d'une contraception efficace ;
- pour les adultes de plus de 18 ans exposés à la varicelle, immunocompétents sans antécédent de varicelle ou dont l'histoire est douteuse (le contrôle de la sérologie étant facultatif) dans les trois jours suivant l'exposition à un patient avec éruption ;
- toute personne sans antécédent de varicelle (ou dont l'histoire est douteuse) et dont la sérologie est négative, en contact étroit avec des personnes immunodéprimées (les sujets vaccinés doivent être informés de la nécessité, en cas de *rash* généralisé, d'éviter les contacts avec les personnes immunodéprimées pendant 10 jours) ;
- les enfants candidats receveurs, dans les six mois précédant une greffe d'organe solide, sans antécédents de varicelle (ou dont l'histoire clinique est douteuse) et dont la sérologie est négative, (avec deux doses à au moins un mois d'intervalle et en pratiquant une surveillance du taux d'anticorps après la greffe). » [58]

En milieu professionnel, la vaccination est recommandée « pour les personnes sans antécédent de varicelle (ou dont l'histoire est douteuse), dont la sérologie est négative et exerçant l'une des professions suivantes :

- professionnels au contact avec la petite enfance (crèches et collectivités d'enfants notamment)
- professions de santé en formation (à l'entrée en première année des études médicales ou paramédicales), à l'embauche ou à défaut déjà en poste, en priorité dans les services accueillant des sujets à risque de varicelle grave. » [59]

La vaccination contre la varicelle est contre-indiquée pendant la grossesse : toute vaccination chez une femme en âge de procréer doit être précédée par un test négatif de grossesse. Les femmes candidates à la vaccination et ayant l'intention de débiter une grossesse doivent prendre une contraception pendant les trois mois suivant le vaccin. Par ailleurs, la vaccination n'est pas recommandée chez les femmes qui allaitent [60, 61].

La vaccination contre la varicelle chez les sujets immunodéprimés n'est actuellement pas recommandée. Cependant elle ne semble pas être à risque majeur pour ces patients [49] et diverses études mettent en évidence une diminution de l'incidence et de la gravité de la varicelle pour les sujets immunodéprimés vaccinés [50].

Le vaccin est globalement bien toléré en dehors des habituels effets inhérents à la vaccination (rougeur et douleur au point d'injection) ; de rares *rashs* cutanés transitoires ont été rapportés [49].

De même qu'il existe un vaccin contre la varicelle, un vaccin contre le zona est commercialisé depuis 2005 (Zostavax® - Sanofi). Il est également constitué de la souche OKA, mais est 14 fois plus concentré que dans le vaccin contre la varicelle. Une étude d'efficacité aux USA a permis de mettre en évidence une diminution significative du nombre de cas de zona et de douleurs post-zostériennes suite à l'injection d'une dose de ce vaccin chez les sujets de plus de 60 ans [62]. Ainsi, l'avis du 25 octobre 2013 du HCSP « recommande la vaccination contre le zona chez les adultes âgés de 65 à 74 ans révolus avec un schéma vaccinal à une dose ». Cette mesure a pour but de réduire l'incidence du zona et des douleurs post-zostériennes, ainsi que leur intensité [58].

VI. Méthodes diagnostiques du VZV

Les caractéristiques cliniques de la primo-infection par le VZV permettent généralement un diagnostic immédiat de varicelle et le recours au laboratoire n'est que rarement requis. Cependant, lors des formes de présentation atypiques, de risque épidémique et en cas de risque majoré de complications (âge, immunodépression, grands brûlés...), différents outils pourront être utilisés en complément de la clinique.

A. Types de prélèvements

L'origine des prélèvements parvenant au laboratoire pour le diagnostic d'infection par le VZV dépend de la zone atteinte ainsi que de la méthode diagnostique prescrite.

Pour un diagnostic sérologique, un sérum (sang prélevé sur tube sec) sera requis. A l'inverse, la nature des prélèvements pour les méthodes diagnostiques directes dépendra des lésions observées ; les principaux types de prélèvements retrouvés au laboratoire sont détaillés ci-après :

- Atteinte cutanée : écouvillonnage des lésions, préférentiellement à conserver dans un milieu de transport viral, biopsies,
- Atteinte neurologique : Liquide céphalo-rachidien (LCR),
- Pneumopathie à VZV: Aspiration / Lavage broncho-alvéolaire (LBA),
- Suspicion d'infection materno-fœtale : Liquide amniotique.

Dans des cas particuliers, le VZV pourra être recherché sur de l'humeur aqueuse ou encore sur sang recueilli sur EDTA.

B. Méthodes de diagnostic indirect

Différentes méthodes de détection des anticorps anti-VZV sont actuellement commercialisées basées sur des principes variés tels que l'Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), l'immunoluminométrie, la Time-Resolved Immunofluorescent Assay (TRFIA) ou encore l'agglutination avec des particules de latex. La recherche des anticorps anti-VZV peut être demandée comme un simple contrôle d'immunité par les cliniciens, par exemple avant la mise en place de traitements pouvant interférer avec l'immunité cellulaire (greffes, immunosuppresseurs...) ou dans le cadre d'une grossesse avec notion de contagé récent... Cette méthode diagnostique peut également être employée pour la détection des IgM et des IgG en cas de suspicion de primo-infection par le VZV, par exemple en cas d'éruption modérée ou de présentation douteuse chez l'enfant. La présence d'IgM ou l'augmentation du

taux des IgG sur deux sérums prélevés à deux semaines d'intervalle permettra de compléter le diagnostic clinique de primo-infection varicelleuse.

Le sérodiagnostic est également utilisé dans le cas des réactivations avec présence de vésicules en faible quantité ou de présentation atypique. La présence d'IgM étant inconstante lors des zonas, il convient de rechercher ces anticorps en association avec une cinétique des IgG sur deux prélèvements espacés de deux semaines pour détecter une réactivation de l'immunité humorale à l'encontre du virus [63].

Dans le cadre des manifestations neurologiques chez les enfants, la recherche des IgM et des IgG dans le LCR semblerait utile en complément de la PCR [64]. Cette méthode vise à mettre en évidence une synthèse intrathécale d'immunoglobulines anti-VZV : après dosage des taux d'IgG anti-VZV dans un LCR et un sérum prélevés au même moment, le ratio des taux LCR / Sérum est calculé. Un ratio élevé serait en faveur d'une synthèse d'immunoglobulines anti-VZV dans le LCR et pourrait orienter vers une manifestation neurologique de l'infection par le VZV.

C. Méthodes de diagnostic direct

1. Culture cellulaire

La culture virale est réalisée principalement à partir de lésions cutanées prélevées sur écouvillon conservé dans un milieu de transport viral. Toutefois, elle peut être demandée pour d'autres types de prélèvements (LBA, liquide amniotique...), bien qu'elle soit de plus en plus délaissée au profit d'autres méthodes de diagnostic direct présentant une meilleure sensibilité et permettant d'obtenir un résultat plus rapidement [65].

Le VZV, comme les autres *Herpesviridae*, se cultive sur cellules embryonnaires de poumon humain (lignée MRC5). Il s'agit d'un virus difficile à cultiver et l'apparition d'un effet cytopathique (ECP) peut nécessiter de 3 jours à une semaine. L'ECP produit par le virus sur les cellules MRC5 est d'aspect « sale » : il se caractérise par des foyers de cellules rondes et réfringentes, induisant progressivement une lyse du tapis cellulaire [66].

Bien que cette méthode soit longue et, de ce fait, peu adaptée à un diagnostic d'urgence, elle demeure la méthode de référence du diagnostic de l'infection par le VZV, étant la seule méthode permettant d'obtenir une quantité de virus suffisante pour typer la souche ou rechercher des résistances aux antiviraux.



Figure 9: Effet cytopathique du VZV sur une culture de cellules MRC5

2. Immunofluorescence indirecte

La seconde méthode de mise en évidence directe du VZV est l'immunofluorescence indirecte, réalisée à partir de prélèvements cutanés ou de LBA.

Le prélèvement est fluidifié, puis les cellules sont fixées à l'acétone sur lame et incubées avec un anticorps primaire dirigé contre un antigène du VZV. Après lavage, la lame est incubée avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, et dirigé contre le fragment constant de l'anticorps primaire. Suite à un second lavage, la lame est lue au microscope à fluorescence, dont la lumière UV va exciter le fluorochrome et révéler la présence du virus dans les cellules [67].

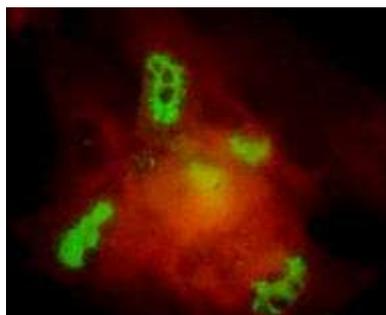


Figure 10: VZV mis en évidence par immunofluorescence à partir d'un prélèvement cutané [68]

Il s'agit d'une méthode de diagnostic direct plus rapide que la culture cellulaire, le résultat étant obtenu généralement en moins de 24h. Néanmoins, cette technique nécessite une certaine expertise au niveau de la lecture car, selon la qualité du prélèvement, le « bruit de fond » lié aux anticorps non-éliminés lors des lavages sera plus ou moins important. De plus,

la sensibilité dépend de la qualité du prélèvement et de l'état des lésions prélevées : la sensibilité sera optimale pour des prélèvements de vésicules et diminuera pour des lésions en cours de cicatrisation [39].

3. *Recherche du génome viral*

La recherche de l'ADN du VZV par biologie moléculaire est devenue incontournable dans les cas d'urgence ou nécessitant une confirmation rapide du diagnostic.

Différentes méthodes d'amplification génique sont actuellement sur le marché : PCR en point final, PCR en temps réel, LAMP...

Les principes des deux technologies d'amplification génique utilisées au cours de ce travail sont développés ci-après.

a. PCR en temps réel

i. *Principe de la PCR en temps réel*

L'objectif de la Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel est d'amplifier un fragment de gène spécifique du pathogène recherché avec détection des amplicons en temps réel. Après extraction des acides nucléiques totaux d'un échantillon biologique, l'amplification va être réalisée en utilisant un mélange réactionnel comportant :

- une enzyme thermostable de polymérisation de l'ADN, la Taq polymérase, comportant également une activité exonucléase 5'–3',
- des didéoxynucléotides,
- un sel d'ion bivalent pour stabiliser l'enzyme et les nucléotides,
- la sonde marquée par un fluorochrome ainsi que les amorces spécifiques pour la détection du gène recherché.

Ce milieu réactionnel va être incubé dans un appareil de PCR en temps réel et la fluorescence des sondes sera mesurée au fur et à mesure de la réaction au cours de l'étape d'élongation. L'amplification des produits de PCR se déroule en plusieurs étapes, répétées de façon cyclique (Fig. 11).

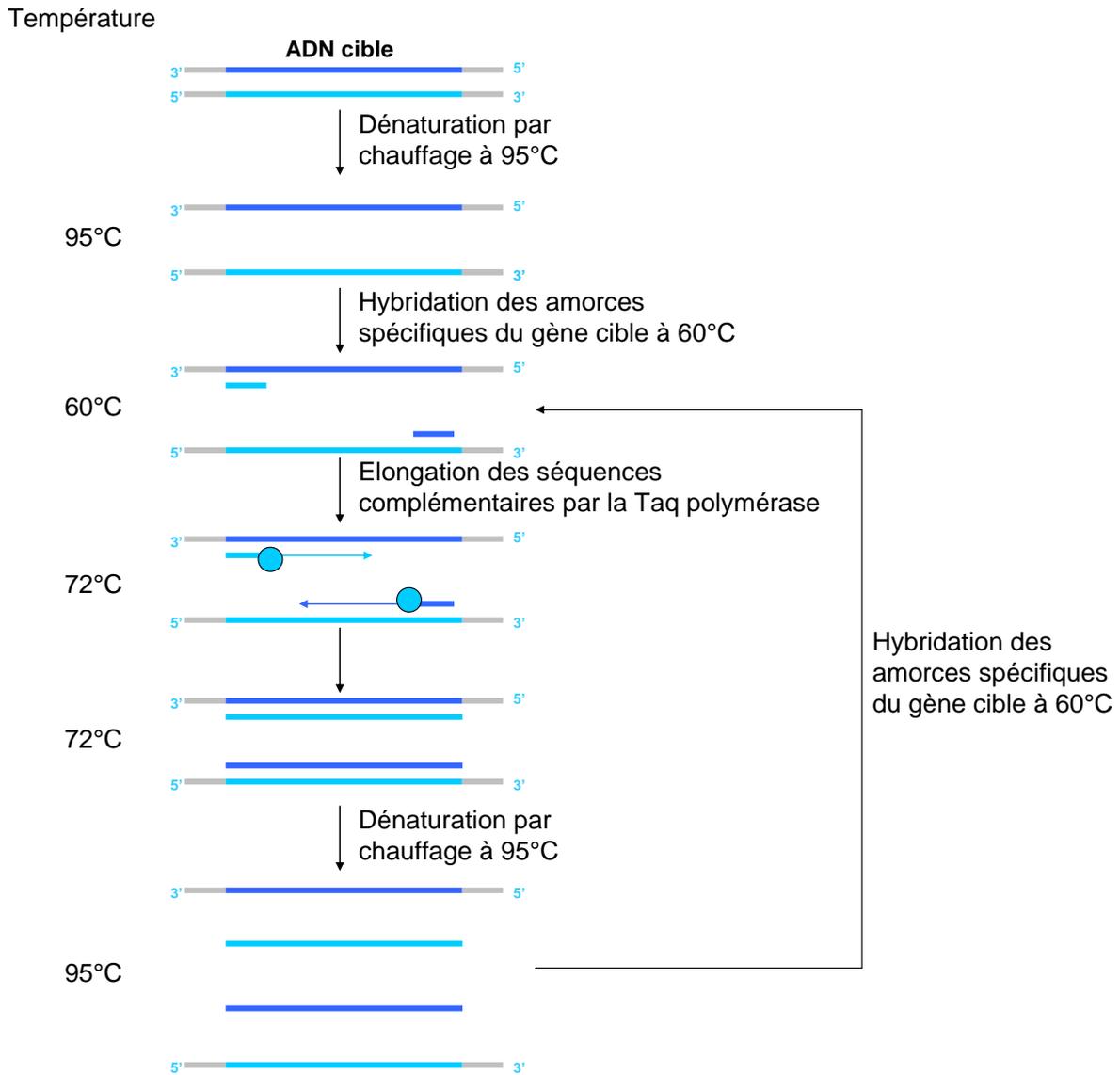


Figure 11: Principe de la PCR [69]

Le milieu réactionnel est porté à 95°C pour dénaturer les acides nucléiques de l'extrait (Dénaturation), avant d'être amené à 60°C pour permettre aux amorces spécifiques du gène cible de s'hybrider au niveau de leur séquence complémentaire (Hybridation). Le milieu est ensuite chauffé à 72°C, température à laquelle la Taq polymérase amplifie la séquence complémentaire du gène cible à partir des amorces (Elongation).

Suite à cette amplification, le milieu réactionnel sera de nouveau porté à 95°C pour dénaturer les acides nucléiques, initiaux et amplicons, permettant une nouvelle hybridation des amorces lors de la phase d'amplification suivante (Fig. 11).

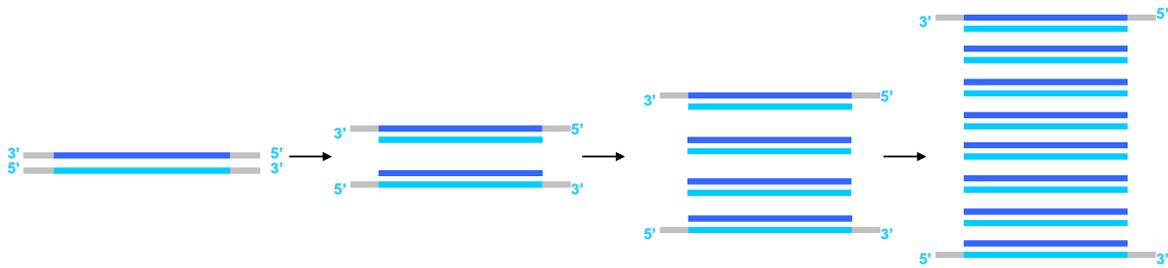


Figure 12: Amplification de la séquence cible du génome par PCR
Chaque flèche correspondant à un cycle de PCR

Ainsi, à chaque cycle, le nombre de copies du gène ciblé sera doublé. L'amplification suit donc une logique logarithmique (Fig. 12). A la fin de la réaction d'amplification, il y aura amplification de 2^n copies du gène cible, n correspondant au nombre de cycles de PCR pour la réaction. Cette technologie de la PCR peut être couplée à des méthodes de détection de la fluorescence : il s'agit dans ce cas de PCR en temps réel.

ii. *Détection de l'amplification du génome viral en temps réel par la technologie des sondes 5' nucléase*

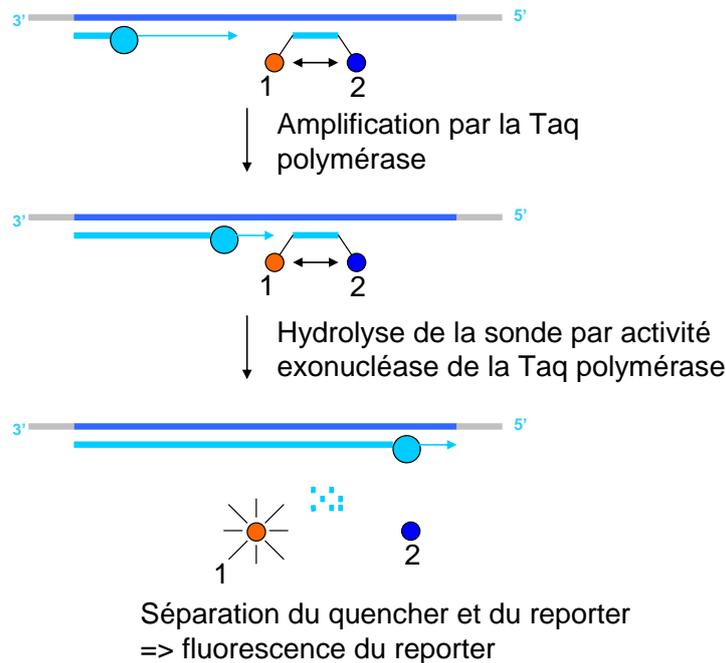


Figure 13: Principe de détection de la fluorescence en temps réel par la technologie des sondes 5' nucléase
1 : Reporter fluorescent – 2 : Quencher captant la fluorescence du reporter par résonance [69]

Le principe de détection de l'amplification du génome viral en temps réel repose sur la technologie des sondes 5' nucléase (Fig. 13) ; ce type de sonde est constitué d'une séquence d'acide nucléique associée à un quencher captant l'énergie de fluorescence d'un fluorophore (reporter) par résonance. La sonde va s'hybrider à une partie du gène cible. Au cours de l'élongation à partir des amorces, la sonde sera dégradée par l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase. Le quencher et le reporter étant séparés, ce dernier va émettre une fluorescence à une longueur d'onde spécifique. Le nombre de copies du fragment d'intérêt augmentant à chaque cycle de façon logarithmique (Fig. 12), la quantité de sondes hydrolysées sera de plus en plus importante, ce qui permettra de mesurer une augmentation de la fluorescence à la fin de chaque phase d'élongation : la détection de la cible recherchée au cours de l'amplification du gène cible se fait donc en temps réel.

Quand le nombre d'amplicons synthétisés devient significatif, la fluorescence mesurée dépasse un certain seuil (Threshold) (Fig. 14).

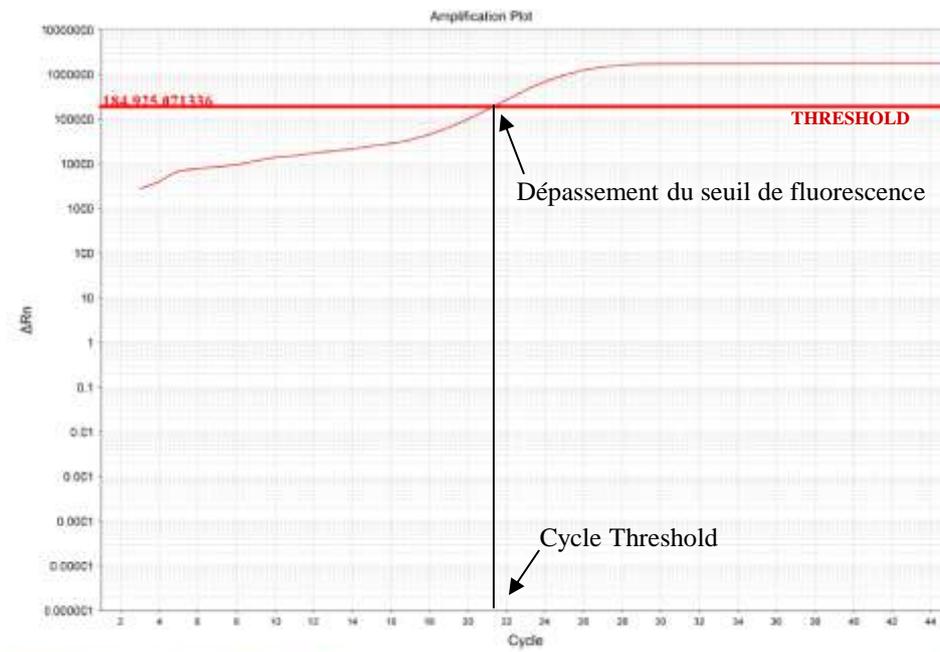


Figure 14: Détermination du Cycle threshold (Ct)

Variation de fluorescence (en ordonnée) en fonction des cycles de PCR (en abscisse)

Le cycle de PCR pour lequel la courbe de fluorescence dépasse le threshold est appelé « Cycle threshold » (C_t ou C_p) : il détermine la positivité d'un échantillon ou d'un contrôle pour la cible recherchée. Plus le nombre initial de copies du génome cible sera important, plus l'amplification sera détectée rapidement : le cycle de détection (C_t) sera donc petit. Dans le cas d'échantillons présentant une faible concentration en acides nucléiques, la fluorescence sera détectée en fin d'amplification et le C_t sera élevé : il pourra alors s'agir d'un échantillon faiblement positif pour le génome recherché, ou d'un artefact lié au « bruit de fond » de fluorescence, ou encore à une contamination de l'échantillon au cours des manipulations.

b. La technologie LAMP en temps réel

La technologie « Loop Mediated Isothermal Amplification » (LAMP) en temps réel a été développée par la société Japonaise Eiken®. Comme la PCR en temps réel, cette méthode a pour but d'amplifier un fragment de gène cible, et de le détecter par suivi en temps réel de la fluorescence de sondes spécifiques du gène recherché.

i. Applications

Cette technologie récente sur le marché de la biologie moléculaire a été brevetée au Japon en 2002 [70]. Développée au départ pour des applications agro-alimentaires telle que la détermination du sexe des embryons bovins [71] ou la détection de pathogènes alimentaires [72], cette technologie a retenu l'attention de la communauté scientifique pour des applications à visée médicales et notamment dans un cadre humanitaire. La Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND) a collaboré avec la société Eiken® afin de mettre au point des méthodes utilisables sur le terrain pour le diagnostic de la tuberculose (TB-LAMP - Eiken®), la trypanosomiase humaine Africaine (HAT-LAMP – Eiken®), le paludisme ou encore la maladie de Chagas [73]. La recherche d'agents du bioterrorisme et le diagnostic du VIH font partie des projets de cette collaboration [70].

Cette technologie présente plusieurs avantages par rapport à la PCR pour une utilisation sur le terrain. Le matériel nécessaire est d'abord moins coûteux car il s'agit d'une réaction à température constante ; un simple bloc chauffant suffit pour la réaliser [74] et la formation à son utilisation ne nécessite que quelques jours [73]. Par ailleurs, l'amplification est généralement rapide (moins d'une heure) et la détection des amplicons peut être visualisée à l'oeil nu en utilisant un fluorophore tel que le SYBR® Green I [75], ou en mettant en évidence la production de pyrophosphate lors de l'amplification [76]. Enfin, cette technologie semble moins sensible aux substances biologiques inhibant habituellement la PCR : elle pourrait ainsi être utilisée « au lit du malade » sans extraction et purification préalable de l'ADN [77]. Ces différents aspects rendent la technologie LAMP particulièrement attractive pour une utilisation en milieu rural dans les pays défavorisés, où les conditions de réalisation de la PCR ne peuvent être remplies [73].

Actuellement, une dizaine de sociétés commercialisent des kits basés sur la technologie LAMP, pour la détection de micro-organismes pathogènes bactériens, viraux ou parasitaires ; d'autres applications telles que la recherche de mutations oncogènes, ou le dépistage de métastases dans les tumeurs solides sont en développement [78].

ii. Spécificités de la technologie LAMP

ADN Polymérase

L'ADN polymérase *Bst* utilisée au cours de cette réaction présente une « activité de déplacement de brin » [76] : lors de la polymérisation, cette enzyme a la capacité de séparer les brins d'ADN appariés tels que l'ADN bicaténaire ou les structures secondaires en épingles à cheveux. L'utilisation de ce type d'enzyme permet de travailler à température constante en s'affranchissant de l'étape de dénaturation de l'ADN par chauffage. L'utilisation des cycles de température (chauffage / refroidissement) n'étant plus nécessaire, un bloc chauffant à la température souhaitée suffit pour effectuer la réaction.

L'amplification du gène cible et sa détection peuvent être effectuées au cours de la même réaction. La LAMP permet une amplification de l'ADN cible jusqu'à 10^9 fois en moins d'une heure [74].

Amorces

Cette technologie est caractérisée par l'utilisation de quatre amorces reconnaissant six régions distinctes sur le gène cible. Cela lui confère une haute spécificité. On distingue une paire d'amorces « internes » (Inner primers) et une paire d'amorces « externes » (Outer primers), encadrant la région d'ADN cible. Chaque paire est composée d'une amorce sens (Forward primer) et d'une amorce anti-sens (Backward primer).

Le design de ces amorces comporte quelques contraintes :

- la distance séparant l'amorce interne et l'amorce externe sur le même brin ne doit pas excéder 20 paires de bases,
- la séquence cible sur le gène doit comporter entre 120 et 180 paires de bases [79].

Pour une meilleure compréhension, 6 régions distinctes sont désignées sur l'ADN cible, dénommées F3c, F2c, F1c, B1, B2, B3 en partant de l'extrémité 3'. L'indice « c » signifie qu'il s'agit d'une séquence complémentaire : par exemple, la région F1c est complémentaire de F1 (Fig. 15).



Figure 15: Schéma du gène cible et des différentes régions ciblées au cours de l'amplification

Dans notre exemple, les amorces utilisées sont les suivantes :

- Amorce interne sens (Forward Inner Primer - FIP) comportant
 - A l'extrémité 3' : la région F2 complémentaire de la région F2c
 - A l'extrémité 5' : la même séquence que la région F1c
- Amorce externe sens (Forward Outer Primer - F3) constituée de la région F3, complémentaire de la région F3c
- Amorce interne anti-sens (Backward Inner Primer - BIP) comportant
 - A l'extrémité 3' : la région B2, complémentaire de la région B2c
 - A l'extrémité 5' : la même séquence que la région B1c
- Amorce externe anti-sens (Backward Outer Primer - B3) constituée de la région B3, complémentaire de la région B3c

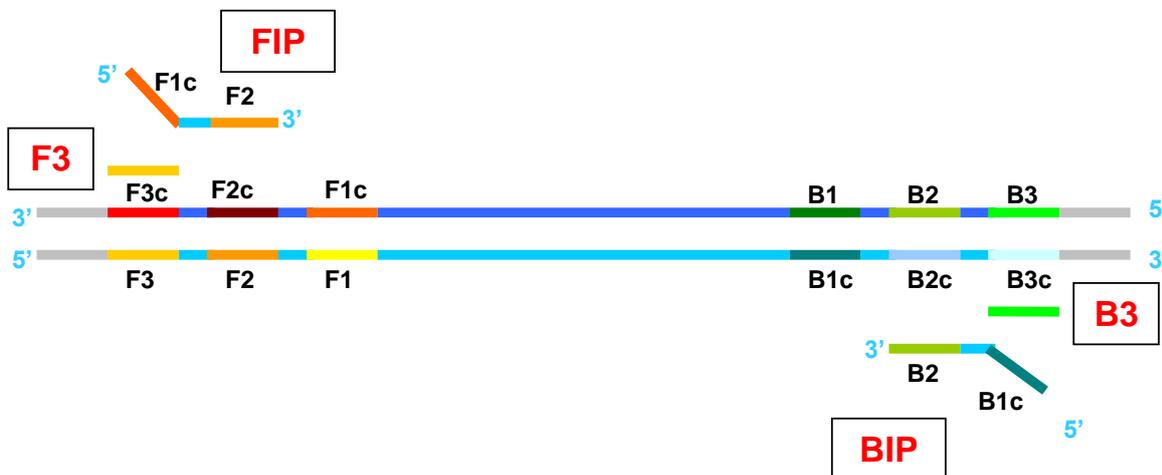


Figure 16: Gène cible et amorces utilisées pour la réaction LAMP

iii. Déroulement de la réaction LAMP [80]

La réaction LAMP comporte deux grandes étapes. La première consiste à produire une structure de départ ressemblant à une haltère : le gène cible va être amplifié par l'ADN

polymérase successivement à partir des amorces sens, puis anti-sens et, par complémentarité de séquences, des boucles d'auto-appariement vont se former à chaque extrémité du produit d'amplification (Fig. 17).



Figure 17: structure en haltère - base de l'amplification cyclique

Cette structure va servir de matrice pour la deuxième étape de la réaction : l'amplification cyclique. L'ADN polymérase va, à partir de la structure en haltère et des amorces internes, amplifier des fragments de gène cible de taille de plus en plus importante, tout en renouvelant en permanence cette structure de base.

Formation de la structure de départ

Amplification à partir des amorces sens

La première amplification de la réaction LAMP est présentée dans la figure 18 ; les différentes étapes seront détaillées ci-dessous. L'ADN cible dénaturé par chauffage à 95°C est ajouté au milieu réactionnel comprenant l'ADN polymérase *Bst* et ses substrats (nucléotides triphosphate) ainsi que les amorces et sondes spécifiques du gène recherché. Ce milieu est incubé à une température constante comprise entre 60 et 65°C pendant 15 minutes à une heure [81].

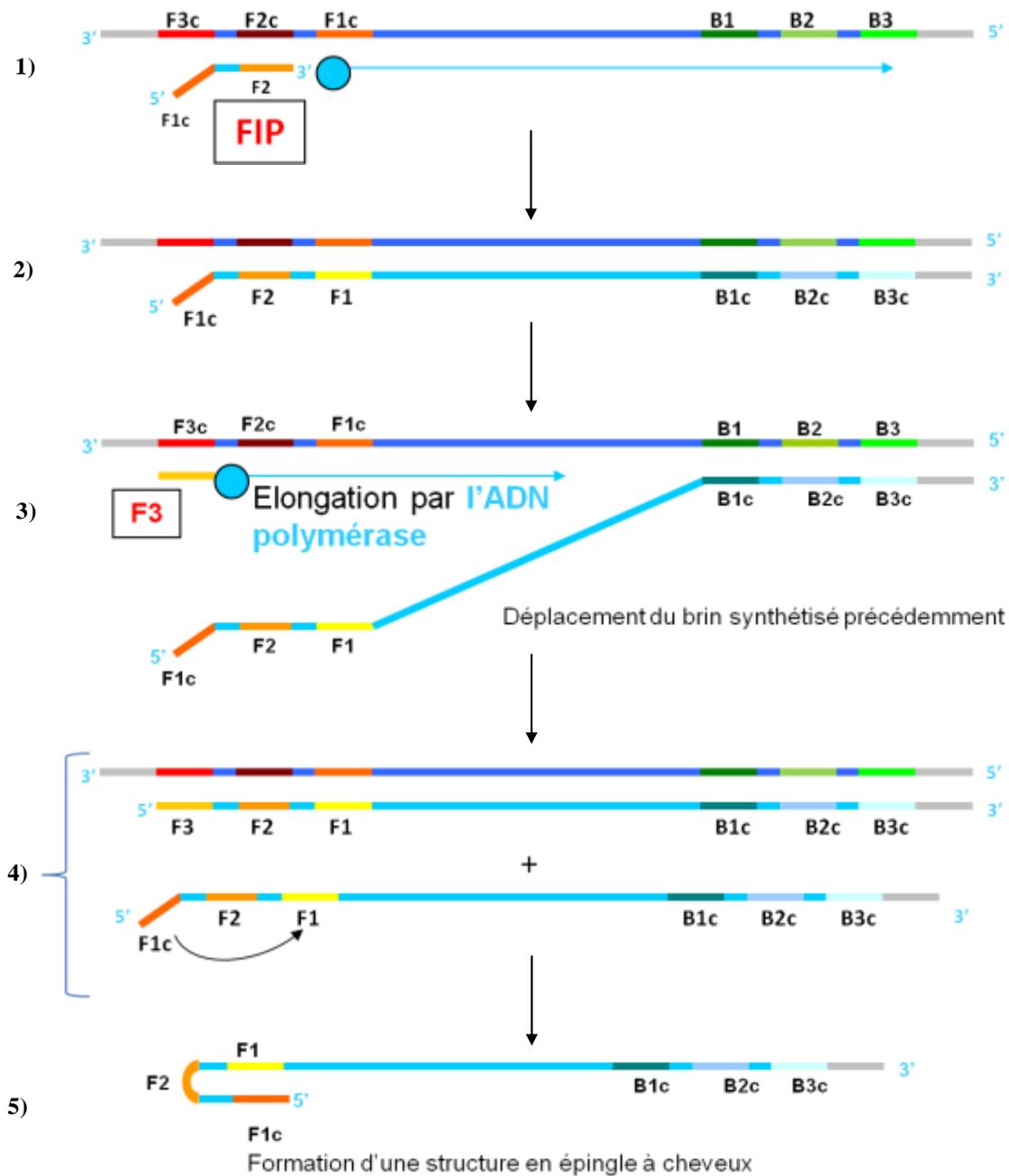


Figure 18: Amplification à partir des amorces sens

- 1) L'ADN polymérase amplifie la séquence complémentaire du gène cible à partir de l'amorce interne sens FIP ;
- 2) Le produit de cette élongation est un ADN bicaténaire comportant le brin matrice et le brin néo-synthétisé ;
- 3) L'amorce externe F3 s'apparie avec sa séquence complémentaire F3c en amont de FIP. L'ADN polymérase synthétise la séquence complémentaire de l'ADN cible à partir de F3. Au cours de cette élongation, l'enzyme déplace le fragment synthétisé lors de l'étape 1) grâce à son activité de « déplacement de brin » ;

- 4) Les produits de l'étape 3) sont un ADN bicaténaire, formé du brin matrice et du produit d'élongation à partir de F3, ainsi qu'un ADN simple-brin déplacé lors de l'élongation à partir de F3 ;
- 5) Cet ADN simple-brin est le produit d'amplification de l'étape 1) à partir de l'amorce interne FIP. Cette amorce comprend une région F1c complémentaire de celle de l'ADN amplifié (F1). Ces deux régions complémentaires vont s'apparier, et cet auto-appariement du brin forme une structure en épingle à cheveux.

Amplification à partir des amorces anti-sens

Les amorces anti-sens (Backward) vont s'apparier à l'autre extrémité de la structure en épingle à cheveux et l'ADN polymérase va amplifier la séquence complémentaire de la structure 5) selon la même logique que décrite ci-dessus (hybridation – amplification – déplacement) à partir de l'amorce interne BIP puis de l'amorce externe B3 (Fig. 19).

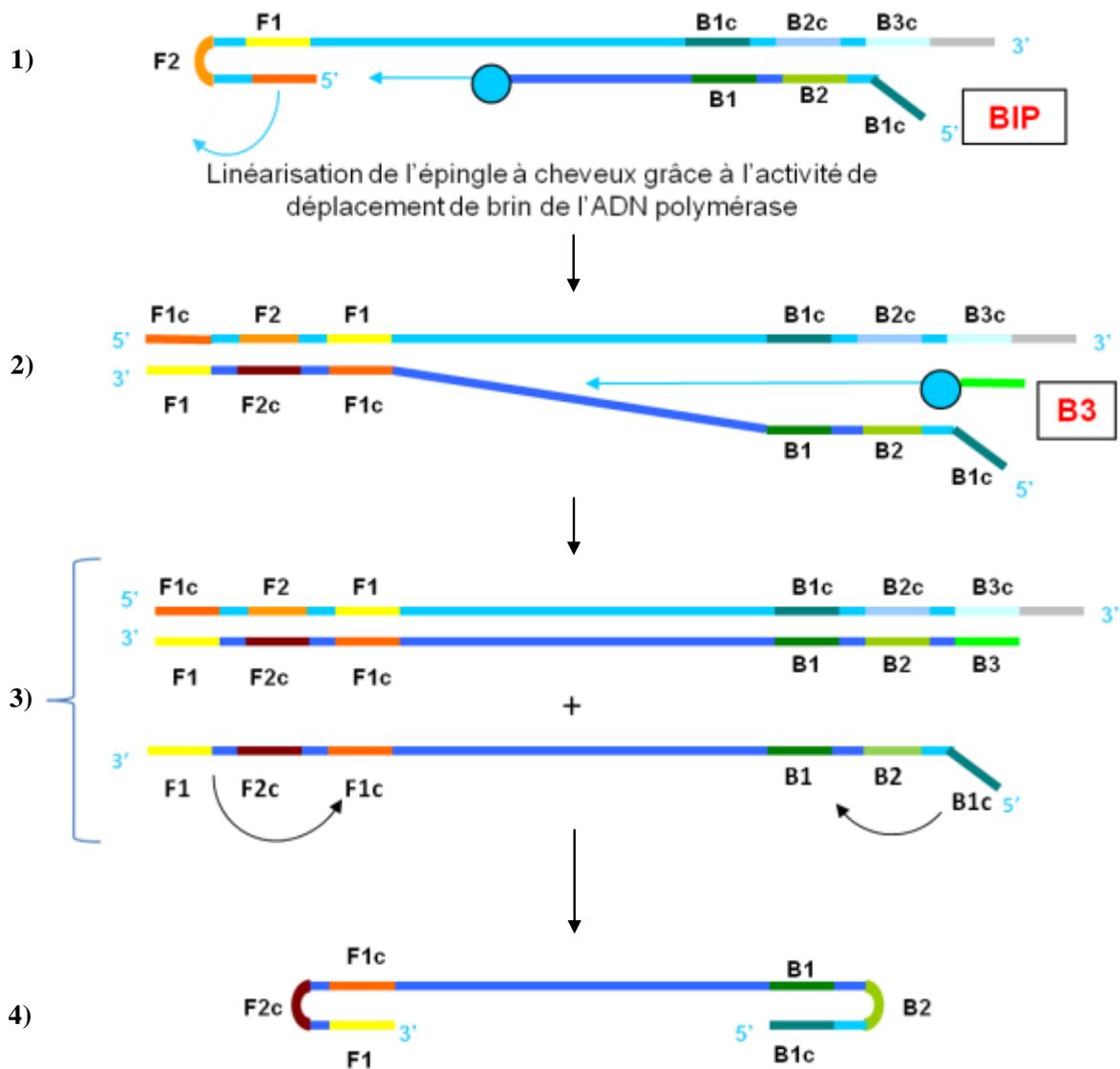


Figure 19: Amplification à partir des amorces anti-sens et formation de la structure en haltère

- 1) L'ADN polymérase synthétise la séquence complémentaire du brin d'ADN monocaténaire après fixation de l'amorce interne anti-sens BIP à l'extrémité opposée de la boucle. L'enzyme linéarise la structure en épingle à cheveux au cours de cette amplification grâce à son activité de déplacement de brin ;
- 2) L'amorce B3 s'hybride à sa séquence complémentaire B3c en amont de BIP ; l'enzyme synthétise alors le brin complémentaire en déplaçant le brin précédemment synthétisé ;
- 3) On obtient ainsi un ADN bicaténaire ainsi que le brin d'ADN déplacé ;
- 4) Ce dernier présente des séquences complémentaires à chaque extrémité (F1/F1c et B1/B1c). L'auto-appariement de ces séquences va former la structure en haltère, point de départ de la deuxième grande étape de la réaction LAMP : l'amplification cyclique.

La première partie de la réaction LAMP est présentée dans la figure 20.

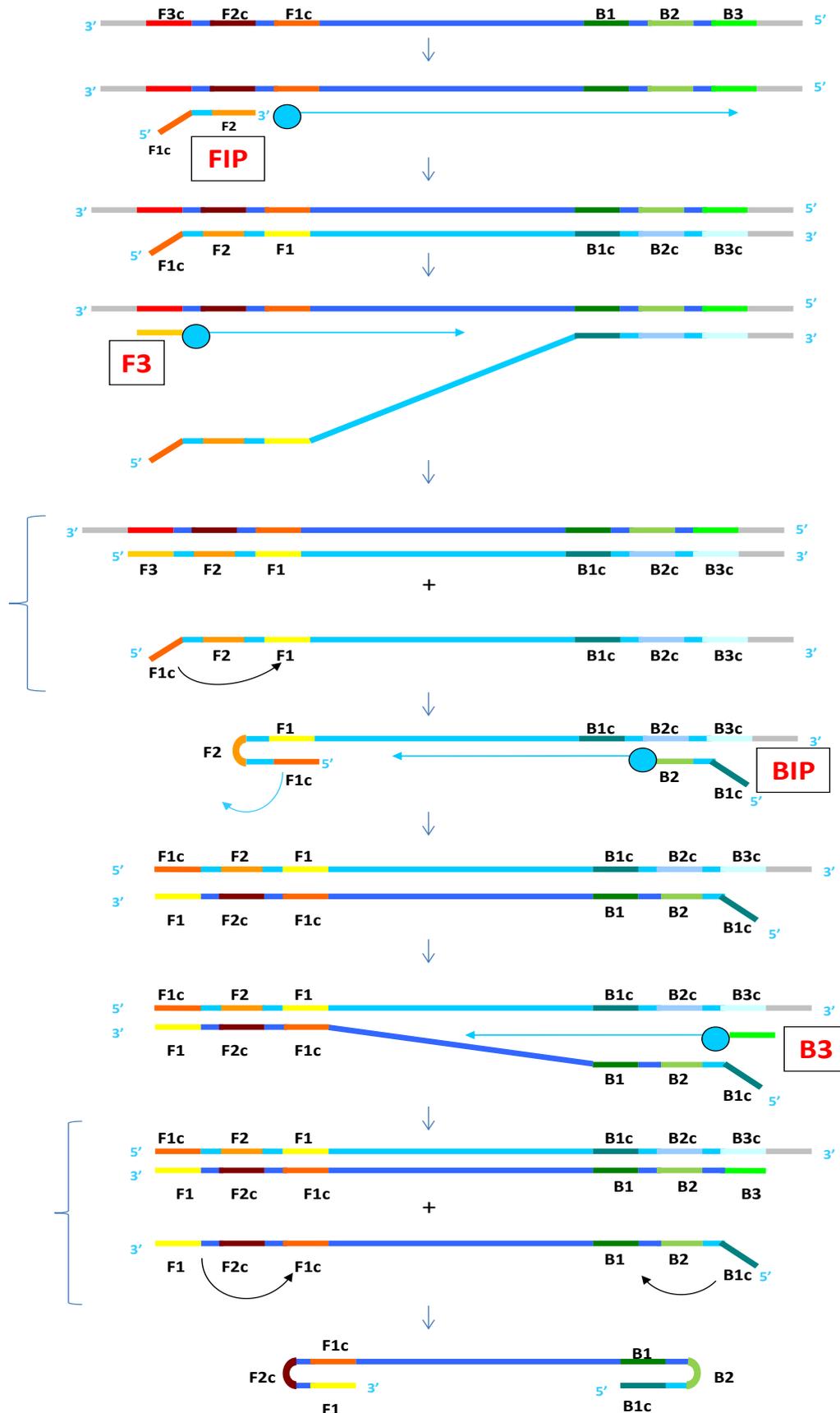


Figure 20: Formation de la structure de base de la deuxième étape de la réaction LAMP à partir d'un brin d'ADN monocaténaire

Deuxième partie de la réaction LAMP: Amplification cyclique

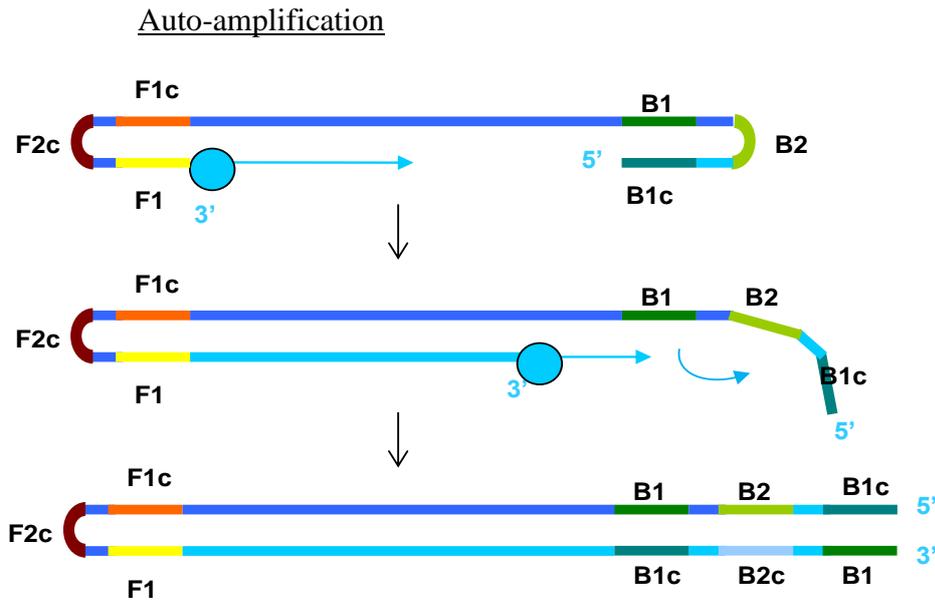


Figure 21: Conversion de la structure en haltère en ADN bicaténaire avec une épingle à cheveux unique

La structure en haltère est rapidement convertie en un brin d'ADN bicaténaire comportant une structure en épingle à cheveux unique (Fig. 21): à partir de l'extrémité 3' de la boucle d'auto-appariement, l'ADN polymérase utilise la structure en tant que matrice et synthétise le fragment d'ADN complémentaire. Grâce à l'activité de déplacement de brin, l'enzyme linéarise la structure en épingle à cheveux à l'autre extrémité.

Amplification à partir d'une amorce interne

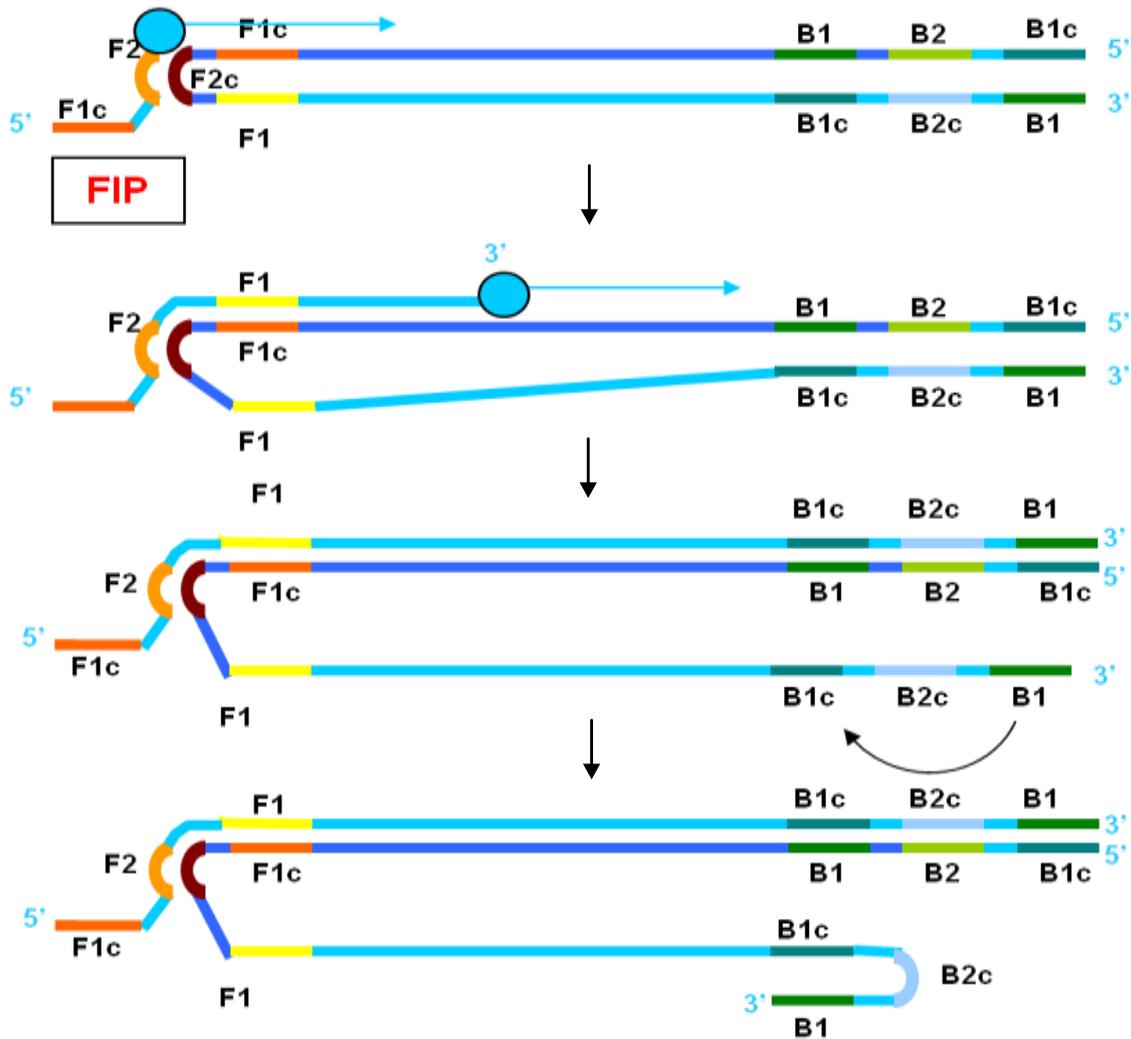


Figure 22: Amplification à partir de FIP

Au niveau de l'épingle à cheveux, la région F2c n'est appariée avec aucune séquence complémentaire. FIP s'apparie à cette région monocaténaire et amorce la synthèse d'ADN en déplaçant le brin synthétisé lors de l'étape précédente. Celui-ci va former une boucle en épingle à cheveux à son extrémité 3' par auto-appariement des régions complémentaires B1c et B1 (Fig. 22).

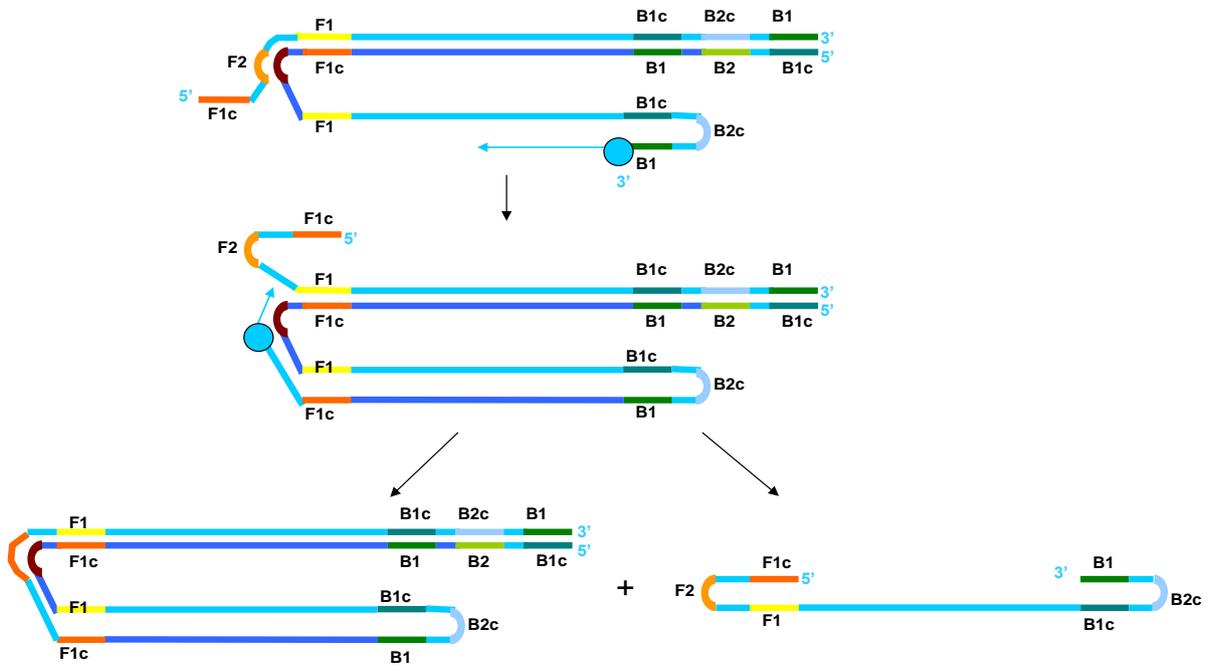


Figure 23: Auto-amplification et déplacement du brin synthétisé à partir de FIP

A partir de l'extrémité 3' de cette boucle, l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de la structure, en déplaçant le brin synthétisé à partir de FIP. Ce brin est ainsi libéré en tant que simple-brin et redonne une structure en haltère; il s'agit de la séquence complémentaire de celle de la structure de départ (Fig. 23).

On obtient ainsi une structure en haltère ainsi qu'un brin d'ADN bicaténaire. Ces deux produits d'amplification vont être utilisés pour continuer la réaction d'amplification.

Renouvellement de la structure en haltère

La structure en haltère est le pivot de la réaction d'amplification génique : la séquence cible sera alternativement amplifiée par l'amorce sens puis anti-sens, permettant en permanence le renouvellement de cette structure. Comme décrit dans la figure 24, l'amplification à partir de l'amorce anti-sens renouvelle la structure issue de la première étape de la LAMP.

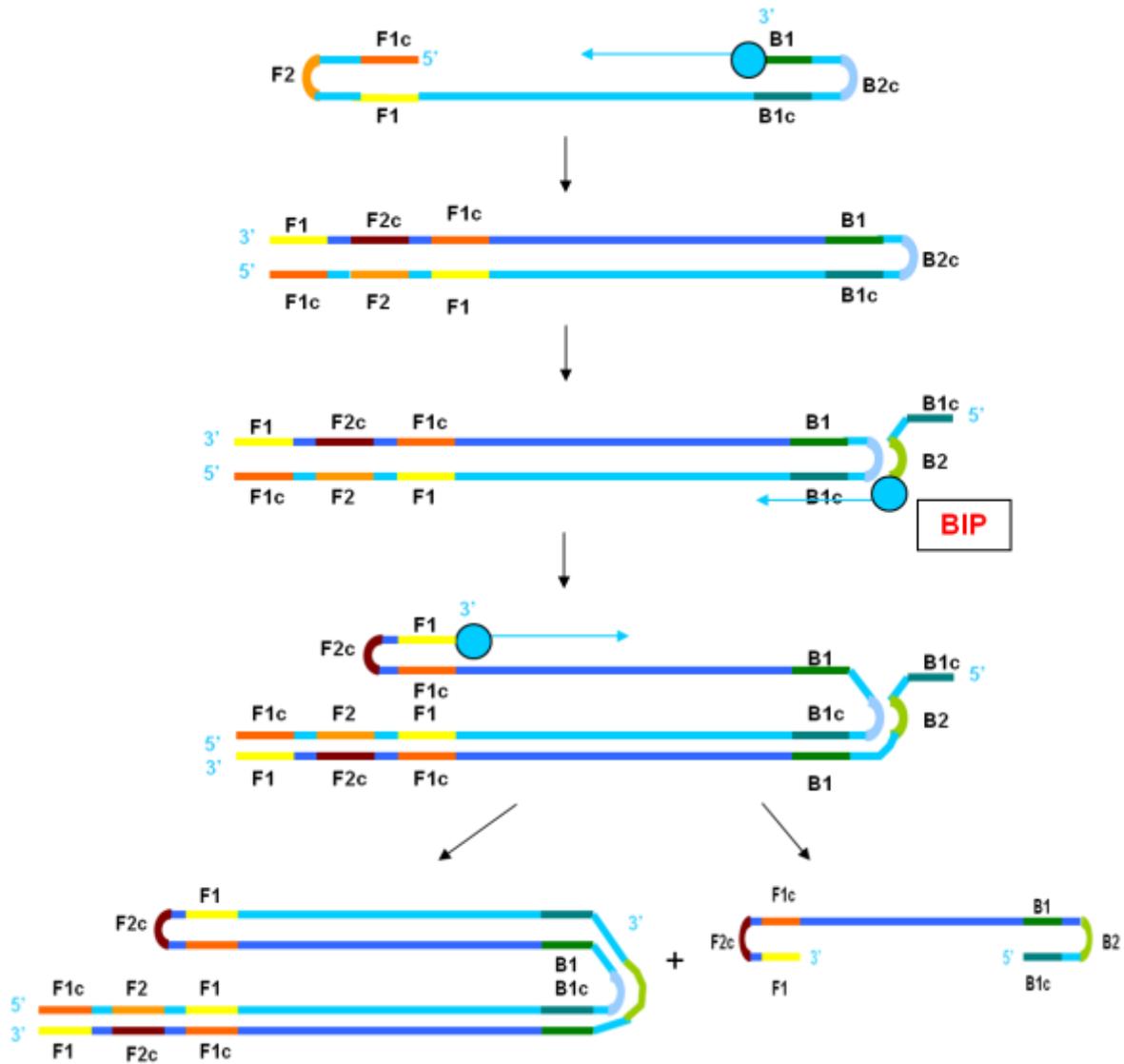


Figure 24: Amplification à partir de la structure en haltère résultant de la première étape de l'amplification cyclique

Amplification à partir du brin d'ADN bicaténaire

A partir de l'ADN bicaténaire résultant de l'amplification cyclique, l'amorce interne et la région monocaténaire de la boucle s'apparient. Un nouveau cycle d'amplification démarre de ce point, permettant la formation d'amplicons de longueurs croissantes, constitués de répétitions des séquences amplifiées alternativement complémentaires (Fig. 25).

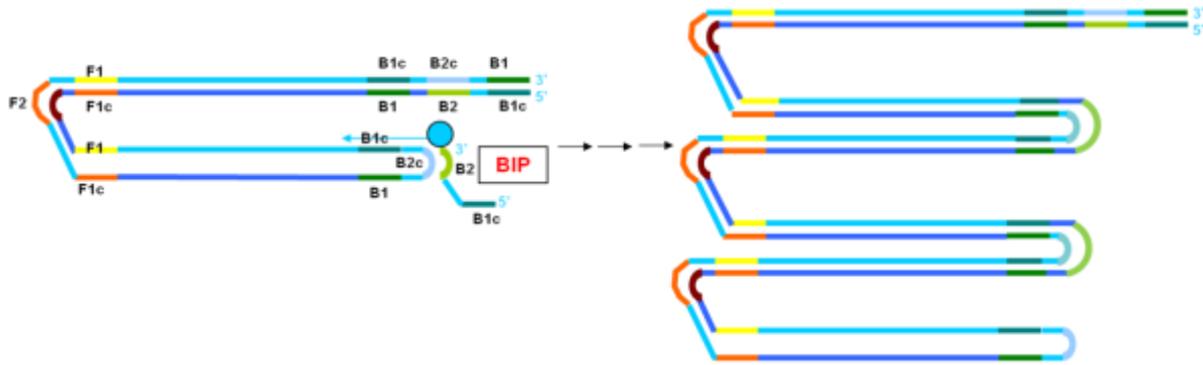


Figure 25: Amplification à partir de l'ADN bicaténaire issu de l'amplification cyclique

Ces différents foyers d'amplification confèrent à la technologie LAMP une haute efficacité et une puissance d'amplification remarquable.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le travail présenté ci-après a été réalisé au laboratoire de virologie du CHRU de Lille entre juin et septembre 2013. Il avait pour buts d'évaluer les performances et la facilité d'utilisation de l'extracteur *LIAISON® Ixt* (DiaSorin) en association avec le kit Arrow Viral NA (DiaSorin) pour différents types d'échantillons, et du kit commercial Iam VZV® (DiaSorin) pour la détection du génome du VZV par la technologie LAMP en association avec l'automate *LIAISON® Iam* (DiaSorin).

Ce kit a été comparé au kit commercial VZV R-Gene™ (Argène), basé sur la PCR en temps réel, et les résultats obtenus ont été comparés à ceux rendus par la méthode de PCR en temps réel utilisée auparavant au laboratoire.

MATERIELS ET METHODES

I. Souches virales, échantillons biologiques et contrôles

La période de collection des échantillons positifs s'est étalée entre janvier 2011 et juin 2013. Les échantillons négatifs dataient de l'année 2012. Tous ces échantillons « fond de tube » ont été conservés à -20°C avant extraction.

A. LCR

Des échantillons de LCR adressés au laboratoire pour la détection du VZV par PCR ont été utilisés : 22 LCR testés positifs et 14 LCR testés négatifs par la PCR maison ont été extraits. Dix des prélèvements testés positifs étaient en quantité suffisante pour une extraction en parallèle avec les deux techniques (250µl utilisés pour chaque méthode) ; les 12 autres ont dû être dilués dans de l'eau RNase-free en fonction du volume initial avant d'être extraits. La dilution influant sur le seuil de détection des méthodes, ce facteur a été pris en compte pour l'interprétation des résultats. Les principaux services demandeurs étaient le service de neurologie du CHRU de Lille (Pr. Vermersch) et des hôpitaux extérieurs au CHRU.

Les LCR testés négatifs sélectionnés étaient en volume suffisant pour procéder à l'extraction. La répartition des LCR est présentée dans le tableau 3.

	LCR positifs	LCR négatifs
Non-dilués	10	14
Dilués	12	0
Total	22	14

Tableau 3: Répartition des LCR selon la nécessité d'une dilution préalablement à l'extraction
(Résultats obtenus avec la PCR « maison »)

B. Vésicules et prélèvements cutanés

Trente et un prélèvements cutanés, ou issus d'écouvillonnage de vésicules, testés positifs pour le VZV ont été extraits ainsi que 15 prélèvements testés négatifs. Les principaux services demandeurs de la recherche du VZV par biologie moléculaire étaient le service de dermatologie du CHRU de Lille (Pr. Delaporte) et les hôpitaux extérieurs au CHRU (Tourcoing, Armentières, Boulogne ...).

C. Souches virales

Deux souches de VZV ont été isolées à partir de prélèvements de vésicules et mises en culture. La présence du VZV avait été confirmée dans les deux prélèvements par la technique

de PCR maison. Une de ces souches était conservée à -80°C, l'autre a été isolée à partir d'une vésicule au cours de l'étude.

D. Culture cellulaire du VZV

Les deux souches virales ont été cultivées sur des cellules embryonnaires de poumons humains (cellules MRC5). Il s'agit de la lignée cellulaire la plus permissive pour la culture du VZV. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère enrichie de 5% de CO₂ dans du milieu « Minimum Essential Medium » (MEM) additionné de 2% de Sérum de Veau Foetal (SVF) décomplémenté.

Les souches de VZV ont été mises au contact des cellules lorsque celles-ci n'étaient pas encore confluentes afin d'utiliser leur potentiel réplcatif pour la multiplication virale. Le virus en culture a été entraîné par trypsination des cellules pendant 4 semaines entre mai et juin 2013 : la trypsine est une enzyme hydrolysant les liaisons peptidiques permettant l'adhésion du tapis cellulaire au support, ainsi qu'entre les cellules. L'action de la trypsine permet le décollement du tapis cellulaire, qui sera ensuite dilué et repiqué dans une nouvelle flasque pour permettre la multiplication cellulaire.

Lorsque les cellules MRC5 sont arrivées à confluence, le milieu de culture a été éliminé, puis le tapis cellulaire a été rincé avec un faible volume de trypsine VersenTM. Après rinçage, les cellules ont été incubées pendant 10 minutes à 37°C avec 1 ml de trypsine. Suite à ce traitement, les cellules trypsinées ont été remises en suspension dans 10 ml de MEM à 10% de SVF, inhibiteur de l'activité enzymatique de la trypsine, avant d'être ré-ensemencées sur un tapis cellulaire de cellules MRC5 saines.

Pour récupérer le virus cultivé, les flacons de cellules infectées présentant 50% d'effet cytopathique (ECP) ont été congelés à -20°C, puis décongelés quelques jours plus tard afin de provoquer un choc osmotique induisant une lyse des cellules. Ce lysat a été remis en suspension dans le milieu de culture, puis dilué en série dans de l'eau RNase-free, avant d'être extrait de la même manière que les échantillons d'origine humaine (Fig. 26). Ces extraits ont été utilisés pour la prise en main des deux méthodes et pour servir d'échantillons positifs pour les premiers essais.

E. Contrôles de qualité

1. Contrôle calibré Acrometrix®

Un contrôle de qualité calibré à 10^5 copies/ml de VZV (Acrometrix® - Annexe 3) a été dilué par entraînement dans de l'eau RNase-free jusqu'à une concentration de 10 copies/ml. Le contrôle et les dilutions ont été conservés à -20°C .

2. QCMD

Les Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) de l'année 2013 pour le VZV ont été extraits et testés avec les deux méthodes. Ce contrôle de qualité est constitué de 10 échantillons, présentant des charges virales variées et négatives. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus au niveau national par les laboratoires participants.

Les résultats de ce contrôle sont consultables sur le site internet:

<http://www.qcmd.org/index.php?pageId=32&pageVersion=FR>

II. Extraction des acides nucléiques

Pour extraire l'ADN des prélèvements, l'extracteur automatisé *LIAISON® Ixt* (DiaSorin) a été utilisé avec le kit Arrow Viral NA (DiaSorin). Ce système repose sur la technologie des billes magnétiques pour isoler et purifier les acides nucléiques viraux.

Les échantillons ont été aliquotés en 2 fois 250µl, auxquels ont été ajoutés 10 µl de protéinase K à 20 mg/ml (Qiagen) et le contrôle interne (IC) correspondant à la méthode d'amplification à laquelle était soumis l'extrait obtenu (Fig. 26). Ce mélange a ensuite été placé dans l'automate *LIAISON® Ixt* (Fig. 27) en suivant les recommandations du fabricant : après assemblage manuel des pompes et des cônes (Fig. 28), ce montage a été installé sur un bras mécanique qui, en exerçant une pression sur la pompe, permet le pipetage des échantillons, des réactifs, puis de l'éluat. La cartouche contenant les réactifs nécessaires à l'extraction a été installée dans l'automate avant de placer le tube d'échantillon à extraire, puis le tube pour récupérer l'extrait (Fig. 29). Le chargement de l'automate dans cet ordre permet de limiter le risque de contamination au cours de l'extraction (Annexe 4).

L'extraction automatisée procède par une lyse des cellules de l'échantillon par le tampon de lyse (thiocyanate de guanidine, solution saline, détergent), suivie d'une capture des acides nucléiques (AN) par des billes magnétiques de silice. Ces billes sont lavées à plusieurs

reprises avant d'être remises en suspension dans le tampon d'éluion. Le relargage des acides nucléiques dans le tampon d'éluion s'effectue sur l'instrument lors d'une incubation à 70°C pendant 3 min. Les billes sont éliminées de l'éluat grâce à un aimant alors que 100 µl d'extrait sont transférés dans le tube d'éluion.

Deux cents cinquante microlitres d'échantillon sont extraits et élués dans un volume de 100 µl pour chaque méthode d'amplification. Les éluats ont ensuite été congelés à -20°C avant d'être testés. Ces extraits peuvent être conservés à 4°C pendant 24h ou être congelés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

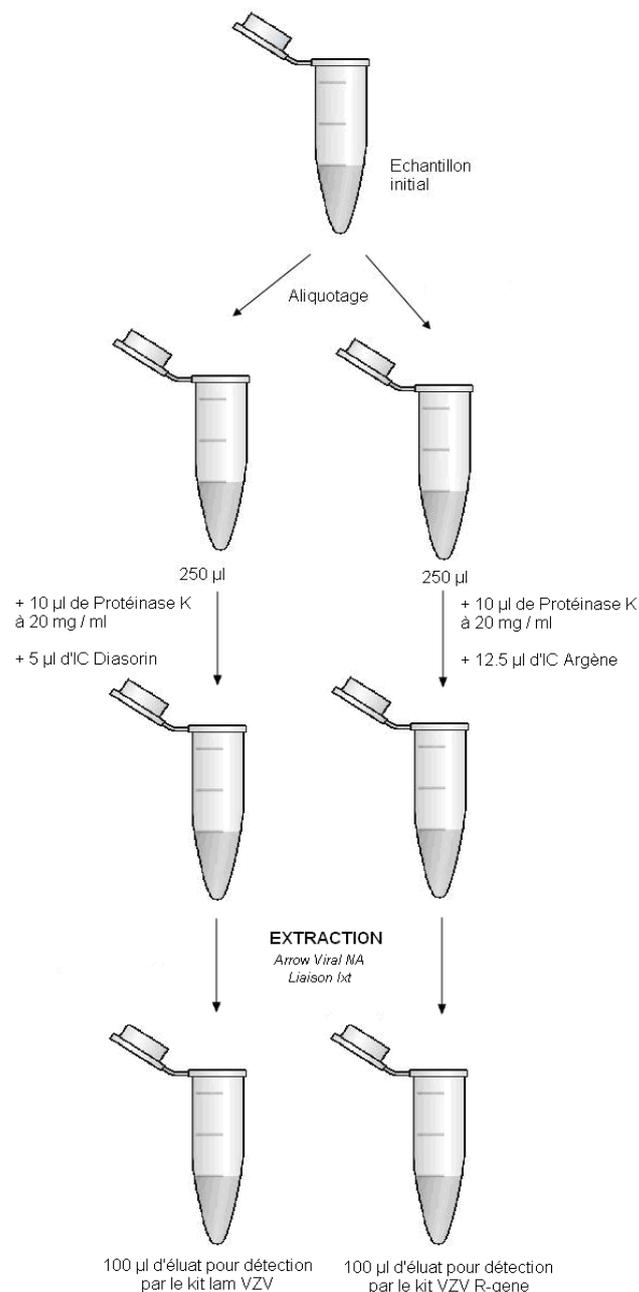


Figure 26: Extraction à partir des échantillons initiaux



Figure 27: Extracteur automatisé *LIAISON® Ixt*

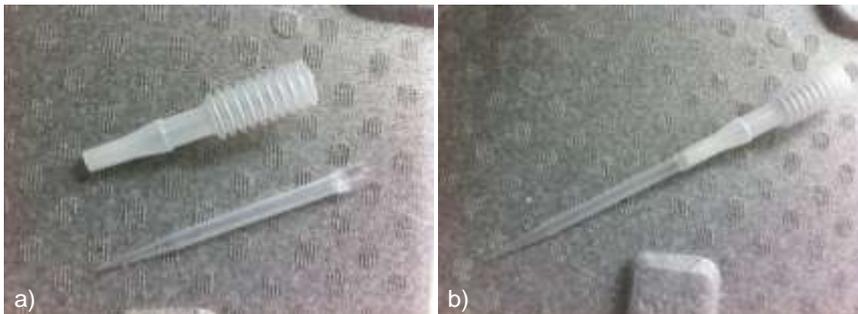


Figure 28: Pompes et cônes de pipetage

a) Pompe et cône séparés – b) pompes et cônes prêts à être installés sur le *Liaison® Ixt*

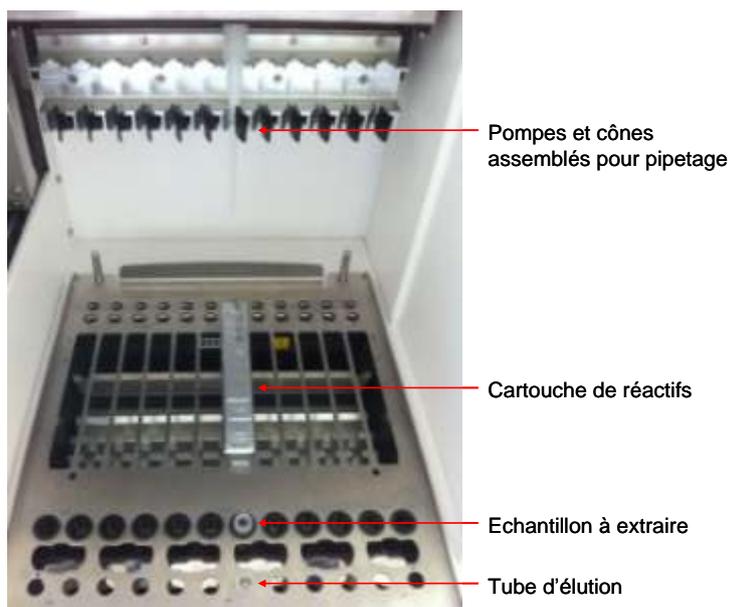


Figure 29: Montage du *LIAISON® Ixt*

III. Dosage des acides nucléiques totaux

Suite à l'extraction avec le *LIAISON® Ixt*, la concentration en acides nucléiques totaux a été déterminée par spectrométrie UV au Nanodrop ND 1000® (Thermo Scientific) afin d'évaluer la qualité des extraits passés en parallèle sur les deux méthodes de détection. La concentration en acides nucléiques dans les extraits a été mesurée à 260 nm et chaque mesure a été réalisée en triplicat. La concentration retenue est la moyenne de ces trois mesures.

IV. Métrologie du bloc chauffant

Avant amplification avec le kit Iam VZV (DiaSorin), les acides nucléiques extraits doivent subir une dénaturation par chauffage à 95°C pendant 5 minutes dans un bloc chauffant. Pour vérifier la variation de température au sein de l'échantillon, une sonde étalonnée a été introduite dans un eppendorf contenant de l'huile et placé dans le bloc chauffant.

V. Méthodes d'amplification

Deux des méthodes d'amplification du génome du VZV présentées ci-dessous reposent sur le principe de PCR en temps réel : le kit VZV R-Gene™ (Argène) et la PCR maison. Le kit Iam VZV (DiaSorin) repose sur la technologie LAMP en temps réel.

A. VZV R-gene™ (Argène)

1. Caractéristiques du kit

Le kit VZV R-gene™ amplifie un fragment de 114 paires de bases, ciblant le gène de la gp19 (tegument host shutoff protein) du VZV [82, 83]. Il comporte aussi les amorces et sondes permettant l'amplification et la détection du contrôle interne d'extraction et d'amplification IC₂.

Le mélange réactionnel est constitué des éléments suivants :

- Didéoxynucléotides
- Chlorure de Magnésium MgCl₂
- Tampon d'amplification
- Amorces et sondes pour la détection du VZV et d'IC₂
- Taq polymérase

Chaque série lancée avec ce kit comprenait, en plus des extraits à tester,

- un témoin positif (PC) : extrait d'une dilution au 1/100^{ème} d'un contrôle calibré à 10⁵ copies d'ADN de VZV/ml (Acrometrix®)
- un témoin négatif (W₀) : extrait d'un mélange d'eau RNase-free (250 µl) et d'IC₂ (12,5 µl)

Un bactériophage encapsidé est utilisé comme contrôle interne (IC₂) et ajouté à l'échantillon avant l'extraction ; son amplification et sa détection serviront à prouver que l'échantillon a été extrait correctement et à valider l'absence d'inhibiteurs de la Taq polymérase. Le principe de détection de l'amplification du contrôle interne repose également sur la technologie des sondes 5'nucléase. La fluorescence correspondant à l'amplification du génome viral et celle correspondant à l'amplification du contrôle interne sont mesurées à deux longueurs d'onde distinctes, ce qui permet de les détecter dans le même puits réactionnel.

Le flacon de mélange réactionnel VZV R-gèneTM prêt à l'emploi est décongelé en pièce de préparation des réactifs de PCR. Quinze microlitres sont déposés dans les puits d'une plaque 96 puits, puis 10 µl d'extrait ou de contrôle sont ajoutés. Après avoir placé un film de protection sur la plaque, l'amplification est lancée sur un thermocycleur préalablement programmé. L'appareil utilisé pour les tests avec ce kit était un thermocycleur ABI 7500 de Applied Biosystems (ABI) et les courbes ont été interprétées avec le logiciel 7500 software (Version 2.0.6 – ABI – cf annexe 5).

Le programme de l'AB 7500 pour le kit VZV R-GeneTM est le suivant : (Fig. 30)

- Dénaturation : 15 minutes à 95°C
- 45 cycles d'amplification comportant
 - o 10 secondes à 95°C (dénaturation)
 - o 40 secondes à 60°C (hybridation / élongation)

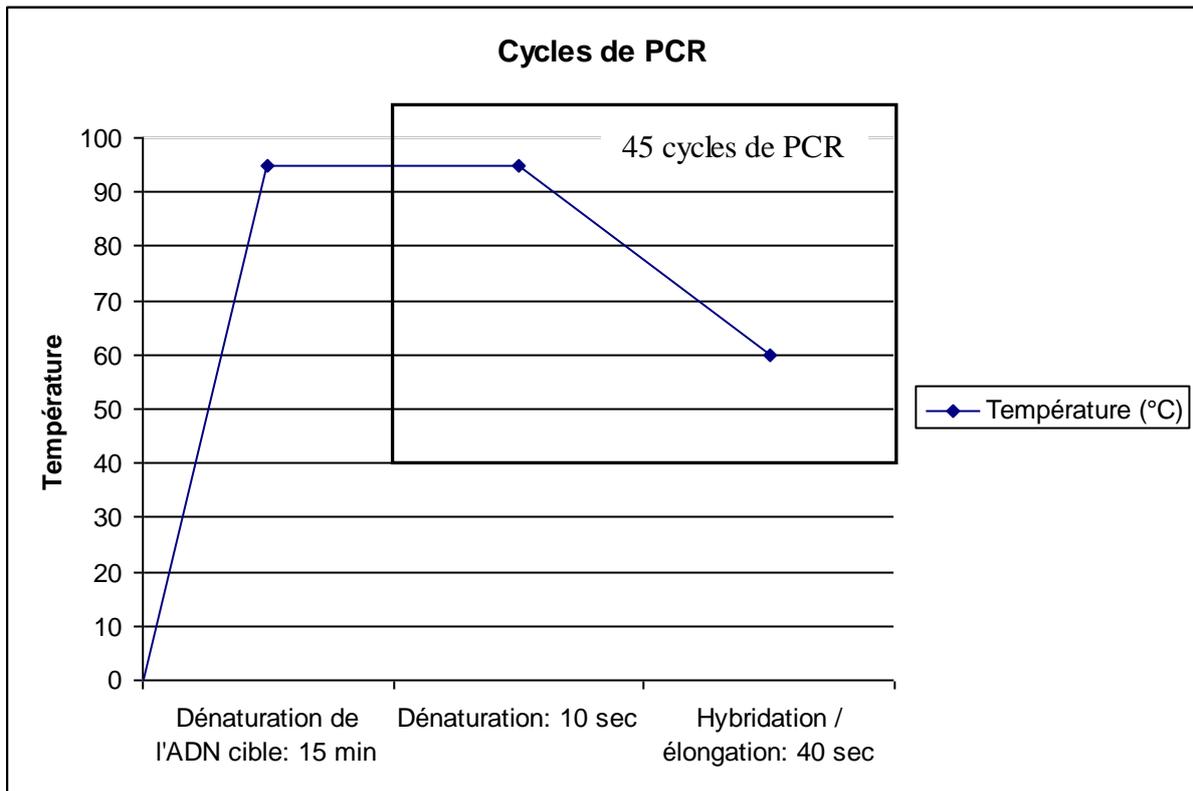


Figure 30: Cycles de température programmés pour la détection du VZV par le kit VZV R-Gene™

Le tube-mère de mélange réactionnel Argène est recongelé à -20°C et peut subir jusqu'à 6 autres cycles de décongélation / re-congélation.

2. Interprétation des courbes de fluorescence

Pour la détection du génome du VZV, le seuil de fluorescence (threshold) à partir duquel la cible est testée positive est déterminé à partir de l'amplification du contrôle positif (PC). Le threshold pour le contrôle interne IC₂ est déterminé à partir de la courbe d'amplification de IC₂ pour le test du témoin négatif W₀ (Fig. 31).

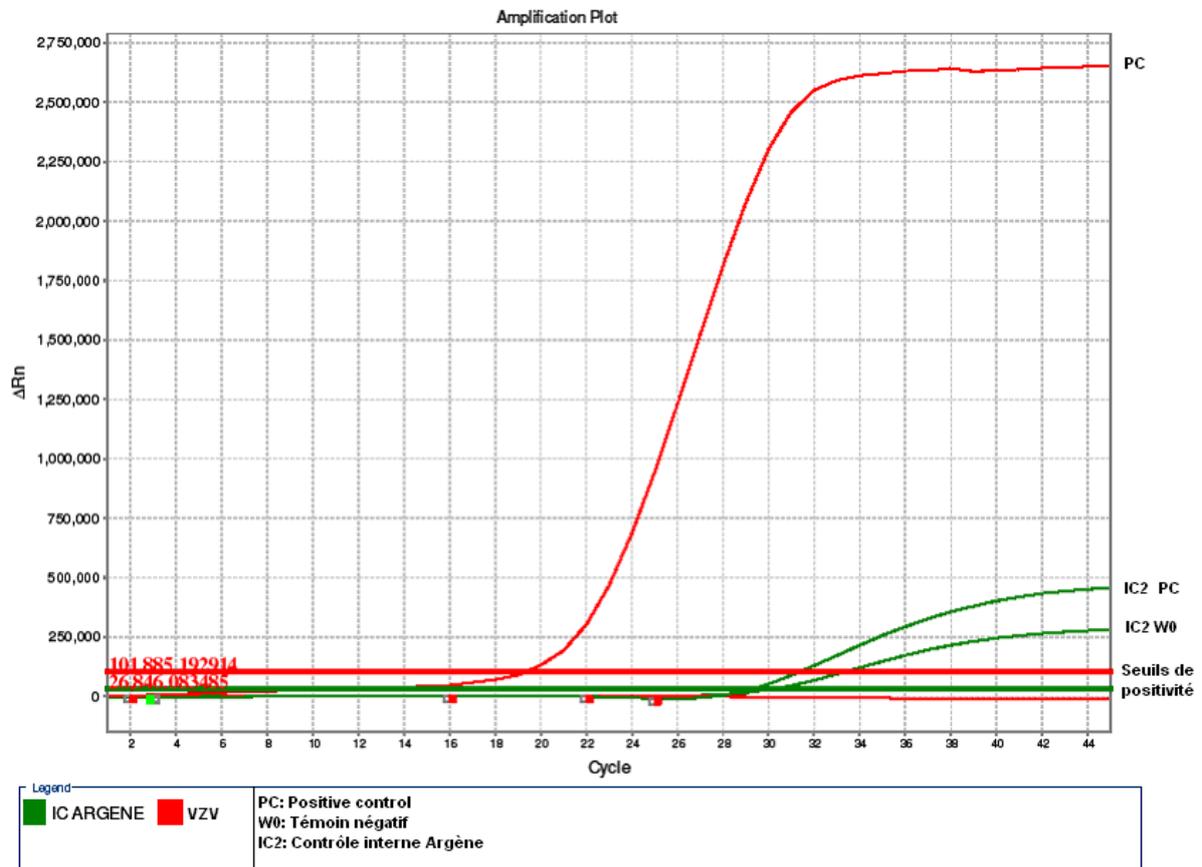


Figure 31: Courbes de PCR en temps réel – variation de fluorescence en fonction des cycles de PCR

Interprétation de la figure 31 :

- Contrôle positif (PC) : l'ADN du VZV est détecté avec un C_t faible (19,5), la concentration en ADN viral est donc importante
 - Contrôle négatif (W_0) : Absence de détection d'ADN viral
 - Contrôle interne IC_2 : Détecté pour les deux tests (IC_2 PC et IC_2 W_0)
- Le contrôle interne IC_2 pour le PC est détecté plus tardivement ($C_t = 29,5$) que l'ADN du VZV (19,5) ; la concentration en IC_2 est donc plus faible que celle de l'ADN du VZV pour cet extrait.

Le contrôle interne d'extraction et d'amplification IC_2 permet la recherche d'inhibiteurs de la Taq polymérase. Lors du test du témoin négatif W_0 , seul IC_2 doit être amplifié ; le C_t déterminé servira de référence pour la recherche d'inhibiteurs pour les échantillons testés dans la même série. Pour chaque échantillon, le C_t déterminé pour IC_2 doit présenter moins de 3 cycles d'écart avec celui du témoin négatif W_0 . Dans le cas contraire, on considère que la Taq polymérase a été inhibée et qu'il faut ré-extraire l'échantillon et relancer l'amplification.

B. PCR maison

Les échantillons ont été sélectionnés sur la base du résultat rendu par la technique maison de PCR en temps réel. Cette méthode de PCR en temps réel a pour cible le gène de la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase virale, amplifiant un fragment de 74 paires de bases [84].

Les séquences de la sonde et des amorces utilisées sont les suivantes :

- Amorce 1 - Tm = 54°C

GUARD 10 2561757: 5' gCA ggC ggC Agg CTT T 3'

- Amorce 2 - Tm = 54°C

GUARD 10 2561758: 5' CTT Cgg TgA TTT CAg CTT Cag 3'

- Sonde - Tm = 64°C

Taqman® 2561759: 5' (6-FAM) TgT ATA CAC gCC CCg CgC Tgg
(Tamra)(Phosphate) 3'

Elles avaient été fournies par la société Proligo™ (Sigma-Aldrich).

Le milieu réactionnel est constitué comme suit:

- MgCl₂ – 3 mM

- GUARD 10 2561757 – 250 nM

- GUARD 10 2561758 – 250 nM

- Taqman® 2561759 – 200 nM

Comme pour le kit VZV R-Gene™, les séries comportaient un témoin positif et un témoin négatif en plus des échantillons à tester.

Cette technique de PCR en temps réel était réalisée sur LightCycler 480 (Roche).

Le programme d'amplification était le suivant:

- Activation de l'UDG : 10 min à 50°C

- Dénaturation : 10 min à 95°C

- Amplification : 45 cycles

1- 10 secondes à 95°C

2- 45 secondes à 60°C - Acquisition de la fluorescence à ce niveau.

Par rapport à la PCR en temps réel programmée pour le kit VZV R-Gene™ (Argène), le programme comporte l'étape supplémentaire d'activation de l'UDG : il s'agit d'une enzyme hydrolysant les amplicons synthétisés au cours d'une PCR antérieure et qui auraient pu contaminer le milieu réactionnel. Cette enzyme est thermolabile et inactivée à 95°C, permettant le bon déroulement de la réaction de PCR par la suite.

Les résultats obtenus avec cette méthode reposent sur le même principe de détection que pour le kit VZV R-Gene™ (Argène). Cependant, l'amplification du contrôle interne IC₂ pour la recherche d'inhibiteurs ne peut être réalisée au cours de la même réaction et doit être réalisée séparément.

C. LIAISON® *Iam* VZV (DiaSorin)

Le matériel ainsi que les réactifs nécessaires aux tests réalisés avec ce kit commercial ont été gracieusement fournis par la société DiaSorin.

Cette méthode de diagnostic pour le VZV utilise la technologie Loop mediated isothermal AMPLification (LAMP) en temps réel, basée sur l'amplification du génome viral à température constante (entre 63°C et 65°C).

Les informations concernant le gène ciblé par ce kit et les séquences des amorces et sondes n'ont pas été mises à disposition par la société DiaSorin. Le mélange réactionnel lyophilisé comprenant les amorces et sondes est reconstitué avec un tampon comprenant des sels, un détergent et un conservateur.

Avec l'extracteur *LIAISON® Ixt*, il est possible d'effectuer 12 extractions simultanées (Fig. 29) tandis qu'un automate d'amplification *LIAISON® Iam* comporte huit positions (Fig. 32); cet automate peut être associé en série avec d'autres *LIAISON® Iam*. Au cours de l'étude, deux automates d'amplification étaient associés.

1. Traitement des échantillons avec le kit Iam VZV (Annexe 6)

Il est possible de faire 8 tests par série avec un *LIAISON® Iam* (Fig. 32) : chaque série devant comporter un contrôle positif et un contrôle négatif, les séries comportent donc 6 ou 14 échantillons testés selon que l'on utilise un ou deux automates.

Le contrôle positif est une solution tamponnée contenant la séquence-cible du VZV; le contrôle négatif est une solution tamponnée contenant un ADN exogène ainsi que le contrôle interne. Ce contrôle est une suspension de bactériophage ajouté aux échantillons à tester

préalablement à l'extraction (Fig. 26), servant à la fois de contrôle d'extraction et d'amplification.

Au début de chaque série d'analyses, 50 µl d'extrait sont placés dans le bloc chauffant à 99°C pendant 5 minutes pour dénaturation. Les extraits dénaturés ont ensuite été immédiatement placés dans la glace pendant au moins 5 minutes pour éviter le ré-appariement des brins d'ADN. Le mélange réactionnel est reconstitué dans une pièce de préparation. Chaque tube de mélange réactionnel lyophilisé (Fig. 33) a été reconstitué avec 225 µl de tampon pour 8 réactions LAMP, homogénéisé à la pipette puis vortexé légèrement. Lors des séries nécessitant l'utilisation de deux tubes, les deux mélanges réactionnels étaient mélangés pour obtenir un milieu réactionnel homogène pour la série de 16 amplifications. Les barrettes de puits réactionnels (Fig. 34) ont été placées dans un portoir réfrigéré à 4°C, puis 25µl de mélange réactionnel reconstitué ont été déposés dans chaque puits.

Après une courte centrifugation pour limiter le risque de contamination, les extraits ont été homogénéisés à la pipette puis 25 µl ont été déposés dans les puits réactionnels. Après fermeture des capuchons, les barrettes ont été vortexées pendant une minute puis centrifugées pendant une quinzaine de secondes (Fig. 35) avant d'être placées dans le *LIAISON® Iam* (DiaSorin) préalablement programmé.

Les extraits dénaturés restants ont été conservés à 4°C pendant une semaine alors que les tubes mères d'extraits non-dénaturés ont été recongelés à -20°C.



Figure 32: LIAISON® Iam



Figure 33: Tube de milieu réactionnel lyophilisé



Figure 34: Barrette de puits réactionnels



Figure 35: vortexeur et centrifugeuse pour les barrettes de puits

2. Détection de la fluorescence et interprétation des courbes

En ce qui concerne la détection de l'amplification de l'ADN cible avec la méthode Iam VZV (DiaSorin), des sondes fluorescentes présentes dans le milieu réactionnel sont intégrées à l'ADN amplifié. La méthode de détection est basée sur une extinction du signal fluorescent lors de l'hybridation de la sonde : lors de l'amplification de l'ADN du VZV, une décroissance de la fluorescence est observée dans un premier canal de détection à 500nm (Fig. 36a).

La technologie LAMP étant une amplification à température constante, l'amplification d'une cible sera détectée au bout d'une certaine durée. Le résultat qualitatif rendu par ce kit se base donc sur un temps de détection de la diminution de fluorescence.

Un bactériophage encapsidé est utilisé comme contrôle interne d'extraction et d'amplification : l'amplification de son génome est détectée sur un deuxième canal (530 nm) selon le même principe que pour l'ADN viral. Par un phénomène de compétition, lorsque le génome viral est détecté, l'ADN du bactériophage n'est pas amplifié et aucune diminution de signal de fluorescence n'est observée à 530 nm (Fig. 36b).

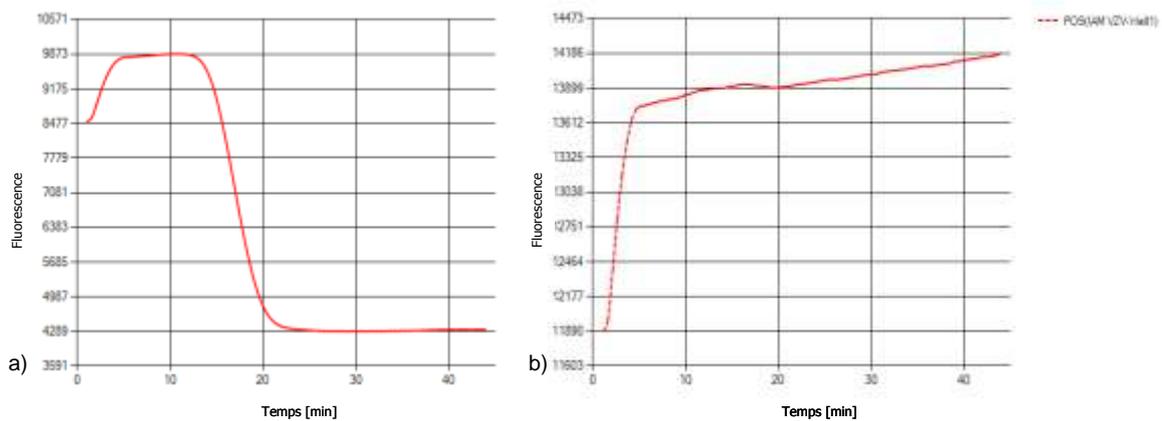


Figure 36: Profil d'un prélèvement positif pour le VZV

a) amplification de la cible à 500 nm ; b) Absence d'amplification du contrôle interne à 530 nm

Ordonnée : fluorescence / Abscisse : Temps écoulé

Lorsque le génome viral n'est pas détecté à 500 nm, on n'observe pas de diminution de la fluorescence ; seul le contrôle interne est amplifié et détecté à 530 nm et la courbe de fluorescence de l'IC s'infléchit (Fig. 37)

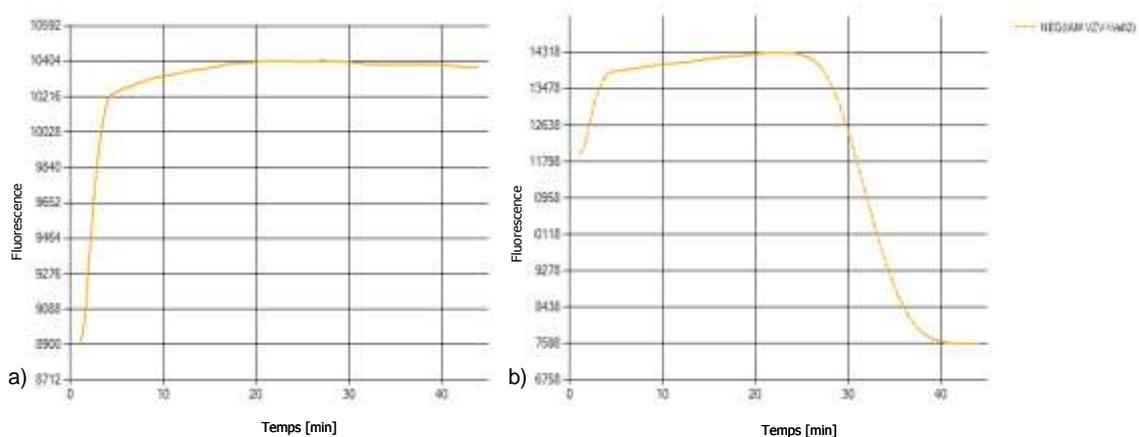


Figure 37: Profil d'un prélèvement négatif pour le VZV

a) Absence d'amplification de la cible à 500 nm ; b) Amplification du contrôle interne à 530 nm

Ordonnée : fluorescence / Abscisse : Temps écoulé

Lorsqu'un prélèvement présente une faible concentration d'ADN viral, les deux cibles sont amplifiées : l'ADN viral est détecté avec un temps de positivité supérieur à 20 minutes, alors que l'amplification du contrôle interne est détectée après 30 minutes. Ce profil de double amplification se présente dans deux cas de figure : il peut s'agir d'un prélèvement faiblement positif ou d'un prélèvement négatif contaminé au cours de la manipulation (Fig. 38).

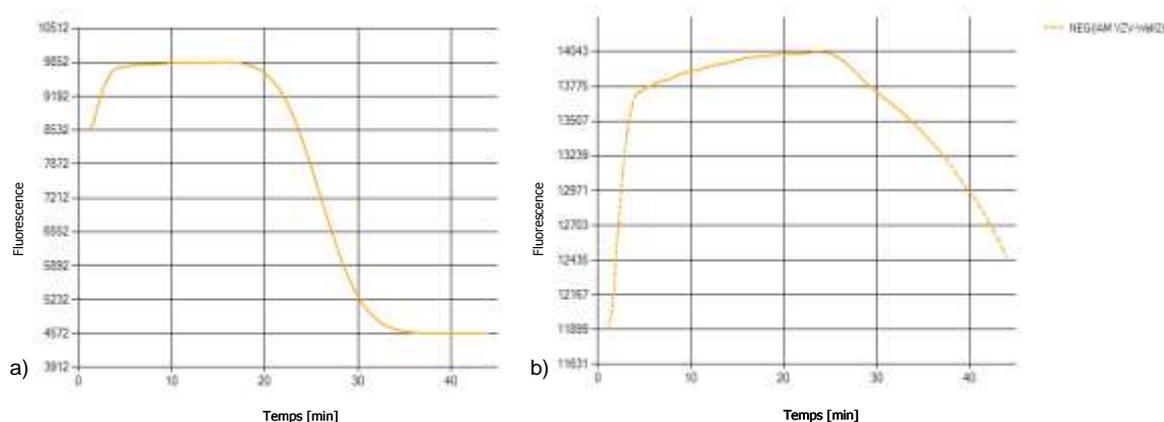


Figure 38: Profil de double amplification

observé pour les prélèvements faiblement positifs ou faux-positifs pour le VZV ;

a) Amplification tardive de la cible à 500 nm ; b) Amplification tardive du contrôle interne à 530 nm

Ordonnée : fluorescence / Abscisse : Temps écoulé

Les éléments de comparaison des deux méthodes sont présentés dans le tableau récapitulatif suivant.

	PCR en temps réel	LAMP en temps réel
Principe de l'amplification	Amplification génique selon des cycles de température: Dénaturation - hybridation – élongation	Amplification isotherme: hybridation puis amplification - déplacement par ADN polymérase
Détection de l'amplification	Par augmentation de la fluorescence - Technologie des sondes 5' nucléase	Par extinction de fluorescence: intégration des sondes à l'ADN amplifié
Rendu de résultat	Cycle threshold (Ct: nombre de cycles de PCR)	Temps de détection (minutes)

Tableau 4: Comparaison de la PCR et de la LAMP en temps réel

VI. Analyse statistique des données

A. Dosage des acides nucléiques totaux

Un même échantillon a été extrait soit avec le contrôle interne Argène, soit avec le contrôle interne DiaSorin (Fig. 26). La concentration en acides nucléiques a été mesurée au Nanodrop ND1000® pour chacun des extraits. Nous avons souhaité tester l'égalité des moyennes de ces deux populations afin d'évaluer si l'ajout d'un contrôle interne influait sur la qualité de l'extraction.

La comparaison portait sur l'ensemble des échantillons humains, soit 46 échantillons cutanés et 36 LCR (soit $n = 82$ échantillons).

1. Test des variances

Les variances des concentrations dosées au ND1000® ont été comparées selon le test de Fisher-Snedecor. On supposera pour cela que les valeurs mesurées se répartissent selon une loi normale.

Soient les hypothèses

- H_0 : « Les variances des concentrations sont égales » et
- H_1 : « les variances des concentrations sont différentes »,

Soit la variable de décision $F = s_x^2 / s_y^2$, avec

- s : écart-type
- x et y : concentrations dosées au ND1000®, respectivement pour les extraits Argène et DiaSorin [85].

Cette variable de décision a été comparée à la valeur F fournie par la table de Fisher pour un niveau de risque α bilatéral, et $n-1$ degrés de liberté [86].

2. Test des moyennes

L'égalité des moyennes des concentrations sera évaluée selon le test de Student après calcul de la différence entre les deux concentrations obtenues pour un même échantillon extrait soit avec le contrôle interne Argène, soit avec le contrôle interne DiaSorin.

Soient les hypothèses

- H_0 : « Les moyennes des concentrations sont égales » et
- H_1 : « les moyennes des concentrations sont différentes »,

Soit la variable de décision :

$$t = \frac{\bar{x}_D}{\sqrt{\frac{s_D^2}{n}}} \sim St_{n-1}$$

Avec

- D : Différence calculée entre les deux points x et y comparés
- \bar{x}_D : moyenne des différences
- s_D^2 : variance des différences
- n : taille de l'échantillon [85]

Cette variable de décision a été comparée à la valeur t fournie par la table de Student pour un niveau de risque α bilatéral, et $n-1$ degrés de liberté [86].

B. Etude de corrélation

Pour les 54 échantillons testés positifs par les deux méthodes, les C_t ont été relevés pour le kit VZV R-Gene® (Argène), et une étude de corrélation a été réalisée avec les temps de positivité correspondants obtenus avec le kit Iam VZV (DiaSorin).

1. Etude des points aberrants

Soient x et y respectivement les temps de positivité et les C_t relevés. Les points discordants ont été éliminés grâce au test de Grubbs : ce test permet de détecter un point aberrant dans une série de données, et est répété jusqu'à l'absence de point statistiquement aberrant.

On suppose que les valeurs mesurées sont réparties selon une loi normale.

Soient

- H_0 : « Il n'y a pas de valeur aberrante dans la plage de données »
- H_1 : « Il y a au moins une valeur aberrante dans la plage de données »

- la variable de décision

$$G = \frac{Y_{\max} - \bar{Y}}{s}$$

Avec Y_{\max} : valeur présentant l'écart maximal par rapport à la moyenne \bar{Y} , et s l'écart-type de l'échantillon étudié. Ces deux variables sont recalculées à chaque fois qu'un point est éliminé.

L'hypothèse H_0 est rejetée avec un niveau de risque α si

$$G > \frac{N-1}{\sqrt{N}} \sqrt{\frac{t_{\alpha/(2N), N-2}^2}{N-2 + t_{\alpha/(2N), N-2}^2}}$$

Avec

- N : taille de l'échantillon pour lequel le test est calculé
- $t_{\alpha/(2N), N-2}$: valeur critique haute de la table de Student, avec $N-2$ degrés de liberté et un niveau de risque α unilatéral [86] .

2. Régression linéaire

Après élimination des points aberrants par le test de Grubbs, les deux variables sont comparées selon une étude de régression linéaire.

Soient x et y respectivement les temps de positivité et les Ct relevés. Après avoir calculé les moyennes et les écart-types estimés de ces variables, leur covariance s_{xy}^2 a été estimée selon la formule suivante :

$$s_{XY}^2 = \frac{1}{n-1} \left[\sum x_i y_i - \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{n} \right]$$

L'équation de la droite de régression $Y = \alpha + \beta.X$ a été estimée comme suit :

- Estimation de la pente β :

$$\beta \# b = \frac{s_{XY}^2}{s_X^2}$$

- Estimation de l'ordonnée à l'origine α :

$$\alpha \# a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Avec

- \bar{x} , moyenne des valeurs de x dans l'échantillon étudié,
- \bar{y} moyenne des valeurs de y dans l'échantillon étudié.
- s_x écart-type des valeurs de x dans l'échantillon étudié
- s_y écart-type des valeurs de y dans l'échantillon étudié [85]

3. Calcul du coefficient de corrélation linéaire de Pearson ρ

Dans notre échantillon, ρ est estimé par la formule suivante [85]:

$$r = \frac{s_{XY}^2}{s_X s_Y}$$

4. Test du coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation entre les deux signaux mesurés a été testé selon les modalités suivantes :

- Soit H_0 : « $r^2 = 0$ »
- Soit H_1 : « $r^2 \neq 0$ »

Soit la variable de décision du test de corrélation, suivant une loi de Student à n-2 degrés de liberté [85]:

$$t = \frac{r}{\sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}} \sim St_{n-2}$$

Cette variable est comparée à une valeur théorique, t, fournie par la table de Student pour un risque $\alpha=5\%$ avec n-2 degrés de liberté.

RESULTATS

La comparaison des résultats obtenus pour les échantillons biologiques testés avec les différentes méthodes est présentée en annexes 1 et 2. Les échantillons cutanés sont numérotés Cn (avec n le numéro de l'échantillon) et les LCR sont numérotés Ln.

I. Dosage des acides nucléiques totaux

Les concentrations en acides nucléiques ont été dosées au Nanodrop ND 1000® afin d'évaluer la qualité de l'extraction et de tester si l'utilisation de deux contrôles internes distincts influait sur ces concentrations. Les résultats obtenus pour les extraits du même prélèvement en parallèle sont dans le même ordre de grandeur selon la nature du prélèvement : les moyennes, écart-types et variances des concentrations en acides nucléiques sont présentées dans le tableau suivant.

	Prélèvements cutanés		LCR	
	IC Argène	IC DiaSorin	IC Argène	IC DiaSorin
N	46		36	
Moyenne (ng/μl)	8,68	8,48	1,89	4,31
Ecart-type	16,13	12,29	1,06	1,19
Variance	260,14	151,13	1,12	1,41
F	2,06			

Tableau 5: Moyennes, écart-types et variances des concentrations en acides nucléiques mesurées

Le résultat du test de Fisher-Snedecor pour les concentrations en acides nucléiques mesurées pour les extraits de prélèvements cutanés est : $F = 2.06$.

Pour valider H_0 : « Les variances des concentrations sont égales », F devrait être inférieur à 1.65, valeur fournie par la table de Fisher avec 45 degrés de liberté et un risque $\alpha = 5\%$ [86]. Ainsi, le test de comparaison des variances permet de rejeter l'hypothèse H_0 pour les prélèvements cutanés : les variances des deux concentrations ne sont donc pas statistiquement égales. Dans ce cas, les moyennes des concentrations en acides nucléiques dosées pour un même échantillon extrait soit avec le contrôle interne Argène, soit avec le contrôle interne DiaSorin ne peuvent être statistiquement comparées.

La concentration moyenne des LCR extraits avec le contrôle interne Argène se situe en dessous de la limite de détection définie pour le spectrophotomètre ND1000® (limite de détection = 2 ng/μl) [87]. L'analyse statistique n'a pas été réalisée pour ce type de prélèvement en raison de cette contrainte technique.

II. Métrologie du bloc chauffant

En programmant le bloc pour une température de 99°C, il a fallu au moins 3 minutes pour que la température du fluide caloporteur (huile) atteigne 90°C et, en 5 minutes, l'échantillon était à 93°C. La température-cible de dénaturation de l'ADN étant de 95°C, le bloc chauffant a été programmé à 99°C et les échantillons ont été incubés 5 minutes pour les expériences afin d'optimiser la dénaturation.

III. Limites de détection et de quantification

Les limites de détection et de quantification des deux méthodes ont été déterminées à partir de gammes de dilution d'un contrôle calibré à 10^5 copies/ml d'ADN de VZV (Acrometrix® - Annexe 3). Les 4 concentrations testées étaient 10^4 , 10^3 , 10^2 et 10 cp/ml. Chaque concentration a été testée en triplicat avec chaque méthode.

Les résultats obtenus avec le kit VZV R-Gene™ (Argène) sont présentés dans le tableau 6.

Echantillon (copies /ml)	Passage 1 (Ct)	Passage 2 (Ct)	Passage 3 (Ct)	Moyenne (Ct)	Ecart-type	CV%
10^4	29,01	28,91	28,11	28,67	0,4	1,40%
10^3	32,47	32,22	32,05	32,25	0,17	0,50%
10^2	37,3	36,63	37,12	37,02	0,28	0,80%
10^1	38,46		38,19	38,32	0,13	0,40%

Tableau 6: Détermination des limites de détection et de quantification de l'amplification VZV R-Gene™
(Résultats en cycle de détection de l'ADN cible: Ct)

Les résultats obtenus avec le kit Iam VZV (DiaSorin) sont présentés dans le tableau 7.

Echantillon (copies /ml)	Passage 1 (min)	Passage 2 (min)	Passage 3 (min)	Moyenne (min)	Ecart-type	CV%
10^4	14,47	14,53	16,08	15,03	0,75	5,00%
10^3	15,52	17	15,4	15,97	0,73	4,60%
10^2	19,3	19,92	19,32	19,51	0,29	1,50%
10^1	21,47		30,65	26,06	4,59	17,60%

Tableau 7: Détermination des limites de détection et de quantification de l'amplification Iam-VZV
(Résultats en temps de détection exprimés en minutes)

Les deux méthodes d'amplification présentent une limite de quantification à 100 cp/ml et une limite de détection à 10 cp/ml.

IV. Tests de contamination

A. Extraction

La contamination inter-échantillons lors de l'étape d'extraction par le *LIAISON® Ixt* a été testée. Au cours de deux séries distinctes, un contrôle négatif W_0 pour les tests par le kit VZV R-Gene™ (Argène) a été extrait avec le *LIAISON® Ixt* en même temps que 11 prélèvements testés positifs par la PCR maison.

Les contrôles négatifs W_0 ont été testés négatifs pour toutes les séries lancées avec le kit VZV R-Gene™ (Argène). Il n'y a donc pas eu de contamination de ces témoins par les échantillons positifs au cours de l'extraction.

B. Amplification

La contamination des échantillons lors de l'amplification a été testée pour les deux méthodes : au cours d'une série, 14 échantillons alternativement positifs ou négatifs (résultats de la PCR maison) ont été testés.

Echantillon	PCR maison	VZV R-Gene™	Iam VZV – Première série
Contrôle positif	P	P	P
Contrôle négatif	N	N	P
C21	P	P	Invalide (P)
C32	N	N	Invalide (N)
C22	P	P	Invalide (P)
C41	N	N	Invalide (N)
C23	P	P	Invalide (P)
C42	N	N	Invalide (N)
C24	P	P	Invalide (P)
L23	N	N	Invalide (N)
C25	P	P	Invalide (P)
C34	N	N	Invalide (N)
C26	P	P	Invalide (P)
C43	N	N	Invalide (N)
C20	P	P	Invalide (P)
L24	N	N	Invalide (N)

Tableau 8: Résultats des tests de contamination

Les résultats de la série testée avec le kit VZV R-Gene™ (Argène) sont identiques à ceux obtenus avec la PCR maison (Tableau 8).

Les tests effectués avec la méthode DiaSorin ont dû être effectués à deux reprises : lors de la première série, le contrôle négatif a été contaminé et rendu positif. De ce fait, la série a été invalidée ; les résultats présentés entre parenthèses dans le tableau 8 sont ceux des interprétations des courbes, qui auraient été concordants avec ceux de la PCR maison si le témoin négatif avait été valide.

Après l'invalidation de la série 1 sur DiaSorin, un second test de contamination a été réalisé (Tableau 9).

Echantillon	PCR maison	Iam VZV – Deuxième série
Contrôle positif	P	P
Contrôle négatif	N	N
C21	P	P
C32	N	P
C22	P	P
C41	N	N
C23	P	P
C42	N	N
C24	P	P
L23	N	N
C25	P	P
C34	N	Invalide
C26	P	P
C43	N	N
NC1	-	P
L24	N	N

Tableau 9: Résultats de la deuxième série du test de contamination avec le kit Iam VZV

NC1 : Contrôle négatif de la première série

Les résultats sont concordants avec ceux de la PCR maison et du kit VZV R-Gene™ à l'exception de ceux obtenus pour le prélèvement C32, testé positif faible.

Le test effectué pour le prélèvement C34 n'a pas pu être interprété par le logiciel du fait de l'absence d'amplification des cibles : ni le génome du VZV, ni le contrôle interne n'ont été amplifiés. Il s'agissait d'un extrait réalisé à partir d'une biopsie. Cet échantillon a été testé de nouveau au cours d'une série ultérieure avec ce kit, permettant d'obtenir un résultat négatif.

Le contrôle négatif de la première série (NC1) a été de nouveau testé positif faible. Le prélèvement C20, remplacé par NC1, a été testé positif au cours d'une autre série, résultat concordant avec les deux méthodes de PCR en temps réel.

V. Comparaison des résultats

A. Prélèvements cutanés

Sur les 46 prélèvements cutanés testés, les 31 prélèvements détectés positifs par la PCR maison ont été testés positifs par les deux méthodes (Tableau 10).

Prélèvements cutanés	Iam VZV Positif	Iam VZV Négatif
VZV R-Gene TM Positif	31	0
VZV R-Gene TM Négatif	3	12

Tableau 10: Résultats obtenus pour les prélèvements cutanés testés sur les deux méthodes en parallèle

Les 15 prélèvements testés négatifs par la PCR maison sont retrouvés négatifs par la technique de PCR en temps réel VZV R-GeneTM (Argene). Le kit Iam VZV (DiaSorin) détecte 3 prélèvements positifs faibles : il s'agit des prélèvements C37, C42 et C45 (Annexe 1) ; les 12 autres ont été testés négatifs.

B. LCR

1. Prélèvements détectés positifs par la PCR maison

En ce qui concerne les 22 LCR qui avaient été détectés positifs avec la PCR maison, 16 prélèvements ont été testés positifs avec concordance entre les deux méthodes Argène et DiaSorin (Tableau 11). Quatre prélèvements ont été testés négatifs par les deux méthodes : il s'agit des prélèvements L6, L11, L14 et L15 (Annexe 2). Enfin, deux prélèvements sont détectés positifs par une méthode et négatifs par l'autre (Echantillons L12 et L20 – Annexe 2).

LCR attendus positifs	Iam VZV Positif	Iam VZV Négatif
VZV R-Gene TM Positif	16	1
VZV R-Gene TM Négatif	1	4

Tableau 11: Résultats obtenus pour les LCR détectés positifs par PCR « maison »

2. Prélèvements testés négatifs par la PCR maison

En ce qui concerne les 14 LCR testés négatifs par la PCR maison, le kit VZV R-GeneTM (Argène) retrouve les mêmes résultats (Tableau 12). Le kit Iam VZV (DiaSorin) détecte un prélèvement faiblement positif (Echantillon L26 – Annexe 2) et les treize autres négatifs.

LCR attendus négatifs	Iam VZV Positif	Iam VZV Négatif
VZV R-Gene TM Positif	0	0
VZV R-Gene TM Négatif	1	13

Tableau 12: Résultats obtenus pour les LCR détectés négatifs par PCR maison

VI. Résultats des QCMD 2013

Sur les 10 échantillons testés avec le kit Iam VZV (DiaSorin), les résultats sont concordants avec les résultats officiels : 8 échantillons ont été testés positifs et 2 négatifs (Tableau 13).

En ce qui concerne le kit VZV R-GeneTM (Argène), seuls 7 échantillons ont été détectés positifs : l'échantillon QCMD n°10 est testé négatif avec cette technique et positif avec la méthode DiaSorin.

	Argène	DiaSorin	Officiel (cp/ml)	
QCMD 1	P	P	P	2249
QCMD 2	P	P	P	61
QCMD 3	N	N	N	HSV-1
QCMD 4	P	P	P	25586
QCMD 5	P	P	P	2576
QCMD 6	P	P	P	1140
QCMD 7	P	P	P	783
QCMD 8	P	P	P	226
QCMD 9	N	N	N	/
QCMD 10	N	P	P	118

Tableau 13: Comparaison des QCMD VZV

L'échantillon 3 était positif pour HSV-1 et l'échantillon 9 était négatif

VII. Corrélation des résultats positifs

A partir des 54 prélèvements testés positifs par les deux méthodes, un test de Grubbs a été réalisé pour éliminer les résultats aberrants des séries de données. L'hypothèse H_0 : « il n'y a pas de valeur aberrante dans la plage de données » est acceptée avec un niveau de risque unilatéral $\alpha = 5\%$ après réalisation de 10 tests de Grubbs.

Neuf points aberrants ont ainsi été éliminés des tables de données grâce au test de Grubbs, permettant de continuer l'étude de corrélation (Tableau 14).

N	G	Valeur de comparaison
54	4,40	1,632
53	2,41	1,631
52	2,35	1,631
51	1,79	1,631
50	1,77	1,630
49	1,82	1,630
48	1,76	1,630
47	1,75	1,629
46	1,65	1,629
45	1,59	1,629

Tableau 14: Résultats des tests de Grubbs pour éliminer les valeurs aberrantes

Pour 45 prélèvements détectés positifs par les deux méthodes, les Ct (PCR en temps réel) et les temps de positivité (LAMP) ont été relevés. Une étude de corrélation de ces deux paramètres a été réalisée : la droite de régression obtenue a pour équation $y = 1,81x - 2,97$ et le coefficient de corrélation est $R^2 = 0,82$ (Fig. 39).

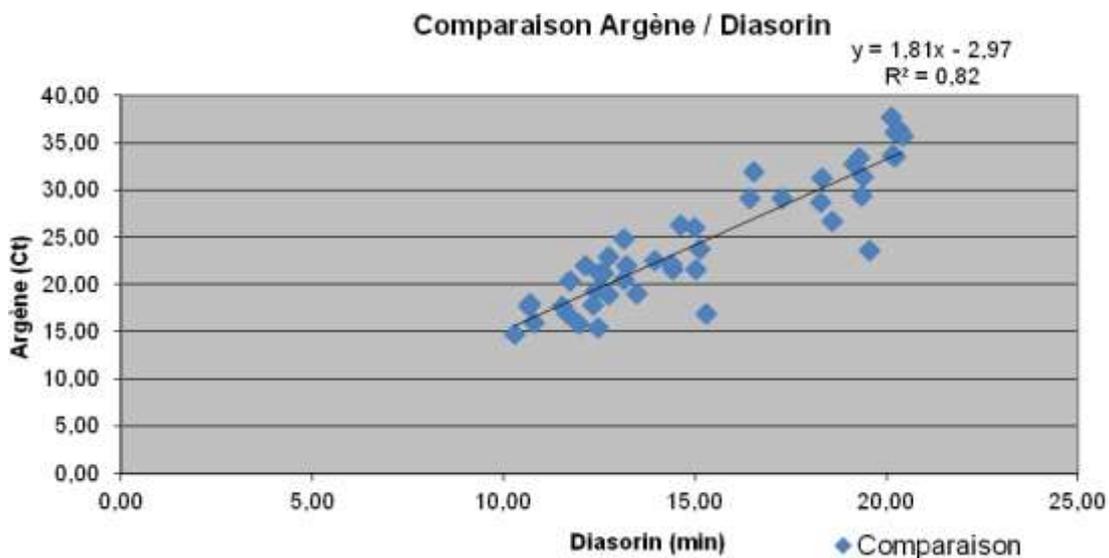


Figure 39: Etude de corrélation des prélèvements testés positifs par les deux méthodes d'amplification
En abscisse : Temps de positivité (DiaSorin) ; En ordonnée : Ct de positivité (Argène)

Le test du coefficient de corrélation s'est avéré positif :

- la variable de décision calculée était $t_c = 13,99$,
- la valeur théorique donnée par la table de Student à 43 degrés de liberté au risque $\alpha=5\%$ était $t_t = 2,0167$ [86]

$t_c > t_t$: On rejette donc l'hypothèse H_0 . Les signaux mesurés par les deux techniques pour une même charge virale sont statistiquement corrélés.

DISCUSSION

L'objet de ce travail était de comparer deux méthodes de détection du génome du VZV par biologie moléculaire (PCR en temps réel *versus* LAMP). Les tests ont été réalisés à partir d'échantillons d'origine humaine, de surnageants de culture de VZV, ainsi qu'à partir de contrôles de qualité pour la biologie moléculaire (QCMD). Ces échantillons ont été extraits en parallèle avec le contrôle interne correspondant à la méthode d'amplification à laquelle l'extrait allait être soumis.

Après avoir commenté les tests réalisés pour évaluer les points critiques et les performances des deux méthodes, leurs aspects pratiques seront comparés. Nous reviendrons ensuite sur les résultats obtenus pour les échantillons d'origine humaine et les QCMD pour conclure sur une analyse bibliographique d'études similaires afin d'évaluer la pertinence des résultats présentés.

I. Dosage des acides nucléiques totaux

Pour un même échantillon extrait en parallèle au cours d'une même série (Fig. 18), soit avec le contrôle interne IC₂ (Argène), soit avec le contrôle interne du kit Iam VZV (DiaSorin), les concentrations d'ADN mesurées varient en fonction de la nature du prélèvement : plus la matrice est complexe, plus la concentration en ADN sera importante, ce qui explique les concentrations plus importantes dans les prélèvements cutanés par rapport aux LCR.

Comme présentées dans le tableau 5, les concentrations moyennes mesurées pour les prélèvements cutanés sont proches, mais leur égalité n'a pas pu être évaluée statistiquement car leurs variances n'étaient pas statistiquement égales. Les prélèvements cutanés et les vésicules étant des matrices complexes et inhomogènes, il est possible que la quantité de matière initiale varie selon la prise d'essai, ce qui pourrait justifier une plus grande dispersion des valeurs mesurées. De plus, les moyennes déterminées sont situées dans une zone pour laquelle la mesure des concentrations est associée à une incertitude de mesure importante : pour des concentrations moyennes de 8,68 et 8.48 ng/ μ l, l'incertitude de mesure est de 2 ng/ μ l, soit près de 23% [87]. Il est donc compréhensible que les variances ne soient pas statistiquement égales.

Les concentrations mesurées pour les LCR n'ont pu être comparées car les mesures se situaient hors de la limite de détection du spectrophotomètre ND1000 [87]. Les mesures ne sont donc pas fiables et ne peuvent être interprétées.

II. Métrologie du bloc chauffant

La dénaturation correcte des extraits est une étape critique pour le bon déroulement de l'amplification avec le kit Iam VZV (DiaSorin). Pour cela, la température au sein de l'échantillon doit atteindre 95°C. D'après l'étude de métrologie, la température au sein de l'échantillon n'atteint que 93°C après 5 minutes d'incubation alors que le bloc est programmé pour une température de 99°C; cette mesure a été soumise à quelques contraintes techniques pouvant interférer avec le résultat:

- La sonde étant trop grande, il était impossible de fermer les bouchons des tubes. Il est probable qu'en les fermant la température atteigne les 95°C ciblés en moins de cinq minutes

- Les extraits destinés à être dénaturés dans ce bloc sont aqueux; il aurait donc été préférable d'utiliser comme fluide caloporteur un fluide aqueux pour être le plus proche possible des conditions expérimentales. Cependant, les bouchons étant ouverts, un fluide aqueux se serait évaporé au cours de ce test, ce qui explique l'utilisation de l'huile dont le point d'ébullition est bien supérieur à celui de l'eau.

Au cours de l'étude, l'absence d'amplification pour certains extraits a conduit à un résultat "invalide" par la méthode Iam VZV (DiaSorin). Ce type de résultat peut être dû à une mauvaise dénaturation de l'extrait; cependant, les autres échantillons dénaturés dans les mêmes conditions et testés dans la même série n'ont pas présenté ce problème. Les prélèvements en question (une biopsie et un LCR) ont été re-testés au cours d'une série ultérieure avec le kit Iam VZV (DiaSorin) qui a rendu un résultat interprétable pour chacun d'eux. Les différentes positions du bloc chauffant ayant été testées, il semble donc peu vraisemblable que l'absence d'amplification soit liée à un problème de dénaturation ; il s'agirait plutôt d'un défaut d'amplification isolé au cours de l'expérience en question.

III. Limites de détection et de quantification

Les performances analytiques des deux méthodes sont équivalentes en termes de limites de quantification (100 copies/ml) et de détection (10 copies/ml) : jusqu'à une concentration de 100 copies d'ADN/ml, les deux méthodes détectent chaque point du triplicat. Pour une concentration de 10 copies/ml, les deux méthodes détectent le génome dans 66% des cas.

Ces résultats sont concordants avec les spécifications annoncées par les fournisseurs :

- la limite de détection du kit VZV R-GeneTM (Argène) est fixée à 50 copies/ml [88],

- la limite de détection du kit Iam VZV (DiaSorin) est fixée à 100 copies/ml [89].

En ce qui concerne le test du triplicat à la concentration de 10 copies/ml par la méthode Iam VZV (DiaSorin), on observe trois profils d'amplification différents :

- Amplification isolée de la cible à 500 nm : profil classique d'échantillon positif (Fig. 36)
- Amplification isolée du contrôle interne à 530 nm : profil classique d'échantillon négatif (Fig. 37)
- Double amplification (cible à 500 nm & contrôle interne à 530 nm) : profil d'échantillon faiblement positif (Fig. 38)

Les Coefficients de Variation (CV) obtenus avec le kit Iam VZV (DiaSorin) sont supérieurs à ceux obtenus avec le kit VZV R-GeneTM (Argène), notamment pour la concentration de 10 copies/ml (Tableaux 6 & 7). Le CV de la méthode DiaSorin pour cette concentration peut être expliqué par le phénomène de compétition entre les deux cibles en cas de double-amplification : l'amplification du contrôle interne et de l'ADN du VZV étant simultanée, la détection de l'amplification des deux cibles sera retardée. C'est pourquoi on observe un écart de près de 10 minutes entre les deux tests et un CV de 17,6% pour cette concentration.

S'agissant d'une méthode qualitative, il ne semble pas exister dans la littérature de CV limite défini pour comparer la dispersion des Ct et des temps de détection.

Les performances annoncées par les fournisseurs sont donc vérifiées et on ne peut pas conclure à la supériorité de l'une de ces méthodes en termes de sensibilité analytique.

IV. Tests de contamination

A. Extraction

Les contrôles négatifs W_0 extraits en parallèle de prélèvements positifs pour le VZV ont toujours été testés négatifs par le kit VZV R-GeneTM. Il n'a donc pas été noté de contamination inter-échantillons au cours de l'extraction avec l'automate *LIAISON® Ixt*, que

ce soit au niveau de la préparation de l'extraction des échantillons ou de l'extraction elle-même.

B. Amplification

Quatorze échantillons testés antérieurement positifs ou négatifs par la PCR maison ont été testés avec les deux méthodes en alternant un extrait positif avec un extrait négatif.

Les résultats obtenus avec le kit VZV R-GeneTM ont été concordants à 100% avec ceux de la PCR maison. Ce test ne met pas en évidence de contamination des échantillons au cours de leur manipulation.

En ce qui concerne la méthode DiaSorin, ce test a dû être effectué à deux reprises du fait d'une contamination du contrôle négatif au cours de la première série. Ce contrôle présentait un profil de double-amplification, indiscernable de celui d'un échantillon faiblement positif (Fig. 38) : le génome du VZV et le contrôle interne sont amplifiés tardivement, signant une faible concentration. La série a dû être invalidée.

Afin de déterminer l'étape au cours de laquelle a eu lieu la contamination, le contrôle négatif de la première série (NC1) a été testé comme un échantillon lors de la deuxième série, et un autre contrôle négatif a été utilisé pour la valider. En faisant le test à partir du tube-mère de NC1, ce contrôle négatif a de nouveau été testé positif. Ce tube-mère n'est utilisé qu'au moment de l'aliquotage du contrôle, juste avant qu'il soit dénaturé par chauffage. Cela laisse donc à penser que l'étape d'aliquotage préalablement à la dénaturation peut entraîner des contaminations, et que des précautions particulières pour limiter les risques de contamination doivent être prises lors de cette étape.

Par ailleurs, les résultats de la deuxième série de ce test concordent à 85% avec ceux de la PCR maison (Tableau 9) :

- l'échantillon C32, testé négatif par les deux méthodes de PCR en temps réel, ainsi que lors de la première série du test de contamination par le kit Iam VZV, a été détecté positif faible. Cet échantillon a été testé de nouveau au cours d'une série ultérieure avec le kit Iam VZV et a été testé négatif. Il est donc probable que la détection isolée de cette positivité soit liée à une contamination au cours de la deuxième série du test.

- l'échantillon C34 a été testé invalide du fait de l'absence d'amplification de la cible comme du contrôle interne. Il s'agissait d'une biopsie ; cet échantillon a été testé au cours d'une série ultérieure, permettant d'obtenir un résultat concordant à celui de la PCR maison.

Il semble donc que l'utilisation du kit Iam VZV (DiaSorin) présente un risque de contamination supérieur à celui du kit VZV R-GeneTM (Argène).

V. Praticabilité

A. Extraction

Les échantillons ont été extraits sur le *LIAISON® Ixt* (DiaSorin) à l'aide du kit Arrow Viral NA (DiaSorin). L'automate réalise 1 à 12 extractions en parallèle dans un délai d'environ 1h.

Le volume initial d'échantillon nécessaire est sensiblement le même que pour l'extraction automatisée (MagNAPure – Roche) utilisée dans notre laboratoire (250 µl pour le *LIAISON® Ixt* versus 200 µl pour MagNAPure) et le volume d'extrait obtenu est de 100 µl.

L'assemblage des pompes et des cônes de pipetage se fait manuellement (Fig. 28) et ne permet pas d'envisager l'utilisation de cet extracteur pour de grosses séries d'échantillons. Les techniciens amenés à tester cette méthode ont trouvé cette étape un peu rébarbative par rapport à d'autres systèmes déjà sur le marché. L'installation de l'ensemble pompes-embout dans l'automate nécessite un peu d'entraînement et d'habitude (Fig. 29). Il est recommandé de surveiller les premières étapes du run afin de vérifier le démarrage de l'automate. La décontamination de l'automate par les UV est un point positif important pour limiter le risque de contaminations lors de séries ultérieures.

B. Utilisation et stabilité des extraits non-dénaturés

Les extraits obtenus lors de l'extraction par le *LIAISON® Ixt* restent stables pendant 24h à 4°C, ou peuvent être congelés à -20°C pour une conservation sur une plus longue période [89].

La prise d'essai pour le kit Iam VZV (DiaSorin) est de 25 µl ; il est donc possible de réaliser jusque 3 analyses par extrait. Pour le kit VZV R-GeneTM (Argène), la prise d'essai est de 10 µl ; il est donc possible de réaliser jusque 9 analyses par extrait.

En cas de demande d'analyse complémentaire par les services de soins, le kit VZV R-Gene™ offre une plus grande marge de manœuvre.

C. Préparation et conservation du milieu réactionnel

Le mélange réactionnel du kit Iam VZV (DiaSorin) est reconstitué extemporanément dans une solution tampon. Il est impératif de bien homogénéiser le mélange réactionnel en le vortexant brièvement après reconstitution. Si ce mélange n'est pas homogène, les courbes obtenues pour les derniers puits déposés présenteront une forme aplatie puisque les sondes fluorescentes seront en concentration moindre. Ceci étant, le résultat qualitatif rendu pour ces échantillons n'est pas altéré et est concordant avec la PCR.

Au niveau de la stabilité des réactifs, le kit Iam VZV (DiaSorin) contient 6 tubes indépendants de milieu réactionnel lyophilisé (permettant 6x8 réactions) qui permettent de reconstituer la quantité adaptée au nombre d'échantillons à tester et de limiter le risque de contamination des autres tubes réactionnels. La reconstitution extemporanée du milieu réactionnel pour la méthode Iam VZV est un point positif par rapport au kit VZV R-gene™ où la totalité du mélange réactionnel prêt à l'emploi est recongelée après utilisation. Or, des cycles répétés de congélation - décongélation des réactifs peuvent affecter les performances. Le nombre de ces cycles est limité à 7 pour le kit VZV R-Gene™ et un flacon de réactif permet d'effectuer 30 tests : si on réalise les contrôles positif et négatif à chaque série, il reste 16 tests à réaliser au cours de 7 séries. Il est recommandé de tester plus de deux échantillons lors des séries utilisant les kits Argène pour éviter d'altérer les performances des réactifs, ce qui est largement le cas dans la pratique de routine au laboratoire.

D. Contrôles internes et inhibiteurs

L'amplification par PCR en temps réel avec le kit VZV R-Gene™ permet de mettre en évidence la présence d'inhibiteurs de PCR grâce à l'interprétation du contrôle interne IC₂.

En ce qui concerne le kit Iam VZV (DiaSorin), on ne peut évaluer la présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase que pour les prélèvements négatifs : quand l'échantillon est négatif pour l'ADN du VZV, le contrôle interne doit se positiver vers 32 minutes et on peut considérer que l'amplification est inhibée quand ce temps avoisine ou dépasse les 40 minutes. Un résultat négatif avec inhibiteur pouvant masquer un résultat faiblement positif, il semble pertinent de ré-extraire l'échantillon et de relancer le test dans le cas où le temps de détection du contrôle interne dépasse les 40 minutes.

S'agissant d'une méthode qualitative, la présence d'inhibiteurs dans un échantillon détecté positif pour l'ADN du VZV ne pose pas de problème d'interprétation. Cependant, si cette méthode était amenée à être utilisée pour un résultat quantitatif, la charge virale du VZV pourrait être sous-estimée par la présence d'un inhibiteur sans possibilité de le détecter.

E. Temps nécessaire

Avec la solution DiaSorin, pour une série de 14 échantillons, le résultat peut être obtenu en 1h15 à 1h30 :

- Préparation du mélange réactionnel
 - o Avec aliquotage de 50 µl d'extrait : 40 minutes
 - o En dénaturant les 100 µl d'extrait : 30 minutes
- Durée du run : 45 minutes

En ce qui concerne la méthode Argène, le rendu de résultat est plus long :

- Préparation du mélange réactionnel : 30 minutes (voire moins en cas de petites séries)
- Durée du run : 1h30

L'amplification par la méthode Iam VZV présente donc l'avantage d'un rendu de résultat plus rapide. Le temps technicien requis pour l'utilisation du kit Iam VZV (45 min) est supérieur à celui pour l'utilisation du kit Argène (30 min) en partie à cause de l'étape de dénaturation avant amplification. L'intérêt du gain de temps par la méthode DiaSorin est donc restreint car le temps de technique est plus important que celui de fonctionnement d'un automate.

F. Nombre d'échantillons testés

La taille des séries est moins importante avec le kit Iam VZV qu'avec le kit VZV R-GeneTM. La société DiaSorin avait mis à disposition deux automates *LIAISON® Iam* et, en les utilisant simultanément, il était possible de tester jusque 14 échantillons par série alors qu'avec le kit VZV R-GeneTM, 94 échantillons pourraient être intégrés par série. Ceci étant, il est possible de connecter jusque 6 *LIAISON® Iam* en série, permettant une analyse de 46 échantillons simultanément selon le fabricant [89].

G. Interprétation des résultats

Les techniciens ont été amenés à comparer les logiciels d'interprétation des résultats des deux méthodes évaluées. Ils ont l'habitude d'interpréter des résultats de PCR en temps réel et le logiciel utilisé pour le kit VZV R-Gene™ est celui utilisé habituellement au laboratoire (7500 software – ABI).

Les modalités d'interprétation des courbes de la LAMP (résultat rendu en minutes selon une diminution de la fluorescence) les ont un peu déroutés. L'interprétation du profil de double-amplification (Fig. 38) leur a notamment paru délicate car ce genre de profil rencontré pour des échantillons faiblement concentrés n'est pas retrouvé en PCR en temps réel.

VI. Echantillons d'origine humaine

Au total, 82 prélèvements ont été testés en parallèle avec les deux méthodes évaluées ; les résultats ont été comparés avec ceux obtenus antérieurement par la PCR maison. Les échantillons se répartissaient comme suit :

- prélèvements cutanés : 31 échantillons positifs et 15 négatifs
- LCR : 22 échantillons positifs et 14 négatifs

A. Résultats obtenus avec le kit VZV R-Gene™ (Argène)

Tous les prélèvements testés négatifs avec la PCR maison sont également testés négatifs avec le kit VZV R-Gene™ (29/29). Tous les prélèvements cutanés testés positifs par la PCR maison sont également testés positifs par le kit VZV R-Gene™ (31/31). Sur les 22 LCR testés positifs par la PCR maison, 17 sont également testés positifs par le kit VZV R-Gene™.

Les cinq LCR pour lesquels des résultats discordants entre les deux méthodes de PCR en temps réel ont été obtenus (Echantillons L6, L11, L14, L15, L20 – Annexe 2) avaient une charge virale faible ($Ct > 35$ pour la PCR maison) et quatre LCR avaient été dilués pour pouvoir être extraits en parallèle avec les différents contrôles internes. De plus, ils avaient été conservés à -20°C entre trois mois et deux ans depuis le prélèvement, ce qui peut altérer la qualité des acides nucléiques et interférer avec la qualité de l'extraction.

Les résultats obtenus pour les échantillons humains testés avec le kit VZV R-Gene™ (Argène) sont donc cohérents avec ceux de la PCR maison pour 93.9% des tests.

B. Résultats obtenus avec le kit Iam VZV (DiaSorin)

Les prélèvements humains testés positifs par la PCR maison ont également été testés positifs par le kit Iam VZV (DiaSorin), à l'exception de cinq LCR (Echantillons L6, L11, L12, L14, L15 – Annexe 2). Les prélèvements L6, L11, L14 et L15 n'ont pas été détectés non-plus par le kit VZV R-Gene™ alors que le prélèvement L12 avait été testé positif par les deux méthodes de PCR en temps réel. En revanche, le prélèvement L20, non-détecté par le kit VZV R-Gene™, a été testé positif par la méthode DiaSorin.

Ces observations confirment l'équivalence de sensibilité des deux méthodes d'amplification génique, démontrée par l'égalité des limites de détection et quantification.

En ce qui concerne les prélèvements testés négatifs par la PCR maison et le kit VZV R-Gene™, quatre prélèvements ont été détectés faiblement positifs par le kit Iam VZV (DiaSorin) : il s'agit des prélèvements cutanés C37, C42 et C45, ainsi que le LCR L26 (Annexes 1 et 2). Il peut s'agir de prélèvements faiblement positifs non-détectés par les méthodes de PCR en temps réel ou de contaminations au cours de la manipulation des échantillons.

Deux des prélèvements cutanés étaient positifs pour HSV-1 ; les deux autres étaient négatifs pour la recherche de génome viral ou pour la recherche d'anticorps anti-*Herpesviridae* dans le LCR. Ne disposant pas des séquences ciblées par le kit Iam VZV (DiaSorin), la spécificité de cette méthode pour la détection du VZV ne peut être évaluée. Il est probable que les deux prélèvements testés positifs pour la détection de HSV-1 aient été contaminés lors de la manipulation des extraits. Cette hypothèse est corroborée par les résultats du test de contamination.

La quantité d'échantillon restant était insuffisante pour ré-extraire l'échantillon et relancer les tests. Il est donc impossible de conclure quant au statut de ces prélèvements pour la présence du virus.

Les résultats obtenus avec le kit Iam VZV (DiaSorin) concordent à 89% avec ceux de la PCR maison.

VII. Résultats des QCMD 2013

Dix échantillons d'un panel de contrôles de qualité pour la biologie moléculaire (QCMD) ont été extraits avec le *LIAISON® Ixt*, puis testés avec les deux méthodes. Ce panel comportait 8 échantillons positifs et 1 négatif pour le VZV, ainsi qu'un échantillon positif pour HSV-1.

Le kit Iam VZV (DiaSorin) a détecté correctement chacun des échantillons positifs et négatifs.

Le kit VZV R-Gene™ a détecté correctement tous les échantillons, à l'exception d'un positif faible (QCMD n°10 – Tableau 13).

Cet échantillon était quantifié à 118 copies/ml par le fournisseur du panel. Cependant, il est précisé dans le rapport des QCMD 2013 que cette valeur de charge virale est purement indicative et n'est pas spécifique d'une technologie particulière. La différence relevée entre les deux méthodes pour cet échantillon ne semble pas être due à une différence de sensibilité. L'absence de détection peut être liée à la cible de l'amplification. En effet, 30% des paires ciblant la gp19 (comme c'est le cas pour le kit VZV R-Gene™) ne détectent pas cet échantillon. Cependant, la cible du kit Iam VZV n'étant pas précisée par DiaSorin, il n'est pas possible de se baser sur cette hypothèse pour expliquer la différence de résultat.

Les résultats obtenus avec les deux méthodes d'amplification sont conformes à ceux attendus par rapport au groupe de pairs (« PCR en temps réel » pour le kit VZV R-Gene™ et « autres méthodes » pour la LAMP). L'extrait obtenu avec le *LIAISON® Ixt* est donc de bonne qualité ; d'autres méthodes d'extraction utilisées au laboratoire (MAGNA Pure – Roche) n'ont pas permis d'obtenir des résultats aussi concordants.

VIII. Corrélation des résultats positifs

Le test de Grubbs a permis d'éliminer 9 valeurs aberrantes des données exploitées pour l'étude de corrélation. Les prélèvements correspondant à ces points étaient des échantillons faiblement chargés pour 7 d'entre eux (LCR dilués et QCMD faiblement positifs). Les deux prélèvements cutanés aberrants n'ont pas été re-testés, la quantité d'échantillon étant insuffisante pour les ré-extraire.

Après analyse statistique des résultats obtenus par l'étude de corrélation entre le Ct et le temps de positivité pour un même prélèvement, le signal détecté par les deux méthodes d'amplification est statistiquement corrélé ($R^2=0.82$ calculé pour 45 observations).

Un même échantillon extrait soit avec le contrôle interne IC₂, soit avec le contrôle interne DiaSorin (Fig. 18) au cours d'une même série d'extraction donnera un signal comparable entre les deux méthodes. Cette observation démontre qu'au sein d'une même série d'extractions, la qualité de l'extrait obtenue avec le *LIAISON® Ixt* est reproductible et que le contrôle interne employé n'interfère pas dans la détection du génome viral.

Les éléments de comparaison des deux méthodes sont présentés dans le tableau 15.

	VZV R-Gene™ (Argène)	Iam VZV (DiaSorin)
Limite de détection (copies/ml)	10	10
Limite de quantification (copies/ml)	100	100
Contamination	Non	Risque lors de l'aliquotage des extraits
Concordance avec résultats antérieurs	93,90%	89%
QCMD 2013	9 / 10	10 / 10
Echantillon à re-tester	Si détection d'inhibiteur (Différence entre les Ct du contrôle interne de l'échantillon et du contrôle négatif $W_0 > 3$ cycles)	Si profil de double amplification
		Si temps de détection du contrôle interne > 40 min
Nombre maximum de tests par extrait	9	3
Détection d'inhibiteurs	Possible pour extraits positifs et négatifs	Possible uniquement pour échantillons négatifs
Durée globale	2h	1h15 - 1h30
Temps technicien	30 min	30 - 40 min
Amplification	1h30	45 min
Nombre d'échantillons testés par série	Jusque 94	Jusque 14 avec 2 <i>Liaison® Iam</i>

Tableau 15: Comparaison des méthodes d'amplification génique Argène et DiaSorin

IX. Etude bibliographique

La littérature scientifique au sujet de la technologie LAMP s'accroît d'année en année. Du fait de son efficacité, de la rapidité de rendu de résultat et du moindre investissement matériel nécessaire par rapport à la PCR en temps réel, les laboratoires s'y intéressent, particulièrement dans le domaine agro-alimentaire, mais également dans le domaine sanitaire et surtout humanitaire, pour lequel de nombreuses applications sont actuellement en développement. Ci-après sont repris différents points relevés suite à une revue de la littérature au sujet de la technologie LAMP, en comparaison aux résultats de cette étude.

A. Limites de détection

La majorité des études mettent en évidence une sensibilité de la LAMP 10 à 100 fois meilleure par rapport à la PCR, qu'il s'agisse de détection de génome viral (ADN ou ARN), fongique ou parasitaire [90 – 93]. Nous ne retrouvons pas cette observation au cours de notre étude : cela peut être lié à une moindre affinité des amorces pour leur cible ou un défaut de concentration en réactifs (amorces, ADN polymérase...). La société DiaSorin n'ayant pas communiqué la composition de ses réactifs pour des raisons de confidentialité, il semble difficile de conclure quant à la cause de cette différence.

B. Test de contamination

Aux débuts de la technologie LAMP, les produits d'amplification étaient détectés par électrophorèse en gel d'agarose ou après adjonction d'un agent colorant intercalant (SYBR® Green, LFD...). Le nombre d'amplicons obtenus avec la LAMP étant très important, l'ouverture des tubes au moment du dépôt ou de l'ajout du colorant était particulièrement à risque de contamination croisée [93, 94]. Les méthodes de détection ont été adaptées pour limiter ce risque (turbidimétrie [95], fluorescence en temps-réel [96], complexation des pyrophosphates avec la calcéine [76]...).

Dans notre étude, en ce qui concerne les prélèvements détectés positifs par la LAMP et négatifs par les deux méthodes de PCR, une contamination post-amplification est impossible car, une fois les bouchons des barrettes réactionnelles fermés, il est impossible de les rouvrir : l'amplification et sa détection se font au cours de la même étape. S'il s'agit de contaminations, elles se sont donc produites au cours de la préparation des échantillons. A l'heure actuelle, il ne semble pas exister dans la littérature de données au sujet de contaminations lors de la préparation des échantillons pour les méthodes basées sur cette technologie.

C. Concordance des résultats

De nombreuses études comparent la LAMP à la PCR en temps réel, en prenant cette dernière comme référence. Dans notre étude, les résultats concordent à 89% entre la LAMP et la PCR maison. Ce taux est du même ordre de grandeur que dans la littérature, allant de 89 à 96% [97 – 100].

D. Corrélation entre les prélèvements positifs

Après exclusion des points aberrants, le signal obtenu avec les deux méthodes commerciales semble corrélé pour un même échantillon de départ. Cette observation se retrouve également dans quelques publications : pour une même charge virale, la corrélation entre la PCR en temps-réel et la technologie LAMP est relevante [99, 101, 102].

Cela a été utilisé pour développer des techniques de LAMP quantitative, dont certaines sont déjà commercialisées : Parvovirus B19, BK-Virus, *Toxoplasma gondii* (DiaSorin), *Mycobacterium tuberculosis* (Eiken®)...

E. Aspects pratiques

La LAMP présente l'avantage sur le terrain d'être une méthode de diagnostic rapide, l'amplification durant généralement moins d'une heure [90, 91, 103]. De plus, la réaction peut être réalisée directement à partir des prélèvements humains, tel que le sérum, sans nécessité d'extraction et de purification préalables [77, 98]. Enfin, l'amplification isotherme permet de simplifier considérablement l'appareillage nécessaire à la réalisation de cette réaction, par rapport aux besoins de la PCR en temps réel [104], [105].

Le principal aspect relevé dans notre étude est un rendu de résultat plus rapide. Les autres avantages relevés dans la littérature concernent plutôt les laboratoires n'étant pas encore équipés de structure de biologie moléculaire : le développement de nouveaux kits commerciaux basés sur la technologie LAMP pourrait ainsi permettre l'implantation de la biologie moléculaire dans ces laboratoires, sans nécessiter un investissement financier trop important.

CONCLUSION

La recherche du génome viral par biologie moléculaire est une alternative intéressante dans la démarche diagnostique de l'infection par le VZV. Elle permet de compléter une culture cellulaire souvent longue et moins sensible, et constitue un apport intéressant aux cliniciens dans les cas atypiques.

Ce travail avait pour but de comparer deux méthodes commerciales de détection du génome viral par PCR en temps réel (kit VZV R-GeneTM – Argène) ou par la technologie LAMP (kit Iam VZV – DiaSorin).

Les deux méthodes d'amplification génique présentent des performances comparables, et permettent d'obtenir des résultats concordants avec la technique employée antérieurement au laboratoire. En prenant en compte les aspects pratiques, bien que le kit Iam VZV ait l'avantage d'un rendu de résultat dans un délai plus court, il apparaît que le kit VZV R-GeneTM concorde mieux avec les besoins du laboratoire. En effet, le risque de contamination inter-échantillons au cours de l'amplification est moins important avec le kit VZV R-GeneTM ; il est possible d'effectuer un plus grand nombre de tests par extrait, ce qui est appréciable quand les cliniciens souhaitent ajouter des analyses suite aux premiers résultats obtenus. Enfin, il est possible d'intégrer un plus grand nombre d'échantillons par série.

Sur la base de ces éléments, le laboratoire a retenu le kit VZV R-GeneTM (Argène) pour le diagnostic de l'infection par le VZV par biologie moléculaire.

ANNEXES

Echantillon	PCR maison	VZV R-Gene™	Iam VZV
C1	P	P	P
C2	P	P	P
C3	P	P	P
C4	P	P	P
C5	P	P	P
C6	P	P	P
C7	P	P	P
C8	P	P	P
C9	P	P	P
C10	P	P	P
C11	P	P	P
C12	P	P	P
C13	P	P	P
C14	P	P	P
C15	P	P	P
C16	P	P	P
C17	P	P	P
C18	P	P	P
C19	P	P	P
C20	P	P	P
C21	P	P	P
C22	P	P	P
C23	P	P	P
C24	P	P	P
C25	P	P	P
C26	P	P	P
C27	P	P	P
C28	P	P	P
C29	P	P	P
C30	P	P	P
C31	P	P	P

Echantillon	PCR maison	VZV R-Gene™	Iam VZV
C32	N	N	(P) - N
C33	N	N	N
C34	N	N	N
C35	N	N	N
C36	N	N	N
C37	N	N	P
C38	N	N	N
C39	N	N	N
C40	N	N	N
C41	N	N	N
C42	N	N	P
C43	N	N	N
C44	N	N	N
C45	N	N	P
C46	N	N	N

Annexe 1 : Comparaison des résultats des prélèvements cutanés

Echantillon	PCR maison	VZV R-Gene™	Iam VZV
L1	P	P	P
L2	P	P	P
L3	P	P	P
L4	P	P	P
L5	P	P	P
L6	P	N	N
L7	P	P	P
L8	P	P	P
L9	P	P	P
L10	P	P	P
L11	P	N	N
L12	P	P	N
L13	P	P	P
L14	P	N	N
L15	P	N	N
L16	P	P	P
L17	P	P	P
L18	P	P	P
L19	P	P	P
L20	P	N	P
L21	P	P	P
L22	P	P	P

Echantillon	PCR maison	VZV R-Gene™	Iam VZV
L23	N	N	N
L24	N	N	N
L25	N	N	N
L26	N	N	P
L27	N	N	N
L28	N	N	N
L29	N	N	N
L30	N	N	N
L31	N	N	N
L32	N	N	N
L33	N	N	N
L34	N	N	N
L35	N	N	N
L36	N	N	N

Annexe 2 : Comparaison des résultats des LCR



Certificate of Analysis

Product Name:	AcroMetrix VZV CSF High Control
Catalog Number:	95-4512
Lot Number:	220801
Expiration Date:	2014 - 01
Viral Source:	Varicella Zoster Virus (VZV)
Diluent:	OptiMatrix Clear
Preservative:	Proclin 300
Fill Volume:	0.5 mL
Storage:	≤ -20°C

Summary of Quality Control Release Testing Results

Product Description	Extraction Method	Assay	Titer Assignment	Result
AcroMetrix VZV CSF High Control	Qiagen MinElute Virus Spin Kit	altona RealStar VZV PCR Assay	1.00 x 10 ⁵ C/mL ± 0.15 log ₁₀ C/mL	Pass

Test Method	Acceptance Criteria	Result
Spreadplate Bioburden	≤ 10 CFU/mL	0 CFU/mL

Precautions

Observe universal precautions for prevention of transmission of infectious agents when handling these materials.

Intended Use

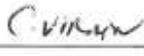
This product is for Research Use Only (RUO). Not for use in diagnostic procedures.

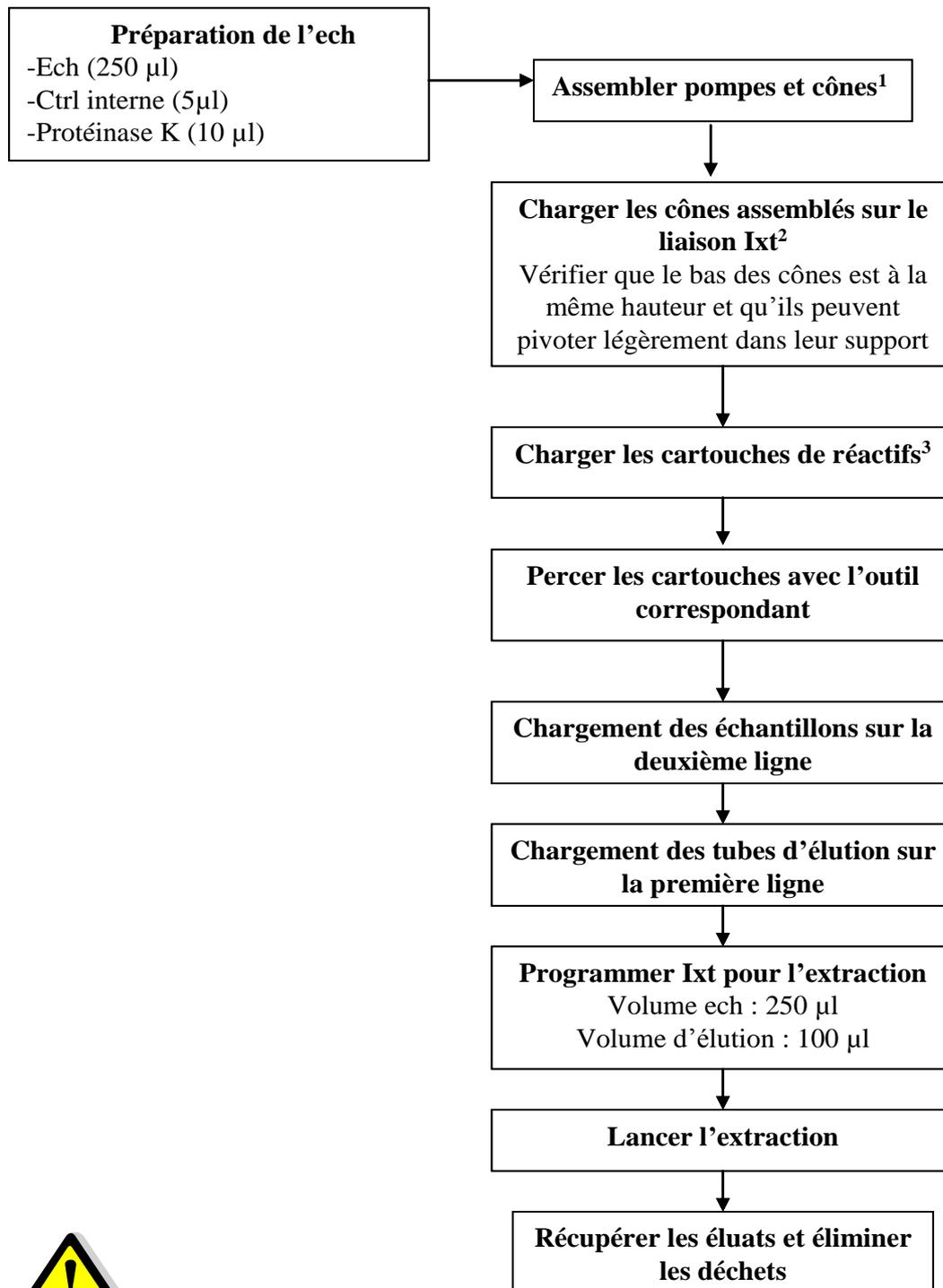
CERTIFICATION

The product described above meets all Quality Control performance specifications:

Name: Cynthia Virata

Title: Quality Supervisor

Signature:  **Date:** 29 Aug 12



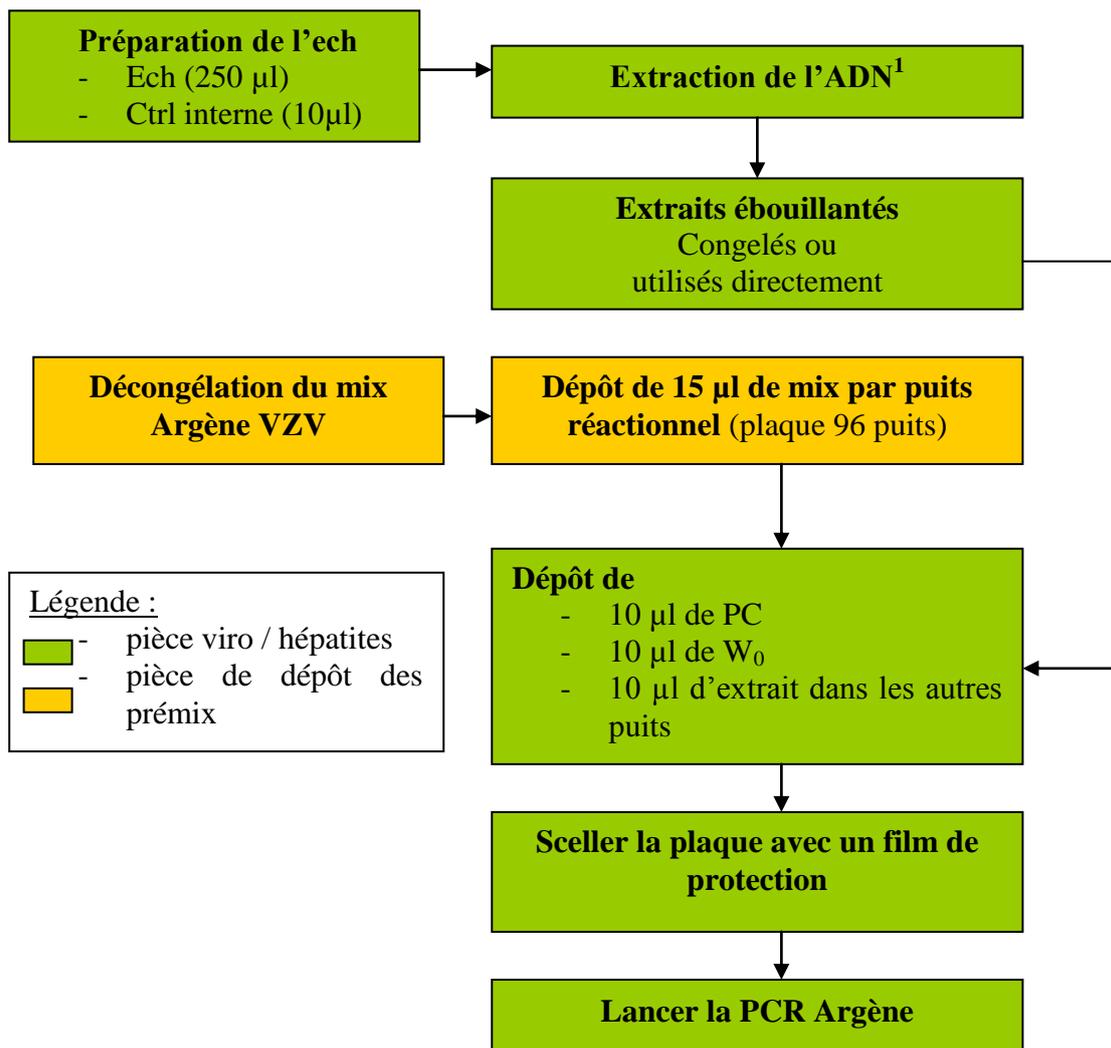
¹ Bien appuyer – intervalle entre bas de la pompe et rigole du cône < pointe d'un stylo
² Haut de la pompe dans l'encoche correspondante – rigole du cône dans la corniche
³ Languette de la cartouche vers l'avant de l'appareil – Vérifier que les cartouches sont bien insérées

Important : Durée de conservation des extraits :

-éluats : 24h à 4°C ou indéfiniment à -20°C

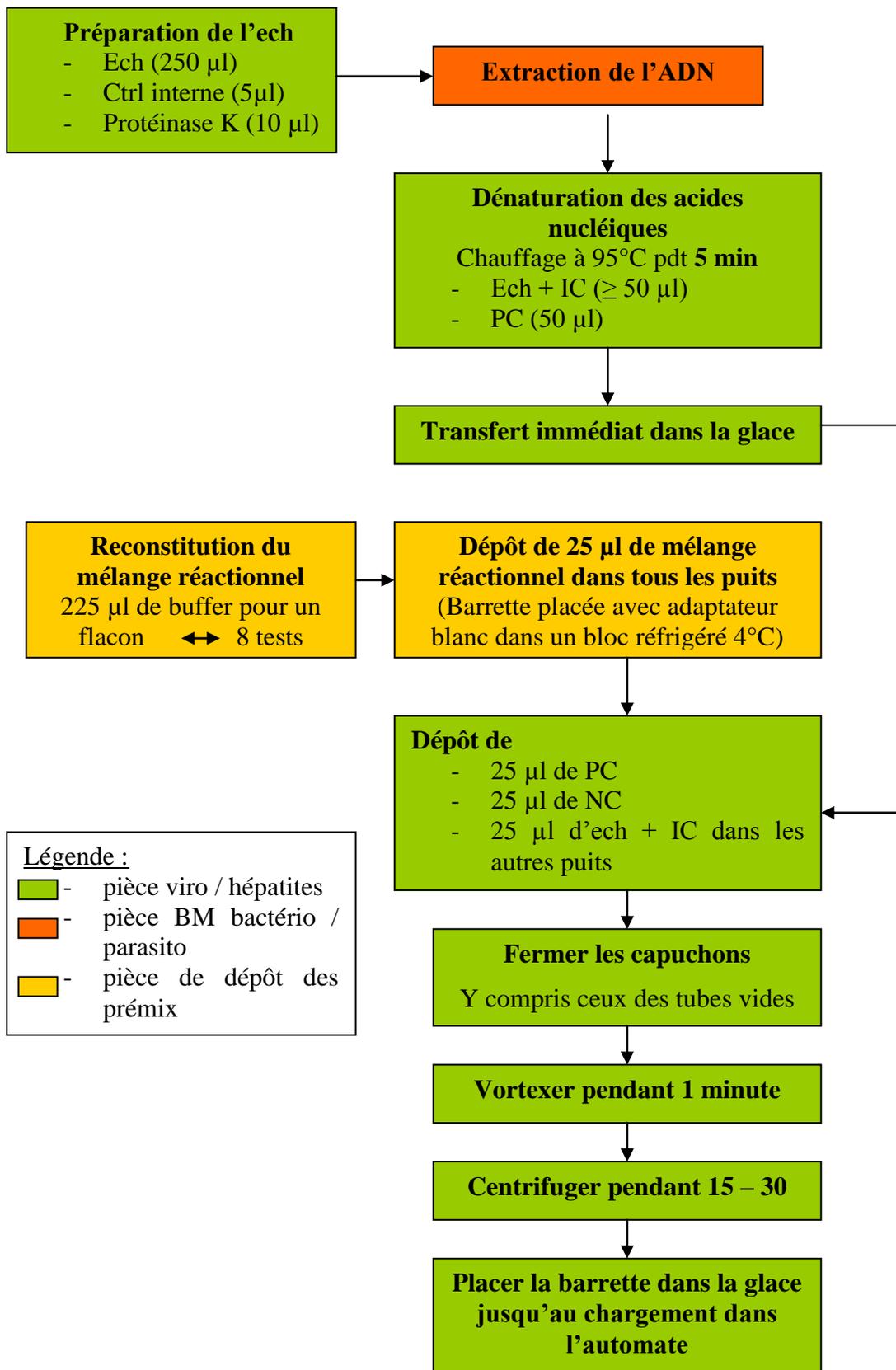
-éluats dénaturés : 7-14j à 4 °C

Annexe 4 : Mode opératoire du *Liaison*® Ixt en association avec le kit Arrow Viral NA (DiaSorin)



¹ Cf MO Liaison Ixt





Important : Durée de conservation des extraits :

- éluats : 24h à 4°C ou indéfiniment à -20°C
- éluats dénaturés : 7-14j à 4 °C



Annexe 6 : Mode opératoire du *Liaison® Iam* en association avec le kit *Iam VZV (DiaSorin)*

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, *E. PILLY - Généralités sur les infections à Herpès virus*, 2010th ed. VIVACTIS, pp. 336–337.
- [2] C. Evans, G. Kudesia, and M. McKendrick, “Management of herpesvirus infections,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 42, no. 2, pp. 119–28, Aug. 2013.
- [3] Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française, “Prise en charge des infections à VZV; 11ème conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse,” 1998, pp. 1–8.
- [4] I. Steiner, P. Kennedy, and A. Pachner, “The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster,” *Lancet Neurol.*, vol. 6, pp. 1015–1028, 2007.
- [5] M. Paltiel, “Adult and Pediatric Dermatology, Herpes zoster,” 2009. [Online]. Available: <http://adultandpediatricdermatology.com/shingles.php>.
- [6] S. Vleck, S. Oliver, J. Brady, H. Blau, J. Rajamani, M. Sommer, and A. M. Arvin, “Structure–function analysis of varicella-zoster virus glycoprotein H identifies domain-specific roles for fusion and skin tropism,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, pp. 18412–18417, 2011.
- [7] J. Chen, Z. Zhu, A. Gershon, and M. Gershon, “Mannose 6-phosphate receptor dependence of varicella zoster virus infection in vitro and in the epidermis during varicella and zoster,” *Cell*, vol. 119, no. 7, pp. 915–926, Dec. 2004.
- [8] Z. Zhu, M. Gershon, R. Ambron, C. Gabel, and A. Gershon, “Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 8, pp. 3546–3550, Apr. 1995.
- [9] D. Harper, R. Gilbert, and D. Jeffries, “Molecular biology of varicella-zoster virus,” *J. Infect.*, vol. 36, no. 1, pp. 1–10, 1998.
- [10] “Human herpesvirus 3 (ID 5313) - Genome - NCBI.” [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/doc-distant.univ-lille2.fr/genome/?term=varicella+zoster+virus>. [Accessed: 23-Feb-2014].
- [11] Collège des Enseignants de Dermatologie de France, “Infections à herpès virus de l’enfant et de l’adulte immunocompétent: varicelle et zona,” *Ann. Dermatol. Venereol.*, vol. 139, pp. A22–28, Oct. 2012.
- [12] U. Heininger and J. F. Seward, “Varicella,” *Lancet*, vol. 368, no. 9544, pp. 1365–1376, Oct. 2006.
- [13] S. Lolekha, W. Tanthiphabha, P. Sornchai, P. Kosuwan, S. Sutra, B. Warachit, S. Chup-Upprakarn, Y. Hutagalung, J. Weil, and H. Bock, “Effect of climatic factors and population density on varicella zoster virus epidemiology within a tropical country,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 64, no. 3–4, pp. 131–136, 2001.

- [14] “Réseau Sentinelles > France > Maladies surveillées,” 2013. [Online]. Available: <http://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb/?rub=22&mal=7>.
- [15] A. Fillet, “Histoire naturelle de l’infection à VZV: physiopathologie, mécanismes d'action et critères virologiques d'évaluation des antiviraux,” *Médecine Mal. Infect.*, vol. 28, pp. 767–774, 1998.
- [16] S. Mathis, R. Gil, and J. P. Neau, “Mise au point Le zona et ses complications neurologiques,” *Rev. Neurol.*, vol. 162, no. 8–9, pp. 879–887, 2006.
- [17] B. Yawn and D. Gilden, “The global epidemiology of herpes zoster,” *Neurology*, vol. 81, no. 10, pp. 928–930, Sep. 2013.
- [18] R. Laurent, “Varicelle – Zona,” *EMC - Médecine*, vol. 2, no. 3, pp. 276–283, Jun. 2005.
- [19] A. M. Arvin, “Varicella-Zoster Virus,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 9, no. 3, pp. 361–381, 1996.
- [20] J. Moffat, M. Stein, H. Kaneshima, and A. M. Arvin, “Tropism of varicella-zoster virus for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes and epidermal cells in SCID-hu mice.,” *J. Virol.*, vol. 69, no. 9, 1995.
- [21] L. Zerboni, M. Sommer, C. F. Ware, and A. M. Arvin, “Varicella-zoster virus infection of a human CD4-positive T-cell line.,” *Virology*, vol. 270, no. 2, pp. 278–85, May 2000.
- [22] L. Requena and C. Requena, “Histopathology of the more common viral skin infections,” *Actas Dermo-Sifiliográficas - English Ed.*, vol. 101, no. 3, pp. 201–216, 2010.
- [23] “Varicella Zoster Virus: Chicken Pox.” [Online]. Available: <http://varicellazoster.net/chicken-pox.html>. [Accessed: 21-Feb-2014].
- [24] N. Baird, X. Yu, R. Cohrs, and D. Gilden, “Varicella zoster virus (VZV)-human neuron interaction,” *Viruses*, vol. 5, no. 9, pp. 2106–2115, Jan. 2013.
- [25] C. Smith and R. Khanna, “Immune regulation of human herpesviruses and its implications for human transplantation,” *Am. J. Transplant.*, vol. 13, no. 1, pp. 9–23, Feb. 2013.
- [26] A. Abendroth and A. M. Arvin, “Immune evasion as a pathogenic mechanism of varicella zoster virus,” *Semin. Immunol.*, vol. 13, no. 1, pp. 27–39, Feb. 2001.
- [27] D. Gilden and A. Dueland, “Varicella-zoster virus reactivation without rash,” *J. Infect. Dis.*, vol. 16, Suppl , pp. S30–4, Aug. 1992.
- [28] J. Moffat, C. Ku, L. Zerboni, M. Sommer, and A. M. Arvin, “VZV: pathogenesis and the disease consequences of primary infection,” in *Human Herpesviruses*, Cambridge University Press, Ed. 2007, pp. 1–12.

- [29] K. V. Asse, H. Rekik, J. C. Ropert, H. Pejoan, and G. Kharsa, "Fulminant pneumonia during varicella in an immunocompetent 16-month-old girl," *Arch. pédiatrie*, vol. 19, no. 10, pp. 1074–1078, Oct. 2012.
- [30] A. Abdelghani, S. Slama, A. Hayouni, H. Njima, S. Mezghani, N. Klabi, A. Garrouche, M. Benzarti, and M. Jerray, "Varicella pneumonia: a serious complication of varicella in adults," *Rev. Pneumol. Clin.*, vol. 65, no. 1, pp. 9–12, Feb. 2009.
- [31] "Atlas d'imagerie - Pneumopathie varicelleuse." [Online]. Available: <http://www.atlas-imagerie.fr/cas/pneumopathie-varicelleuse.html>. [Accessed: 23-Feb-2014].
- [32] A. H. Mohsen and M. McKendrick, "Varicella pneumonia in adults," *Eur. Respir. J.*, vol. 21, no. 5, pp. 886–891, May 2003.
- [33] R. J. Morales, J. Tillier, and P. Davous, "Diplégie faciale au cours d'une neuropathie démyélinisante inflammatoire aiguë secondaire à une varicelle," *Rev. Neurol. (Paris)*, vol. 165, no. 10, pp. 836–838, 2009.
- [34] V. Mirlesse, J. F. Magny, and Y. Solé, "Infections à VZV. Formes de la femme enceinte et du nouveau-né," *Médecine Mal. Infect.*, vol. 28, no. 11, pp. 782–790, Nov. 1998.
- [35] J. Harger, J. Ernest, G. Thurnau, A. Moawad, V. Momirova, M. Landon, R. Paul, M. Miodovnik, M. Dombrowski, B. Sibai, and P. Van Dorsten, "Risk factors and outcome of varicella-zoster virus pneumonia in pregnant women," *J. Infect. Dis.*, vol. 185, pp. 422–427, 2002.
- [36] R. Lamont, J. Sobel, D. Carrington, S. Mazaki-Tovi, J. Kusanovic, E. Vaisbuch, and R. Romero, "Varicella-zoster virus (chickenpox) infection in pregnancy," *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 118, no. 10, pp. 1155–1162, Sep. 2011.
- [37] C. K. Smith and A. M. Arvin, "Varicella in the fetus and newborn," *Semin. Fetal Neonatal Med.*, vol. 14, pp. 209–217, 2009.
- [38] P. Brunell and G. Kotchmar, "Zoster in infancy □: failure to maintain virus latency following intrauterine infection," *J. Pediatr.*, vol. 98, no. 1, pp. 71–73, Jan. 1981.
- [39] R. H. Dworkin, R. W. Johnson, J. Breuer, J. W. Gnann, M. J. Levin, M. Backonja, R. F. Betts, A. Gershon, M. L. Haanpaa, M. W. McKendrick, T. J. Nurmikko, A. L. Oaklander, M. N. Oxman, D. Pavan-Langston, K. L. Petersen, M. C. Rowbotham, K. E. Schmader, B. R. Stacey, S. K. Tyring, A. J. M. van Wijck, M. S. Wallace, S. W. Wassilew, and R. J. Whitley, "Recommendations for the management of herpes zoster," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 44 Suppl 1, pp. S1–S26, 2007.
- [40] M. Pogrel and C. Miller, "A case of maxillary necrosis," *J. oral Maxillofac. Surg.*, vol. 61, no. 4, pp. 489–93, Apr. 2003.
- [41] M. Haanpaa, P. Dastidar, A. Weinberg, M. Levin, A. Miettinen, A. Lapinlampi, P. Laippala, and T. Nurmikko, "CSF and MRI findings in patients with acute herpes zoster," *Neurology*, vol. 51, no. 5, pp. 1405–1411, Nov. 1998.

- [42] D. Gilden, R. Cohrs, R. Mahalingam, and M. Nagel, "Varicella zoster virus vasculopathies: diverse clinical manifestations, laboratory features, pathogenesis, and treatment," *Lancet Neurol.*, vol. 8, no. 8, pp. 731–740, Aug. 2009.
- [43] K. Schmader and R. Dworkin, "Natural history and treatment of herpes zoster," *J. pain*, vol. 9, no. 1 Suppl 1, pp. S3–S9, Jan. 2008.
- [44] CDC, "Prevention of Varicella: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)," 2007. [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5604a1.htm>. [Accessed: 23-Feb-2014].
- [45] Biotest, "Varitect® Résumé des caractéristiques du produit," 2008.
- [46] "ATU nominatives - ANSM: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé," 2013. [Online]. Available: [http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-Temporaires-d-Utilisation-ATU/ATU-nominatives/\(offset\)/2](http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-Temporaires-d-Utilisation-ATU/ATU-nominatives/(offset)/2). [Accessed: 23-Feb-2014].
- [47] A. M. Arvin, "Varicella-zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 230, pp. 219–230, 2000.
- [48] Y. Asano, "Clinicopathologic understanding and control of varicella-zoster virus infection," *Vaccine*, vol. 26, no. 50, pp. 6487–6490, Nov. 2008.
- [49] A. Flatt and J. Breuer, "Varicella vaccines," *Br. Med. Bull.*, vol. 103, no. 1, pp. 115–27, Sep. 2012.
- [50] HCSP, "Recommandations vaccinales concernant la varicelle," 2007, pp. 1–77.
- [51] GSK, "Priorix tetra® - Monographie de produit," 2013.
- [52] Merck, "ProQuad® - Highlights of prescribing information," 2005.
- [53] HAS, "Avis de la commission de la transparence du 7 janvier 2009 au sujet de Varivax®," 2009.
- [54] HAS, "Avis de la commission de la transparence du 25 juin 2008 au sujet de Varilrix®," 2008.
- [55] E. Shapiro, M. Vazquez, D. Esposito, N. Holabird, S. Steinberg, J. Dziura, P. LaRussa, and A. Gershon, "Effectiveness of 2 doses of varicella vaccine in children," *J. Infect. Dis.*, vol. 203, no. 3, pp. 312–315, Feb. 2011.
- [56] M. Brisson, W. J. Edmunds, and N. J. Gay, "Varicella vaccination: impact of vaccine efficacy on the epidemiology of VZV," *J. Med. Virol.*, vol. 70 Suppl 1, pp. S31–7, Jan. 2003.
- [57] Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, "Avis du 19/03/2004 relatif à la vaccination contre la varicelle," 2004.

- [58] Haut Conseil de Santé Publique, “Avis du 25/10/2013 relatif à la vaccination des adultes contre le zona avec le vaccin Zostavax®,” 2013.
- [59] Ministère des affaires sociales et de la Santé, “Calendrier vaccinal et recommandations vaccinales 2013 du ministère des affaires sociales et de la santé, selon l’avis du Haut Conseil de la Santé Publique.,” 2013, p. 26.
- [60] “Résumé des caractéristiques du produit: Varilrix®,” 2013.
- [61] “Résumé des caractéristiques du produit: Varivax®,” 2013.
- [62] M. N. Oxman and M. J. Levin, “Vaccination against Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia,” *J. Infect. Dis.*, vol. 197 Suppl, no. Suppl 2, pp. S228–236, Mar. 2008.
- [63] N. Desai and C. Rodrigues, “Serology of herpes viruses,” *Pediatr. Infect. Dis.*, vol. 5, no. 1, pp. 35–37, 2013.
- [64] M. Koskiniemi, H. Piiparinen, T. Rantalaiho, P. Eränkö, M. Färkkilä, K. Räihä, E. M. Salonen, P. Ukkonen, and A. Vaheri, “Acute central nervous system complications in varicella zoster virus infections.,” *J. Clin. Virol.*, vol. 25, no. 3, pp. 293–301, Dec. 2002.
- [65] D. A. Wilson, B. Yen-Lieberman, S. Schindler, K. Asamoto, J. D. Schold, and G. W. Procop, “Should varicella-zoster virus culture be eliminated? A comparison of direct immunofluorescence antigen detection, culture, and PCR, with a historical review.,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 12, pp. 4120–4122, Dec. 2012.
- [66] A. Mammette, *Virologie médicale*. Presses universitaires de Lyon, 2002, pp. 503–510.
- [67] J. Augier and A. Dewilde, “Mise en évidence du virus de la varicelle et du zona par immunofluorescence indirecte,” Lille, 2010.
- [68] “Abcam site: Anti-Varicella Zoster Virus IE62 antibody.” [Online]. Available: http://www.abcam.com/varicella-zoster-virus-ie62-antibody-8b11-ab52554.html#description_images_1. [Accessed: 23-Feb-2014].
- [69] V. Mathys, P. Lefèvre, V. Fontaine, M. Dehem, P. Y. Donnio, F. Février, A. Le Coustoumier, and P. Bifani, “La PCR en temps réel □ : principe et application en infectiologie,” *Antibiotiques*, vol. 9, no. 3, pp. 205–211, 2007.
- [70] “[EIKEN CHEMICAL] | Press Releases.” [Online]. Available: <http://www.eiken.co.jp/en/news/>. [Accessed: 23-Feb-2014].
- [71] H. HIRAYAMA, “SRD Young Investigator Award 2012: Embryo Sexing and Sex Chromosomal Chimerism Analysis by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Cattle and,” *J. Reprod. ...*, vol. 59, no. 4, 2013.
- [72] Y. Shao, S. Zhu, C. Jin, and F. Chen, “Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 148, no. 2, pp. 75–79, Aug. 2011.

- [73] Foundation for Innovative New Diagnostics, “Le test LAMP ouvre de nouvelles perspectives pour l’élimination du paludisme,” 2013.
- [74] T. Notomi and H. Okayama, “Loop-mediated isothermal amplification of DNA,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 12, p. e63, Jun. 2000.
- [75] K. W. Soli, M. Kas, T. Maure, M. Umezaki, A. Morita, P. M. Siba, A. R. Greenhill, and P. F. Horwood, “Evaluation of colorimetric detection methods for Shigella, Salmonella, and Vibrio cholerae by loop-mediated isothermal amplification.,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 77, no. 4, pp. 321–323, Dec. 2013.
- [76] N. Tomita, Y. Mori, H. Kanda, and T. Notomi, “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products.,” *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 5, pp. 877–882, Jan. 2008.
- [77] H. Kaneko, T. Kawana, E. Fukushima, and T. Suzutani, “Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances.,” *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 70, no. 3, pp. 499–501, Apr. 2007.
- [78] S. Fu, G. Qu, S. Guo, L. Ma, N. Zhang, S. Zhang, S. Gao, and Z. Shen, “Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification.,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 163, no. 7, pp. 845–850, Apr. 2011.
- [79] “[Eiken GENOME SITE] - Primers.” [Online]. Available: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>.
- [80] “[Eiken GENOME SITE] - The principle of LAMP method.” [Online]. Available: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>.
- [81] “[Eiken GENOME SITE] - Technical information.” [Online]. Available: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/index.html>.
- [82] Argène, “VZV r-gene TM: Notice d’utilisation du produit 71-017FTFRCE_VER5_040111,” 2011.
- [83] “Proteins - Genome - NCBI.” [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/doc-distant.univ-lille2.fr/genome/proteins/5313?project_id=15198. [Accessed: 23-Feb-2014].
- [84] A. J. Davison and J. E. Scott, “The complete DNA sequence of varicella-zoster virus.,” *J. Gen. Virol.*, vol. 67, pp. 1759–1816, Sep. 1986.
- [85] M. Lemdani and C. Pinçon, “Statistique descriptive, Tests paramétriques de comparaison unilatérale ou bilatérale, Tests de liaison,” Lille, 2012.
- [86] “Tables Statistiques.” [Online]. Available: <http://www.agro-montpellier.fr/cnam-lr/statnet/tables.htm#fisher0.05>.
- [87] “Nanodrop ND1000 - Users manual v3.7.” [Online]. Available: <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>. [Accessed: 12-Feb-2014].

- [88] M. Vignoles, J. Bes, S. Magro, N. Raoux, C. Barranger, and M. Joannes, "Development of a new diagnostic tool for the quantitative detection of HSV-1, HSV-2 and VZV DNA," 2008.
- [89] DiaSorin, "Iam VZV, mode d'emploi version VZV-529-02, FR 12/12," 2012.
- [90] M. H. Chen, S. T. Kuo, T. Renault, and P. H. Chang, "The development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of abalone herpesvirus DNA.," *J. Virol. Methods*, vol. 196, pp. 199–203, Feb. 2014.
- [91] C. O. Nzelu, E. A. Gomez, A. G. Cáceres, T. Sakurai, L. Martini-Robles, H. Uezato, T. Mimori, K. Katakura, Y. Hashiguchi, and H. Kato, "Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for Leishmania infection.," *Acta Trop.*, vol. 132C, pp. 1–6, Jan. 2014.
- [92] J. Luo, R. F. Vogel, and L. Niessen, "Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid identification of aflatoxigenic molds and their detection in food samples.," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 159, no. 3, pp. 214–224, Oct. 2012.
- [93] X. Kou, H. Fan, Q. Wu, L. Xue, and J. Zhang, "Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay on rapid and sensitive detection of rotavirus in fecal samples and artificially seeded oysters," *Food Control*, vol. 41, pp. 151–157, Jul. 2014.
- [94] Z. K. Njiru, A. S. J. Mikosza, T. Armstrong, J. C. Enyaru, J. M. Ndung'u, and A. R. C. Thompson, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*," *Neglected Trop. Dis.*, vol. 2, no. 2, p. e147, Jan. 2008.
- [95] A. Sappat, W. Jaroenram, T. Puthawibool, T. Lomas, A. Tuantranont, and W. Kiatpathomchai, "Detection of shrimp Taura syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification using a designed portable multi-channel turbidimeter," *J. Virol. Methods*, vol. 175, no. 2, pp. 141–148, Aug. 2011.
- [96] F. Ahmad, G. Seyrig, and D. Turlousse, "-based fluorescence imaging system for real-time loop-mediated isothermal amplification-based rapid and sensitive detection of waterborne pathogens on microchips," *Biomed. Microdevices*, vol. 13, no. 5, pp. 929–937, Oct. 2011.
- [97] Q. Song, R. Zhu, Y. Sun, L. Zhao, F. Wang, J. Deng, and Y. Qian, "Identification of human metapneumovirus genotypes A and B from clinical specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification," *J. Virol. Methods*, vol. 196, pp. 133–138, Feb. 2014.
- [98] M. Ihira, S. Akimoto, F. Miyake, A. Fujita, K. Sugata, S. Suga, M. Ohashi, N. Nishimura, T. Ozaki, Y. Asano, and T. Yoshikawa, "Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method," *J. Clin. Virol.*, vol. 39, no. 1, pp. 22–26, May 2007.

- [99] Q. Zhang, I. Standish, A. D. Winters, C. Puzach, R. Ulferts, J. Ziebuhr, and M. Faisal, "Development and evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of the fathead minnow nidovirus," *J. Virol. Methods*, Mar. 2014.
- [100] J. Wang, S. Cheng, L. Yi, Y. Cheng, S. Yang, H. Xu, Z. Li, X. Shi, H. Wu, and X. Yan, "Detection of mink enteritis virus by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)," *J. Virol. Methods*, vol. 187, no. 2, pp. 401–405, Feb. 2013.
- [101] C. Russo, G. Pizzichemi, D. Caione, S. Fantinato, D. Cornally, G. Keating, D. Adlerstein, and D. Menichella, "Analytical and clinical evaluation of a quantitative loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Epstein-Barr Virus," 2013.
- [102] C.-H. Wang, K. Lien, J. Wu, and G. Lee, "Assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a microfluidic system with integrated loop-mediated isothermal amplification," *Lab Chip*, vol. 11, no. 8, pp. 1521–1531, Apr. 2011.
- [103] C. Li, Z. Chen, C. Meng, and G. Liu, "Rapid detection of duck hepatitis A virus genotype C using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification," *J. Virol. Methods*, vol. 196, pp. 193–198, Feb. 2014.
- [104] Y. Mori and T. Notomi, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases," *J. Infect. Chemother.*, vol. 15, no. 2, pp. 62–69, Apr. 2009.
- [105] L. Poon, B. Wong, E. Ma, K. Chan, L. Chow, W. Abeyewickreme, N. Tangpukdee, K. Yuen, Y. Guan, S. Looareeswan, and J. Malik Peiris, "Inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification," *Clin. Chem.*, vol. 52, no. 2, pp. 303–306, Feb. 2006.

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE DE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2013/2014

Nom : DUMETZ
Prénom : EDOUARD

Titre du mémoire / thèse :
COMPARAISON DE LA PCR EN TEMPS REEL ET DE LA TECHNOLOGIE LAMP POUR LA DETECTION DU GENOME DU VARICELLA ZOSTER VIRUS

Mots-clés :
PCR EN TEMPS REEL ; LAMP ; VARICELLA ZOSTER VIRUS ; BIOLOGIE MOLECULAIRE

Résumé :

Le diagnostic biologique des infections par le Virus de la Varicelle et du Zona (VZV) repose sur différentes méthodes, parmi lesquelles la biologie moléculaire a pris une place importante.

Cette étude réalisée au laboratoire de Virologie du CHRU de Lille avait pour but de comparer deux kits commerciaux de détection du génome du VZV, l'un basé sur la technologie de la PCR en temps réel et l'autre la technologie LAMP. Les tests ont été effectués sur des échantillons biologiques humains adressés au laboratoire pour le diagnostic d'une infection à VZV et sur des contrôles de qualité ; l'ADN a été extrait grâce à un extracteur automatisé. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la technique de PCR utilisée habituellement au laboratoire.

Les performances analytiques des deux méthodes étaient comparables et les résultats obtenus étaient cohérents avec ceux obtenus avec la PCR maison. L'extracteur a montré des performances satisfaisantes. Cependant, le kit LAMP semblait présenter un risque de contamination supérieur au cours de la manipulation des extraits d'ADN.

La technologie LAMP, récente sur le marché de la biologie moléculaire, est utilisée pour de nombreuses applications à visée agro-alimentaires et humanitaires en raison d'un moindre coût matériel, de la rapidité d'exécution des analyses et de moindres contraintes techniques. Cependant, cette technologie présente moins d'intérêt dans un laboratoire déjà équipé d'automates de biologie moléculaire, et les contraintes techniques du kit LAMP (nombre d'échantillons par série, nombre de tests réalisables par extrait...) sont moins adaptées aux attentes du laboratoire. Le kit LAMP n'a donc pas été retenu pour les besoins du laboratoire, et c'est celui reposant sur la PCR en temps-réel qui a été sélectionné pour le diagnostic de routine des infections par le VZV.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur L. DUBREUIL
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Assesseurs : Madame le Professeur K. FAURE
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Madame le Docteur A. GOFFARD
Maître de Conférences Universitaires – Praticien Hospitalier
Madame le Docteur A. DEWILDE
Maître de Conférences Universitaires – Praticien Hospitalier