



HAL
open science

Impact de la colite à cytomégalovirus sur les poussées de rectocolite hémorragique : approches expérimentales et études cliniques

Alexandre Jentzer

► To cite this version:

Alexandre Jentzer. Impact de la colite à cytomégalovirus sur les poussées de rectocolite hémorragique : approches expérimentales et études cliniques. Virologie. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSES028 . tel-03720530

HAL Id: tel-03720530

<https://theses.hal.science/tel-03720530>

Submitted on 12 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre NNT : 2021LYSES028

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
Opérée au sein de l'**Université Jean Monnet**

Ecole Doctorale N° EDSIS488
Ecole Doctorale Science, Ingénierie, Santé

Spécialité de doctorat : VIROLOGIE

Soutenue publiquement le 22/10/2021, par :

Alexandre Jentzer

**Impact de la colite à cytomégalovirus
sur les poussées de rectocolite
hémorragique : approches
expérimentales et études cliniques**

Devant le jury composé de :

Pr. Bruno POZZETTO	Université Jean Monnet GIMAP CIRI, INSERM U1111	PRESIDENT DE JURY
Pr. Sébastien HANTZ	Université de Limoges UMR Inserm 1092	RAPPORTEUR
Pr. Georges HERBEIN	Université Franche-Comté EPILAB EA 4266	RAPPORTEUR
Dr. Sonia BURREL	Sorbonne Université SU-INSERM UMR-S 1136	EXAMINATRICE
Pr. Xavier ROBLIN	Université Jean Monnet GIMAP CIRI, INSERM U1111	EXAMINATEUR
Dr. Sylvie PILLET	Université Jean Monnet GIMAP CIRI, INSERM U1111	DIRECTRICE DE THESE

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier **Madame le Docteur Sylvie Pillet**, Maitre de Conférence Universitaire Praticien Hospitalier au CHU de Saint Etienne, pour la direction de ce projet de thèse. Ses conseils avisés et son encadrement m'ont aidé à valoriser ce travail.

J'adresse tous mes remerciements à **Monsieur le Professeur Sébastien Hantz** de l'Université de Limoges et **Monsieur le Professeur Georges Herbein** de l'Université Franche-Comté, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie **Madame le Docteur Sonia Burrel**, Maitre de Conférence Universitaire Praticien Hospitalier au CHU de Paris et **Monsieur le Professeur Xavier Roblin** de l'Université Jean Monnet de Saint Etienne pour sa présence en tant qu'examinatrice de ce travail.

J'exprime ma gratitude à **Monsieur le Professeur Bruno Pozzetto** pour ses précieux conseils, sa gentillesse à mon égard, et d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe du GIMAP, qui m'ont apporté de précieuses aides scientifiques et techniques, en particulier Fabienne Jospin, Blandine Noailly pour leur implication quotidienne dans ce projet, ainsi que Nicolas Rochereau, Rémi Gayet, Sébastien Fautoux, Paul Verhoeven et Thomas Bourlet pour leurs conseils avisés.

Je remercie Madame le Docteur Myriam Capone et Madame le Docteur Julie Dechanet-Merville pour leur accueil au sein de leur équipe CNRS de Bordeaux.

Je tiens à remercier l'équipe des Agents Infectieux et d'Hygiène du CHU de Saint Etienne, particulièrement les techniciens de Virologie ainsi que Dylan Viallon pour leurs aides.

Je remercie la grande équipe de l'EFS, particulièrement Monsieur Brice Poreau, Charles-Antoine Arthaud, Marie-Ange Eyraud, Fabrice Cognasse et Hind Hamzeh pour leur bienveillance.

Enfin, je tiens à remercier Monsieur le Professeur Thierry Vincent pour m'avoir libéré le temps nécessaire pour finir ce projet de thèse durant une année d'Assistant Hospitalo-Universitaire au sein du Département d'Immunologie.

TABLE DES MATIERES

Table des matières.....	5
Table des illustrations.....	7
Table des tableaux.....	9
Abréviations	11
Résumé.....	13
Introduction	15
Synthèse Bibliographique.....	17
Le Cytomégalovirus humain (HCMV).....	17
I. Contexte historique et épidémiologie.....	17
II. Structure virale.....	19
III. Transmission de HCMV	20
IV. Le cycle de réplication cellulaire de HCMV	22
V. La latence de HCMV.....	24
VI. Relation hôte pathogène.....	28
VII. Formes cliniques des infections par le HCMV.....	39
VIII. HCMV et traitements	42
La rectocolite hémorragique (RCH)	51
I. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	51
II. Contexte historique et épidémiologie	51
III. Physiopathologie de la RCH	53
IV. Facteurs de risque de la RCH.....	63
V. Diagnostic de la RCH.....	64
VI. Traitements de la RCH	71
Relation entre HCMV et RCH	75

I.	La réactivation de HCMV dans un environnement inflammatoire.....	75
II.	Rationnel et travaux du laboratoire	77
III.	Rédaction d'une revue publiée dans <i>Microorganisms</i> en 2020	79
Travaux personnels.....		105
Modélisation <i>in vitro</i> de l'infection du tissu intestinal par le HCMV		105
I.	Rationnel et objectifs	105
II.	Matériels et Méthodes.....	107
III.	Résultats.....	112
IV.	Discussion	113
Modélisation <i>in vivo</i> de l'infection à CMV dans la RCH : modèle murin de la colite induite par le DSS.....		115
I.	Rationnel et objectifs	115
II.	Matériels et Méthodes.....	121
III.	Résultats.....	130
IV.	Discussion	153
Les facteurs prédictifs de réactivation de HCMV chez les patients atteints de RCH		160
I.	Rationnel et objectifs	160
II.	Recherche de facteurs prédictifs dans la cohorte de patients suivis dans le service de gastro-entérologie du CHU de Saint Etienne	162
III.	Place du test QuantiFERON-CMV	178
IV.	Discussion	179
Conclusion et Perspectives		181
Bibliographie		185
Annexes		207
I.	Revue publiée dans <i>Virologie</i> en 2017	207
II.	Appel d'offre à projet de recherche local : Place du test QuantiFERON-CMV dans la prédiction d'une réactivation colique à cytomégalovirus au cours de la rectocolite hémorragique	224

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Multiplication du CMV en culture de fibroblastes embryonnaires humains (cellules MRC-5)	18
Figure 2 : Analyse en microscope électronique de l'entrée de HCMV dans les cellules ARPE-19.....	18
Figure 3 : Séroprévalence mondiale estimée du cytomegalovirus chez les femmes en âge de procréer.....	19
Figure 4 : Structure du virion de HCMV.....	20
Figure 5 : La balade de HCMV dans l'organisme.....	21
Figure 6 : Rôle des leucocytes dans la dissémination de l'infection.....	22
Figure 7 : Le cycle de HCMV.....	24
Figure 8 : Modèle de régulation de l'expression du promoteur MIEP.....	26
Figure 9 : Schéma des facteurs de régulation qui contrôlent l'activité de MIEP lors de la latence et de la réactivation.....	27
Figure 10 : Stratégies d'évasion immunitaire de CMV centrées sur les cellules NK.....	31
Figure 11 : Représentation générale de la réponse immunitaire cellulaire anti-CMV.....	33
Figure 12 : Evolution des cellules T mémoires.....	35
Figure 13 : Reconnaissance du virus latent par les LT CD8.....	36
Figure 14 : Stratégies d'évasion immunitaire de CMV centrées sur les LT.....	38
Figure 15 : Mécanisme d'action des antiviraux.....	44
Figure 16 : incidence de la rectocolite hémorragique de 1990 à 2016.....	53
Figure 17 : Physiopathologie de la rectocolite hémorragique.....	54
Figure 18 : Migration cellulaire au niveau de la muqueuse intestinale.....	56
Figure 19 : La réponse immunitaire muqueuse dans les MICI.....	57
Figure 20 : Importance de l'axe cerveau-intestin dans la physiopathologie de la rectocolite hémorragique.....	63
Figure 21 : Schéma de la localisation des atteintes de la MC et de la RCH.....	65
Figure 22: Score Mayo et <i>Endoscopic Index of Severity</i>	67
Figure 23 : Classification de Montréal.....	68
Figure 24 : Représentation des différents grades du score de Nancy.....	70
Figure 25 : Cellules HFFF.....	107
Figure 26 : Schéma de la modélisation MCMV/DSS.....	124
Figure 27 : Plage de lyse induite par MCMV.....	131
Figure 28 : Charge virale sanguine lors de différentes voies d'injection de GSMCMV.....	132

Figure 29 : Nombre d'organes infectés lors de différentes voies d'injection de GSMCMV ..	133
Figure 30 : Evolution de la charge virale tissulaire MCMV en fonction du temps	134
Figure 31 : Evolution de la charge virale sanguine MCMV en fonction du temps	136
Figure 32 : Evolution du poids des souris BALB/c	137
Figure 33 : Evolution de l'activité de la colite induite par le DSS.....	138
Figure 34 : Représentation des longueurs de côlon.....	139
Figure 35 : Représentation de la lipocaline fécale dans le modèle de colite induite par le DSS	141
Figure 36 : Score histologique de Nancy dans le modèle de colite induite par le DSS.....	143
Figure 37 : Photographie des tissus de souris infectées par le MCMV	144
Figure 38 : Représentation des paramètres de la numération sanguine	146
Figure 39 : Représentation de la formule lymphocytaire sanguine et du ratio CD4/CD8 des lymphocytes T	148
Figure 40 : Tissus digestifs infectés par le MCMV	150
Figure 41 : Photographie des tissus de souris infectées par le MCMV	151

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Facteurs de risque de maladie à HCMV en greffe d'organe solide.....	41
Tableau 2 : Essais cliniques vaccinaux publiés contre HCMV	46
Tableau 3 : Vaccins contre HCMV en cours de développement	49
Tableau 4 : Caractéristiques histologiques de la RCH et de la MC	69
Tableau 5 : Description des items du score de Nancy	69
Tableau 6 : Facteur de mauvais pronostic de la RCH.....	71
Tableau 7 : Traitements actuels et en cours de développement de la RCH.....	74
Tableau 8 : <i>Disease activity index (DAI)</i>	125
Tableau 9 : Résumés des résultats du modèle MCMV/DSS	153

ABRÉVIATIONS

5-ASA : acide 5-aminosalicylique	KIR : <i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
6-TGN : 6-thioguaninenucleotides	KLRG1 : <i>killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i>
6-TGTP : 6-thioguanine triphosphate	LB : Luria-Bertani
α SMA : <i>alpha smooth muscle actin antibody</i>	LFA : <i>lymphocyte function-associated antigen</i>
ADCC : <i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>	LIR : <i>leukocyte Ig-like receptor</i>
AMM : autorisation de mise sur le marché	LPS : lipopolysaccharide
ANCA : anticorps anti-cytoplasmes des périmucléaires neutrophiles	LSD1 : <i>histone demethylase 1A</i>
AOL : Appel à Projet Local	LT : lymphocyte T
ARNm : ARN messagers	LT _{CM} : <i>LT central memory</i>
ASCA : anticorps anti-Saccharomyces cerevisiae	LT _{EM} : <i>LT effector memory</i>
BAC : <i>bacterial artificial Chromosome</i>	LT _{RM} : <i>LT resident memory</i>
BSA : <i>bovine serum albumin</i>	LT $\gamma\delta$: lymphocytes T gamma delta
CAR : <i>chimeric antigen receptor</i>	MAdCAM-1 : <i>mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1</i>
cGAS-STING Cyclic : <i>GMP-AMP synthase-Stimulator of Interferon Genes</i>	MC : maladie de Crohn
CMC : carboxyméthylcellulose	MCMV : cytomégalovirus murin
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	MEM : <i>Minimum Essential Medium</i>
CMV : cytomégalovirus	MICA : <i>MHC-I related protein A</i>
cmvIL-10 : interleukine-10 de CMV	MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
Cp : copies	MIEP : <i>major IE promoter/enhancer</i>
CPA : cellules présentatrices d'antigène	MIP-2 : <i>Macrophage-Inflammatory Protein 2</i>
CRH : corticotropin-releasing hormone	NET : <i>neutrophil extracellular traps</i>
CRP : <i>C Reactive Protein</i>	NF- κ B : <i>nuclear factor-kappa B (NF-κB)</i>
DAB : diaminobenzidine	NK : <i>Natural killer</i>
DAI : disease activity index	NKG2 : <i>receptor Natural-killer group 2</i>
DC : cellules dendritiques	OCT : <i>optimal cutting compound</i>
DMEM : <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	OR : <i>odds ratio</i>
DNBS : dinitrobenzenesulfonic acid	p.i. : post infection
DO : densité optique	PAMPs : <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
DSS : <i>dextran sodium sulfate</i>	PBS : <i>phosphate-buffered saline</i>
ECP : effet cytopathogène	PDGFR- α : <i>derived growth factor receptor α</i>
EGFR : <i>Epidermal Growth Factor</i>	PFA : paraformaldéhyde
EGFR : <i>epidermal growth factor receptor</i>	PFU : <i>plaque-forming units</i>
ELISA : <i>Enzyme-Linked Immuno Assay</i>	PML : promyelocytic leukaemia
gB : glycoprotéine B	PRRs : <i>pattern recognition receptors</i>
gp : groupe	QF-CMV : <i>QuantiFERON-CMV</i>
GS : glandes salivaires	RCH : rectocolite hémorragique
GSMCMV : MCMV issu des glandes salivaires	RhCMV : rhesus CMV
HCMV : <i>human cytomegalovirus</i>	RIPK : <i>Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase</i>

HFFF : *human fetal foreskin fibroblasts*
HRP : peroxydase de raifort
CSH : cellules souches hématopoïétiques
IE : Immediate–Early
IFN : interferon
Ig : immunoglobuline
IHC : immunohistochimie
IKK : kinase IκB
IL : interleukine
ILC3 : innate lymphocyte cells 3
IL-XR : IL-X Récepteur
IP : intra-péritonéale
IRF : *interferon regulatory factor*
IRL : *internal repeat long*
ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activator motif*
ITIM : *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory*
JMJD3 : *Jumonji domain-containing protein D3*
Kb : *kilo bases*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*
SD : Standard déviation
SEM : *Standard Error of the Mean*
SUMO : *Small Ubiquitin-like Modifier*
SVF : sérum de veau foetal
TE : tampon tampon Tris EDTA
TEMRA : CD45RA⁺ effector memory T cell
TLR : *toll-like receptor*
TMB : tetramethylbenzidine
TNBS : acide trinitrobenzène sulfonique
TNFR : *tumor necrosis factor receptor*
TNFα : *tumor necrosis factor alpha*
Treg : lymphocytes T régulateurs
TRS : *terminal repeat long*
UCEIS : *Endoscopic Index of Severity*
UL : *unique long*
US : *unique short*
VIH : virus de l'immunodéficience acquise

RESUME

La rectocolite hémorragique (RCH), une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, entraîne une inflammation intestinale qui participerait à la réactivation du réservoir latent du cytomégalovirus (CMV). Les colites associées au CMV jouent un rôle péjoratif dans l'évolution clinique de la RCH avec des résistances aux traitements utilisés dans la RCH et une morbi-mortalité augmentée sans en comprendre la physiopathologie. La modélisation *in vitro* et *in vivo* de l'infection intestinale par le CMV permettrait d'améliorer la compréhension de cette relation complexe. Le modèle *in vitro* avait pour objectif la production de virion de HCMV à partir d'une souche virale Merlin permettant d'infecter une lignée cellulaire épithéliale intestinale « Caco-2 » afin de modaliser l'infection de HCMV au niveau de l'épithélium intestinal. Dans cette thèse, un modèle de colite chimique par le DSS de souris BALB/c infectées par le CMV murin (MCMV) a été développé afin d'induire la réactivation virale. Cependant, ce modèle n'a pas permis d'observer que le MCMV majore la colite chimique malgré une infection virale systémique et colique et la présence d'une forte inflammation induite par le DSS. Ces expérimentations ont été complétées par une approche épidémiologique de recherche de facteur prédictif de réactivation virale. Une étude rétrospective a été menée pour examiner les facteurs prédictifs d'absence de colite à CMV dans une cohorte de patients consultant à l'Hôpital Universitaire de Saint-Etienne. Les caractéristiques individuelles, l'activité de la maladie, les traitements immunosuppresseurs et la charge virale tissulaire de CMV n'ont pas été reconnus comme facteurs prédictifs de réactivation de CMV. L'étude d'une cohorte prospective au CHU de Saint-Etienne et de Lyon dont l'objectif est d'évaluer le test biologique QuantiFERON-CMV chez les patients atteints de poussée de RCH. Ce test évalue l'immunité cellulaire anti-CMV et pourrait permettre de classer les patients à fort ou à faible risque de réactivation virale ouvrant la porte à la thérapie personnalisée lors de poussées de RCH chez les patients séropositifs.

Mots clefs : cytomégalovirus, rectocolite hémorragique, modèle murin, réactivation virale, colite associée au CMV

INTRODUCTION

L'équipe du GIMAP (Groupe sur l'Immunité des Muqueuses et des Agents Pathogènes) est forte d'une expérience importante dans l'étude de l'infection par HCMV dans le cadre de la RCH, notamment du fait de la collaboration entre la Virologie, l'Immunologie et la Gastro-entérologie. La thématique rectocolite hémorragique (RCH) / *human cytomegalovirus* HCMV a conduit à plusieurs publications de membres du GIMAP dont les apports scientifiques sont résumés ci-après et rendent compte du rôle péjoratif de HCMV dans la RCH.

Tout d'abord la réactivation de HCMV sous forme de colite à CMV est plus fréquente dans la RCH que dans la maladie de Crohn (Roblin et al. 2012). Afin de diagnostiquer une colite à HCMV dans la RCH, HCMV doit être recherché dans le tissu colique inflammatoire, soit par immunohistochimie (IHC) soit par PCR en temps réel (Zidar et al. 2015; Rahier et al. 2014; Pillet 2016; Pillet et al. 2012). La charge virale HCMV mesurée par PCR quantitative (qPCR) dans au moins 2 biopsies du tissu inflammatoire intestinal permet de prédire la résistance aux corticoïdes et aux autres lignes d'immunosuppresseurs (Roblin et al. 2011; Pillet et al. 2016). Un traitement par ganciclovir permet de réduire la charge virale tissulaire et de restaurer la sensibilité aux immunosuppresseurs (Pillet 2016; Roblin et al. 2011) et l'administration d'anticorps monoclonaux anti-TNF α ne majore pas le risque de réactivation virale ni la charge virale CMV tissulaire (Pillet et al. 2015).

L'objectif de ce travail de thèse est une meilleure compréhension de la relation entre le CMV et la RCH. Pour cela, 3 axes de recherche ont été menés :

- La modélisation *in vitro* de l'infection du tissu intestinal par le HCMV constitue le premier axe. L'objectif de production de virions infectieux permettrait la mise en place d'un modèle *in vitro* de reconstitution d'un épithélium intestinal infecté par HCMV afin d'explorer la relation CMV/muqueuse intestinale inflammatoire et d'étudier diverses stratégies médicamenteuses antivirales ou immunomodulatrices ;
- Le deuxième axe se concentre sur la modélisation *in vivo* de la réactivation virale dans la RCH en développant une colite induite par le *dextran sodium sulfate* (DSS) chez des souris infectées par le MCMV. Ce modèle permettrait d'étudier de nouvelles stratégies thérapeutiques antivirales ainsi qu'une approche de vaccination thérapeutique innovante par transcytose inverse afin de diminuer l'impact de la réactivation virale voire d'éliminer le réservoir viral intestinal ;
- Le troisième axe, plus clinique, correspond à l'étude des facteurs prédictifs de la réactivation colique de HCMV chez les patients atteints de RCH en poussée dans le

but d'améliorer leur prise en charge thérapeutique. Les données cliniques et endoscopiques d'une cohorte rétrospective de patients du CHU de Saint Etienne atteints de RCH en poussée ont été analysées afin d'en faire ressortir les facteurs pouvant prédire une réactivation colique de HCMV. Parallèlement à cela, une étude du test biologique QuantiFERON-CMV qui évalue la réponse spécifique anti-CMV du système immunitaire, est en cours afin de déterminer si ce test permettrait de classer les patients atteints de RCH en groupe à fort ou à faible risque de réactivation virale.

Après une synthèse bibliographique centrée sur le CMV et son impact sur les MICI, et plus particulièrement sur la RCH, je présenterai les travaux qui ont fait l'objet d'une revue générale, d'une publication soumise et d'une publication en cours de rédaction.

Je terminerai mon manuscrit par une conclusion sur mes travaux.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le Cytomégalovirus humain (HCMV)

Dans cette partie introductive autour de HCMV, l'épidémiologie, la structure et la transmission virale ainsi que la réplication et la latence de HCMV seront abordées suivi de la relation hôte pathogènes, des formes cliniques de HCMV et des principaux traitements.

L'ongénèse liée à HCMV ne sera pas abordé dans cette synthèse bibliographique (Herbein 2018) tout comme les aspects en lien avec la vectorisations vaccinales CMV médiées.

I. Contexte historique et épidémiologie

Le cytomégalovirus (CMV) a été baptisé par Thomas H. Weller, Margaret Smith et W.P. Rowe en 1957 devant les effets cytopathogènes observés dans la maladie des inclusions cytomégaliennes du nouveau-né (Figure 1). Dès 1881, H. Ribbert avait déjà observé ces grandes cellules sur des coupes de rein d'enfants mort-nés. A. Jesionek et B. Kiolemenoglou confirmèrent ces images typiques localisées dans différents tissus : les poumons, les reins et le foie de fœtus. Au début des années 1930, plusieurs cas d'infections congénitales mortelles caractérisées par des pétéchies, une hépatosplénomégalie et des calcifications intracérébrales avaient été décrits. Tous les auteurs rapportaient des cellules avec des inclusions intranucléaires typiques. Ce fût en 1953 que Minder a pu identifier, par microscopie électronique, des particules de 200 nm évocatrices d'un virus. Puis, en 1955, Margaret Smith a isolé à partir de la glande salivaire d'un patient décédé un virus qui se multipliait en culture cellulaire humaine mais ne se multipliait pas dans des cellules murines montrant la spécificité de l'hôte de cet agent pathogène. Rowe et coll., qui s'intéressaient aux virus respiratoires, ont isolé en 1956, à partir des amygdales d'un sujet, un virus formant des inclusions intranucléaires dont l'identification a été confirmée par Weller. En effet, Weller utilisa de nouvelles techniques de culture cellulaire dérivées de l'étude des poliovirus afin de cultiver et identifier le virus qui sera ainsi nommé cytomégalovirus (Ho 2008). Par la suite le cycle de HCMV a pu être détaillé par microscopie électronique (Figure 2) et le virus a pu être cultivé et amplifié à partir de lignées fibroblastiques.

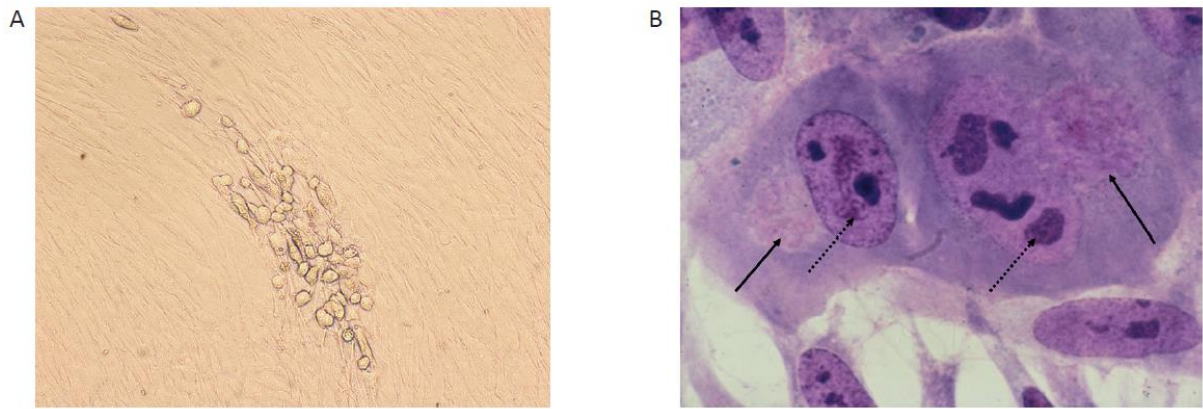


Figure 1 : Multiplication du CMV en culture de fibroblastes embryonnaires humains (cellules MRC-5)
 A. Effet cytopathogène (ECP) de CMV observé à l'état frais
 B. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) permettant de visualiser les inclusions nucléaires (flèches en pointillé) et cytoplasmiques (flèches pleines)
 Issu (Alain et Garrigue 2019)

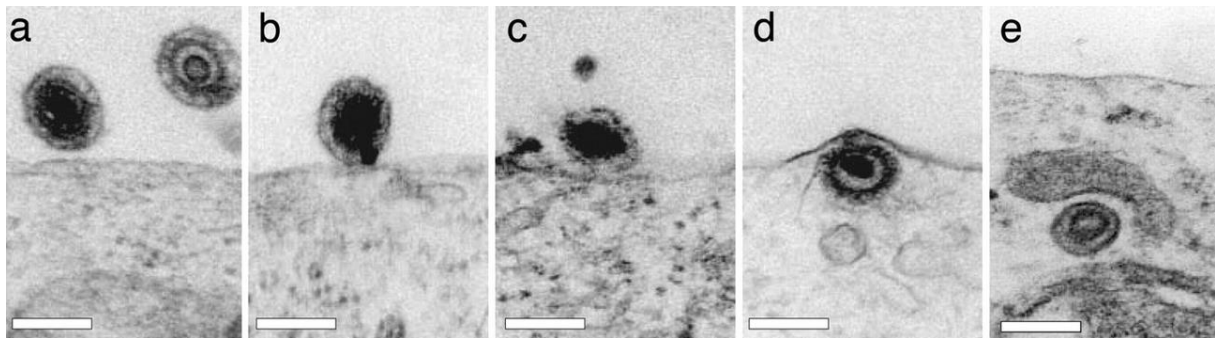


Figure 2 : Analyse en microscope électronique de l'entrée de HCMV dans les cellules ARPE-19.
 Issu de (D. Wang et al. 2007)

Le cytomegalovirus a une prévalence extrêmement variable dans le monde. Devant la gravité de l'infection congénitale, il est intéressant de se concentrer sur les femmes en âge de procréer pour estimer la séroprévalence du virus (Figure 3). Une méta-analyse de 2019 estime une séroprévalence moyenne mondiale de CMV à 83% (IC (intervalle de confiance) 95% : [78-88]) avec la séroprévalence la plus élevée à 90% (IC 95% : [85-94]) en Méditerranée orientale, et une séroprévalence plus faible en Europe, estimée à 66% (95% IC: 56-74) (Zuhair et al. 2019). On retrouve également une prévalence plus élevée chez les individus avec un faible niveau socio-économique avec un risque relatif (RR) de 1,33 (IC 95% [1,32-1,35]) (Cannon, Schmid, et Hyde 2010). En France, la séroprévalence est estimée à 20% à 14 ans chez les adolescentes (N'Diaye et al. 2018) avec une séroprévalence autour de 50% pour les femmes en âge de procréer en France (Zuhair et al. 2019). Ainsi le CMV est un agent pathogène largement disséminé qui atteint une grande

partie de la population mondiale. Cependant dans les pays occidentaux, une proportion importante d'adultes n'est pas immunisée et est à risque de développer une primo-infection, notamment les femmes enceintes.

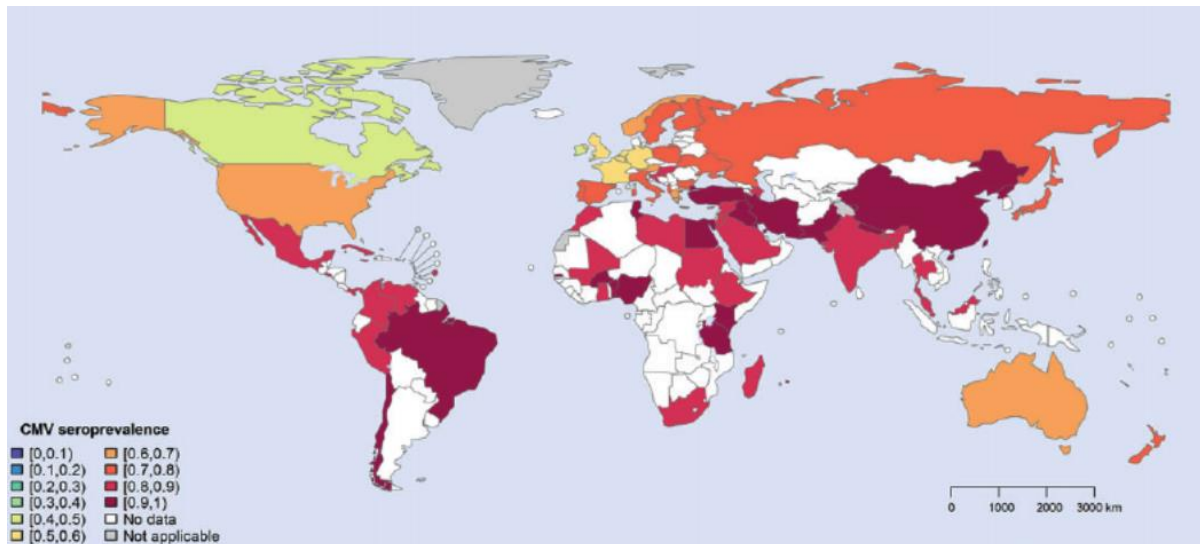


Figure 3 : Séroprévalence mondiale estimée du cytomégalovirus chez les femmes en âge de procréer. Issu de (Zuhair et al. 2019)

II. Structure virale

Le cytomégalovirus humain (HCMV), également appelé *humain herpes virus 5* (HHV-5), appartient à la sous-famille des *Betaherpesvirinae* (Davison 2010). Le CMV mesure de 150 à 200 nm de diamètre. Il est composé de 4 structures fondamentales (Figure 4) (Gugliesi et al. 2020) : une enveloppe en bicouche lipidique (dérivée de la membrane nucléaire et cytoplasmique) contenant des glycoprotéines virales, une matrice protéique (le tégument), une nucléocapside et le génome. HCMV est un virus à ADN double brin d'environ 235 000 paires de bases (235 kb). Le génome est organisé en un segment court ou *unique short* (US) et un segment long ou *unique long* (UL). Chaque segment est flanqué de séquences répétées inversées : les séquences internes *internal repeat long* (IRL) et *internal repeat short* (IRS), et les séquences terminales *terminal repeat long* (TRS) et *terminal repeat short* (TRS) (Figure 4) (Crough et Khanna 2009). Le génome de la souche de référence AD169 code plus de 165 gènes (Chee et al. 1990). La nucléocapside protège son génome ; elle est constituée d'un nombre restreint de protéines dont la *major capsid protein* (MCP) ou pUL86 (Wood et al. 1997). Concernant le tégument, les 2 phosphoprotéines majoritaires sont ppUL83 ou pp65 et ppUL32 ou pp150 (Jahn et al. 1987). L'enveloppe, quant à elle, porte des

glycoprotéines virales, en particulier gpUL55 (glycoprotéine B, gB), gpUL75 (gH), gpUL115 (gL), gpUL74 (gO), gpUL100 (gM), gpUL73 (gN) et les protéines pUL128/pUL130/pUL131 (Ryckman et al. 2008). Ces protéines permettent l'entrée du virus dans les cellules humaines et participent à la spécificité d'espèce et au tropisme cellulaire de HCMV détaillé dans la partie « transmission de HCMV ».

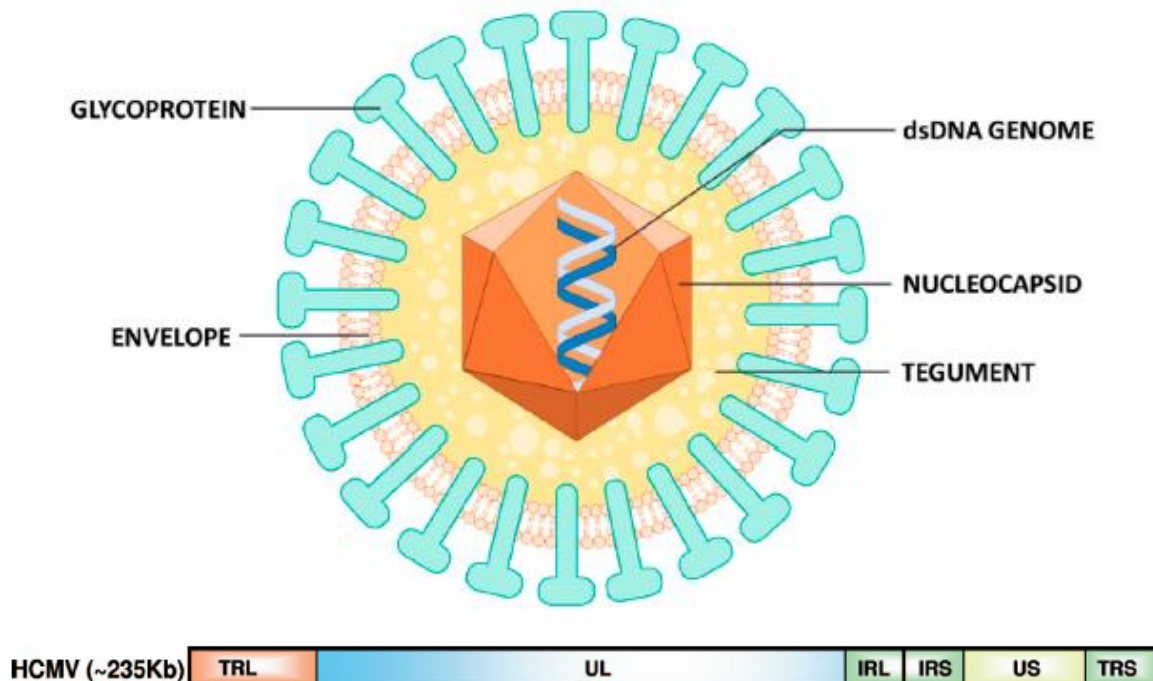


Figure 4 : Structure du virion de HCMV.

L'enveloppe, dans laquelle les glycoprotéines virales sont enchâssées, contient le tégument, la nucléocapside et le génome d'ADN à double brin composé d'un segment court ou unique short (US) et d'un segment long ou unique long (UL). On retrouve des séquences répétées inversées : internal repeat long (IRL), internal repeat short IRS, terminal repeat long et (TRS) et terminal repeat short (TRS).

Adapté de (Crough et Khanna 2009; Gugliesi et al. 2020).

III. Transmission de HCMV

HCMV est un virus enveloppé, fragile, spécifique de l'espèce humaine et qui se transmet par des contacts étroits à partir de sécrétions corporelles (salive, lait maternel, sécrétions génitales) et des fluides biologiques (sang, urines) d'un individu infecté. Le HCMV peut être transmis lors de l'allaitement (Lawrence et Lawrence 2004), d'une transfusion sanguine (Weber et Doerr 1994; Kääriäinen, Klemola, et Paloheimo 1966), d'une transplantation d'organe (Lumbreras et al. 2014) ou d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Chen et al. 2018). La primo-infection s'accompagne d'une dissémination sanguine qui permet au virus d'infecter de nombreux tissus et organes. En effet, HCMV est capable

d'infecter et de se répliquer dans de nombreux types cellulaires *in vivo*. *In vitro*, les cellules primaires permissives à HCMV comprennent notamment les fibroblastes cutanés et pulmonaires, les cellules musculaires lisses vasculaires (Tumilowicz et al. 1985), les cellules épithéliales pigmentaires de la rétine (Tugizov, Maidji, et Pereira 1996), les cellules trophoblastiques placentaires (Halwachs-Baumann et al. 1998), les hépatocytes (C. Sinzger et al. 1999), les cellules cérébrales neuronales et gliales (Poland et al. 1990), les cellules épithéliales rénales (Heieren, Kim, et Balfour 1988), les macrophages dérivés de monocytes (Ibanez et al. 1991), les cellules dendritiques (DC) dérivées de monocytes (Riegler et al. 2000), et les cellules endothéliales vasculaires (Waldman et al. 1989). Toutes ces cellules primaires permettent des cycles de réplication virale complets. La porte d'entrée par voie muqueuse permet à HCMV d'infecter les cellules épithéliales dans un premier temps. La dissémination virale via les cellules hématopoïétiques lui permet d'atteindre les organes comme la rate, les poumons, le foie. Les glandes salivaires, les reins et les glandes mammaires sont également infectés dans un second temps (Figure 5 et Figure 6). Ce tropisme étendu de HCMV facilite sa transmission d'un hôte à l'autre lors de la primo-infection et lors des réactivations virales, ce qui explique en partie la forte séroprévalence observée.

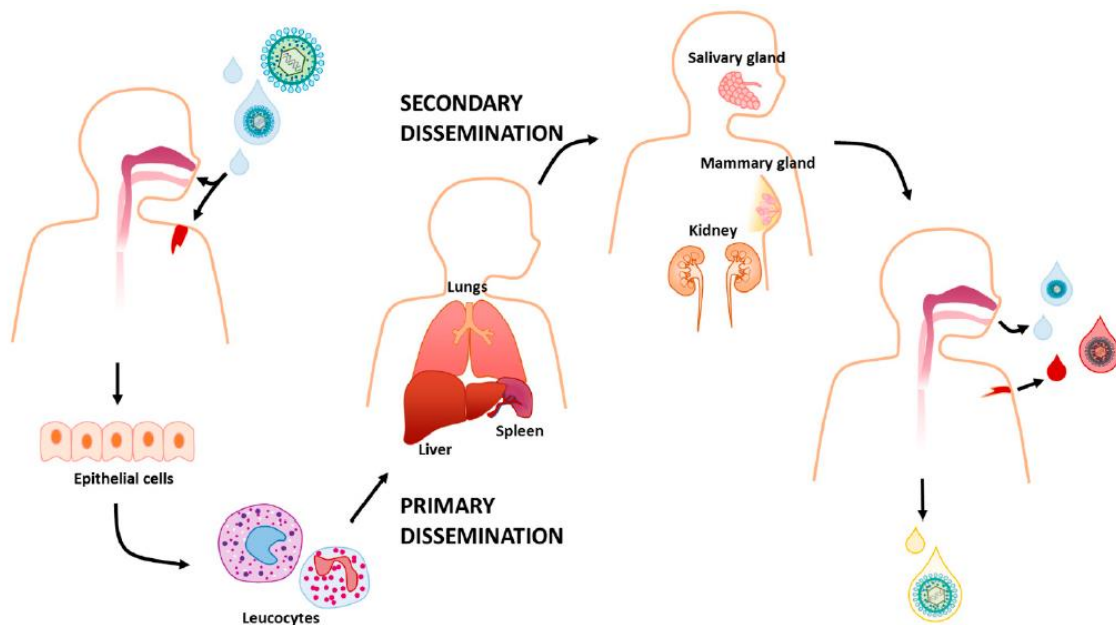


Figure 5 : La balade de HCMV dans l'organisme

Le HCMV peut être transmis par les fluides corporels. Il infecte un nouvel hôte généralement en pénétrant par le tractus gastro-intestinal supérieur ou les voies respiratoires. Les cellules épithéliales sont souvent le premier site d'infection puis HCMV infecte les leucocytes qui permettent la dissémination virale primaire conduisant à l'infection de plusieurs tissus comme les poumons, le foie et la rate. Ensuite, la dissémination virale secondaire propage l'infection vers des organes producteurs de nouveaux virions comme les glandes salivaires et mammaires et les reins qui excrètent le virus. Issu de (Gugliesi et al. 2020)

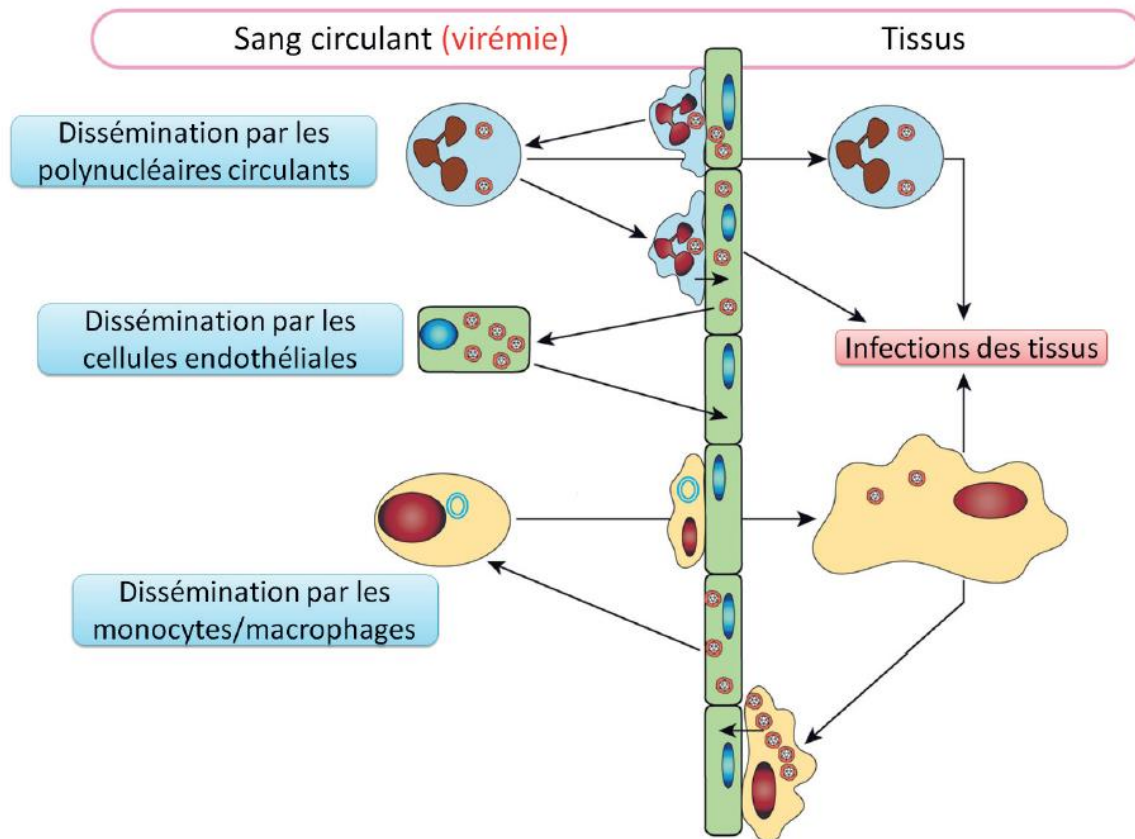


Figure 6 : Rôle des leucocytes dans la dissémination de l'infection

Ces mécanismes de dissémination ont été démontrés *in vitro*. Les cellules endothéliales infectées recrutent les polynucléaires neutrophiles par la sécrétion de chimiokines. Ceux-ci acquièrent le virus par contact direct avec les cellules infectées et participent à la dissémination de l'infection. Les cellules endothéliales, dans lesquelles le virus se multiplie, peuvent se détacher de la paroi vasculaire et transmettre le virus aux cellules endothéliales des organes-cibles. Les monocytes circulants peuvent disséminer l'infection dans les tissus et lorsqu'ils se différencient en macrophages, ils deviennent permissifs pour la multiplication virale pouvant à leur tour transmettre le virus aux cellules endothéliales non infectées.

Issu de traite de (Alain et Garrigue 2019)

IV. Le cycle de réplication cellulaire de HCMV

Le HCMV pénètre dans les cellules humaines par fusion à la membrane plasmique ou par voie endocytaire. Le virus s'attache à la cellule hôte via des interactions entre ses protéines de l'enveloppe et des récepteurs membranaires. La fixation de HCMV aux cellules est initiée par l'interaction entre les glycoprotéines virales gB (Boyle et Compton 1998), gM/gN (Mach et al. 2005) et des macromolécules de type *heparan sulfate proteoglycans* présentes à la surface des cellules. Puis la fixation est stabilisée par le trimère gH/gL/gO ou le pentamère gH/gL/UL128,130,131. Ces complexes protéiques peuvent se fixer à des intégrines ou à des récepteurs de facteurs de croissance comme le *platelet-derived growth factor receptor α* (PDGFR- α) ou l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR). *In vitro*, le trimère gH/gL/gO permet l'entrée de HCMV dans les cellules fibroblastiques (Vanarsdall, Chase, et Johnson

2011) alors que UL128,130,131 permet l'entrée de HCMV dans les leucocytes, les cellules endothéliales et épithéliales (Hahn et al. 2004; D. Wang et Shenk 2005). Ce tropisme différentiel sera abordé plus avant dans la partie « modélisation *in vitro* ».

Après la fusion de l'enveloppe à la membrane plasmique, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme puis sa translocation dans le noyau *via* des interactions capsides/microtubules permet la libération de l'ADN viral au niveau nucléaire. L'expression des gènes viraux est alors initiée. Les gènes très précoces *Immediate–Early (IE)* codent pour les facteurs de transcription qui amorcent la réplication virale. Ainsi IE1 (pUL123) et IE2 (pUL122) sont les principales protéines activatrices de la transcription des gènes viraux (Paulus et Nevels 2009). Les gènes *IE* de HCMV sont sous le contrôle du *major IE promoter/enhancer (MIEP)*. Ce *starter* de la réplication virale permet l'expression des gènes précoces *Early* en protéines impliquées dans la réplication du génome viral, dont l'ADN polymérase virale (pUL54) et une sérine/thréonine kinase (pUL97) (Hakki et Chou 2011). Après la réplication de l'ADN viral, l'expression de gènes structurels tardifs *Late* permet la synthèse des protéines de la capside, des glycoprotéines d'enveloppe précédemment évoquées et des protéines du tégument comme la pp65. Parallèlement à cette synthèse protéique, le génome viral est encapsidé dans le noyau puis ses processus de maturation et d'enveloppement s'opèrent dans le cytoplasme au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. *In fine*, le virion est libéré par exocytose au niveau de la membrane plasmique avec une période de 48 à 72 heures de cycle d'infection productif dans les fibroblastes (Figure 7) (Crough et Khanna 2009; Kutle et al. 2017).

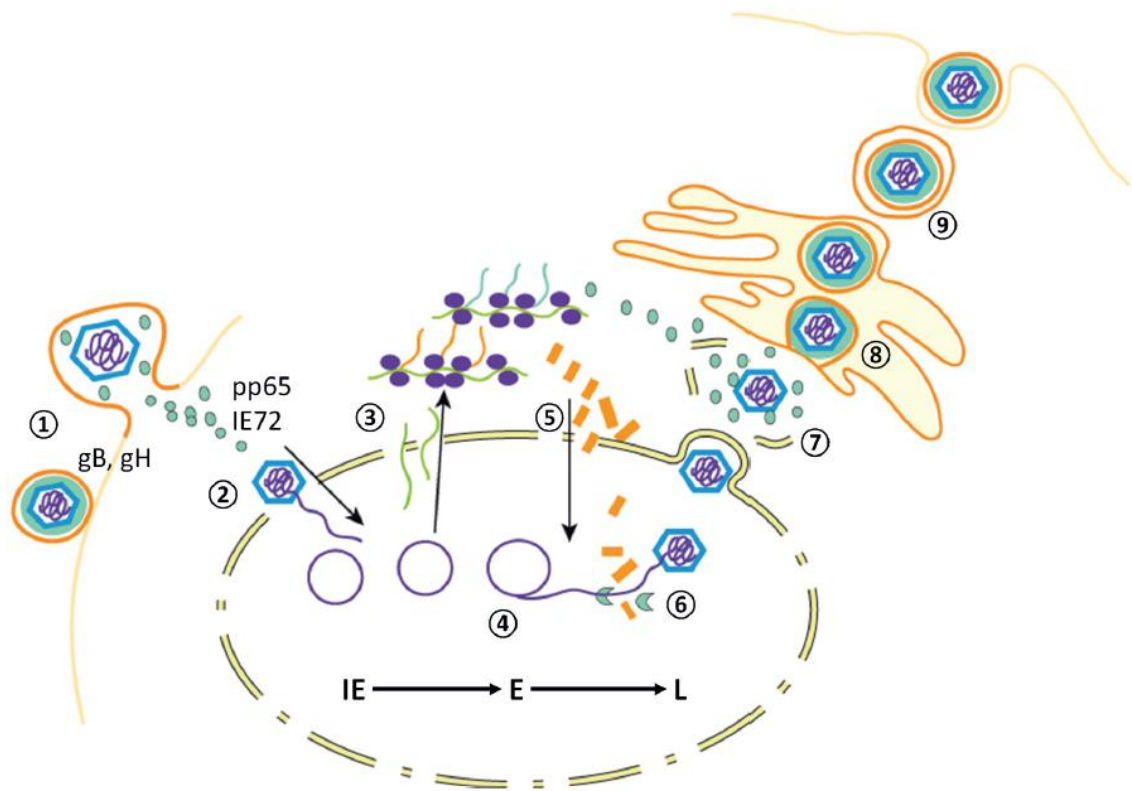


Figure 7 : Le cycle de HCMV

1) Pénétration par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, libérant les protéines du tégment. 2) Décapsidation au niveau des pores nucléaires, circularisation du génome. 3) Transcription et traduction : phase très précoce (IE « immediate early »), puis phase précoce (E « early »). 4) Réplication de l'ADN. 5) Phase tardive (L « late »). 6) Clivage des concatémères et encapsidation dans le noyau. 7) Lors de la sortie du noyau, acquisition d'une première enveloppe par la nucléocapside puis désenveloppement et association au tégment. 8) Acquisition de l'enveloppe définitive et des glycoprotéines d'enveloppe dans le réticulum endoplasmique rugueux et/ou le Golgi. 9) Sortie des virions par fusion de la membrane des vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique.

Issu (Alain et Garrigue 2019)

V. La latence de HCMV

Comme tous les virus de la famille des *Herpesviridae*, HCMV est capable de latence virale et n'est pas éliminé de l'organisme infecté. La latence virale est la capacité du virus à persister dans l'organisme en synthétisant une faible quantité de protéines virales nécessaires à celle-ci. Elle s'oppose à la phase lytique, la phase de réplication active du virus et de production de particules virales. La persistance de HCMV chez les individus en bonne santé était considérée pendant longtemps comme sans conséquence biologique. Plus récemment, le rôle de HCMV a été retrouvé dans des états inflammatoires chroniques avec un risque de morbi-mortalité cardio-vasculaire augmenté (G. C. Wang et al. 2010; Simanek et al. 2011). De plus les réponses cellulaires spécifiques anti-HCMV représentent environ 10% du répertoire lymphocytaire mémoire périphérique des individus séropositifs (Sylwester et al.

2005) participant ainsi à l'immunosénescence induite par HCMV. Cette persistance de HCMV est caractérisée par la latence virale formant un réservoir principalement dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (CD34+) et les cellules myéloïdes (von Laer et al. 1995). Cette latence est caractérisée par un arrêt de production de particules virales avec une persistance du génome viral sous forme épisomale non intégrée. Certaines protéines sont donc synthétisées en faible quantité et participent au maintien de la phase de latence, et sont responsables de l'échappement viral à la surveillance immunologique. Nous allons répertorier certaines de ces protéines importantes pour la phase de latence de HCMV.

Le locus des gènes *UL133-UL138* semble avoir un rôle déterminant dans l'établissement et le maintien de la latence virale *in vitro*. La protéine pUL138 a été la première protéine identifiée pour la latence dans les CSH (Goodrum et al. 2007). La protéine pUL138 agit en empêchant la déméthylation des histones en inhibant les *lysine-specific demethylases* (KDMs), en particulier la *lysine-specific histone demethylase 1A* (LSD1) et *Jumonji domain-containing protein D3* (JMJD3) (Figure 8). Cette modulation épigénétique induite par pUL138 réprime l'activation du promoteur viral MIEP, bloquant ainsi l'amorce de la réplication virale (S. H. Lee et al. 2015). D'autre part, la protéine pUL138 aurait un effet potentialisateur de la signalisation de l'EGFR en augmentant son expression à la surface cellulaire (Buehler et al. 2019). L'EGFR est un récepteur d'entrée du virus dans la cellule hôte. De plus, les voies intracellulaires induites post-infection par l'EGFR orientent le virus préférentiellement vers la phase de latence. Il semblerait que la stimulation via EGFR permettrait de favoriser l'expression de *UL139* et de diminuer l'expression des gènes *IE* (Buehler et al. 2019). L'expression membranaire du *Tumor necrosis factor receptor 1* (TNFR1) est également augmentée par pUL138, amplifiant ainsi la sensibilité des cellules au *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) : une cytokine puissamment stimulatrice de la réactivation virale. La protéine pUL138 permettrait probablement par ce mécanisme de laisser une fenêtre ouverte à la réactivation virale via le TNF α (Montag et al. 2011). Comme pUL138, pUL133 réprime la réplication virale. La protéine pUL133 permet la formation d'un complexe avec pUL138 et pUL136 nécessaire à la fonction inhibitrice de pUL138 (Petrucci et al. 2012). L'inhibition de pUL138 ou de pUL133 entraîne une perte de latence dans les CSH. Par opposition, la latence virale au sein des fibroblastes ne nécessite pas le contrôle de ces 2 protéines, ce qui indique une sensibilité variable des cellules « réservoirs » à la latence virale. La protéine pUL135, quant à elle, est une protéine activatrice de la réplication virale (Umashankar et al. 2014) venant contrebalancer pUL138 et pUL133. En effet, pUL135 inhibe la voie cellulaire de l'EGFR par l'inhibition des voies PI3K/AKT ou MEK/ERK ce qui réorienterait le virus vers une phase répllicative (Buehler et al. 2019).

Ainsi, la phase de latence virale s'articule comme un processus dynamique, un équilibre au sein duquel les protéines des gènes *UL133-UL138* interagissent (Petrucci et al. 2012).

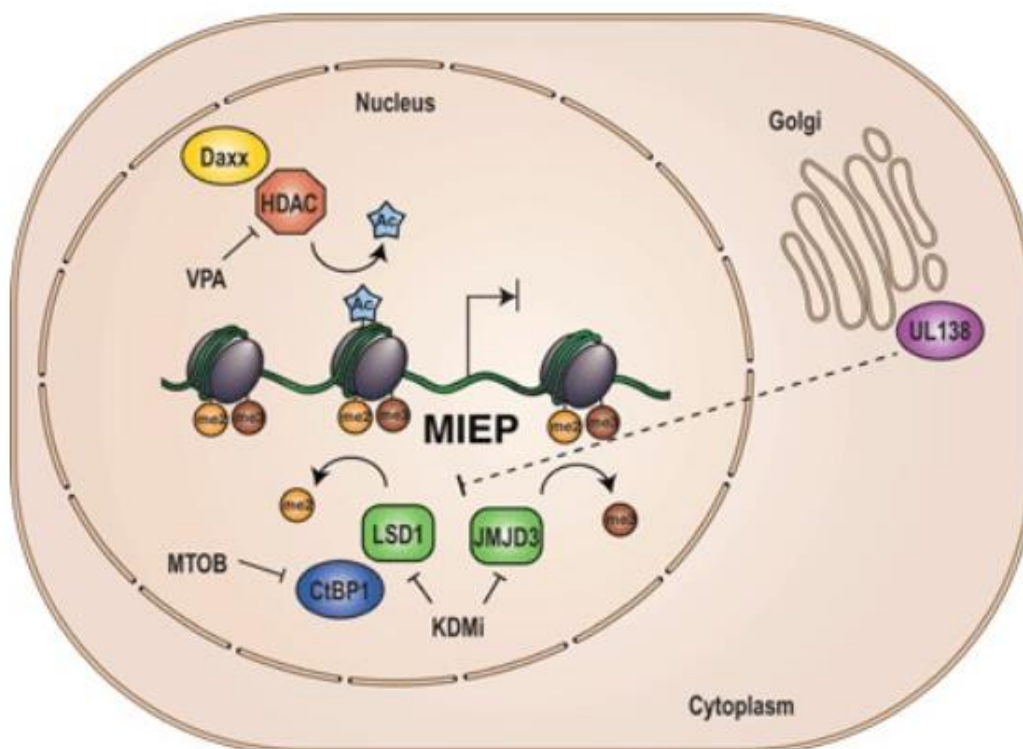


Figure 8 : Modèle de régulation de l'expression du promoteur MIEP

La protéine pUL138 empêche la déméthylation des histones en inhibant LSD1 et JMJD3 ce qui réprime l'activation du promoteur MIEP.

Issu de : (S. H. Lee et al. 2015)

D'autres mécanismes participant à la latence de HCMV existent mais leurs mécanismes sont moins bien connus. *UL81-82*, codant pour *the latent undefined nuclear antigen* (LUNA) est synthétisée dans des monocytes d'individus séropositifs (Bego et al. 2005). Il est à noter que les niveaux d'expression des transcrits de LUNA diminuent lorsque les transcrits d'IE augmentent pendant la différenciation des CSH en cellules dendritiques et lors de la réactivation virale (Reeves et Sinclair 2010), ce qui suggérerait un rôle, malheureusement encore peu connu, dans la phase de latence virale. LUNA est une SUMOylase, protéine capable de modifications post-traductionnelles, qui clive des liaisons entre les protéines *Small Ubiquitin-like MOdifier* (SUMO) et la protéine *ProMyelocytic Leukaemia* (PML). PML nécessite une sumoylation pour inhiber la réplication virale. Ainsi, l'activité SUMOylase de LUNA permettrait de lever l'activité antivirale de PML pour optimiser l'environnement cellulaire et favoriser la réplication virale (Poole et al. 2018).

US28, un récepteur couplé à une protéine G exprimé par HCMV, est un homologue de récepteurs aux chimiokines. US28 est exprimé chez des individus séropositifs sans réplication virale active ainsi que dans une lignée cellulaire monocyttaire THP-1 lors de la latence de HCMV (Beisser et al. 2001). La suppression du gène *US28* entraîne une perte de répression de MIEP induisant la phase répllicative du virus dans les cellules myéloïdes (Humby et O'Connor 2015). La répression de MIEP par US28 semble opérer par la diminution des voies de signalisation cellulaire MAP kinase et *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) permettant ainsi le maintien de la latence (Benjamin A. Krishna et al. 2017).

Le virus latent attend certains stimuli externes permettant sa réactivation. Ainsi, sous l'action de certains facteurs, le virus peut se réactiver avec production de nouvelles particules virales infectieuses. Ces facteurs sont encore mal identifiés ; ils peuvent impliquer une stimulation du système immunitaire lors d'un sepsis, d'un stress important, d'une inflammation, de réactions allogéniques (grossesse, transfusion, greffe d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques), ou lors d'une diminution de vigilance du système immunitaire induite par des traitements immunosuppresseurs ou des chimiothérapies (Figure 9) (Forte et al. 2020). La réactivation virale commence par une activation du promoteur MIEP pour enclencher le cycle viral comme décrit en amont. Parmi les cytokines pro-inflammatoires permettant la réactivation de HCMV, le TNF α y joue un rôle prépondérant via la voie NF- κ B (Nordøy et al. 2000).

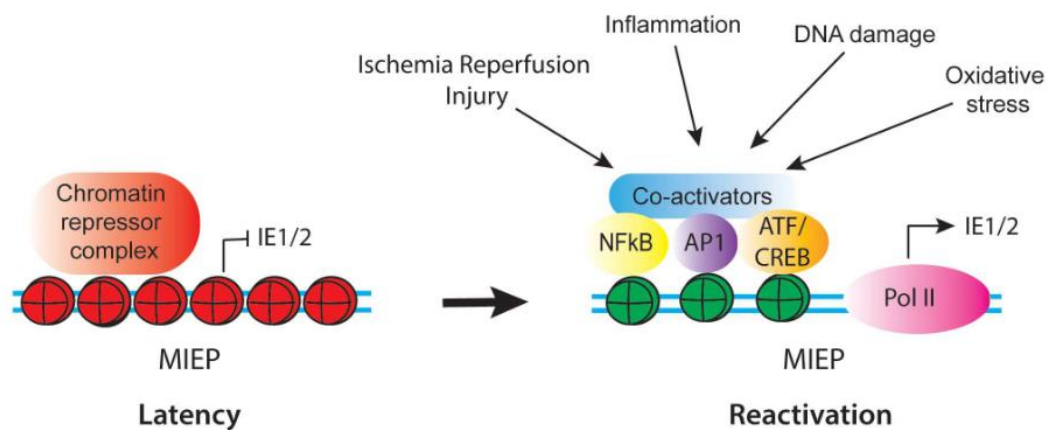


Figure 9 : Schéma des facteurs de régulation qui contrôlent l'activité de MIEP lors de la latence et de la réactivation.

La réactivation virale est permise par l'activation du promoteur MIEP induisant la synthèse des protéines très précoces IE. Cette activation est permise par différents facteurs comme l'ischémie, l'inflammation, les dommages de l'ADN et le stress oxydatif. Issu de (Forte et al. 2020)

Comme nous venons de le détailler, HCMV attend patiemment le moment propice à la réactivation virale et déploie de nombreux moyens de régulation de son cycle. La latence est donc un état dynamique du virus afin de perdurer dans l'organisme. Invisible, HCMV se dissimule au système immunitaire.

VI. Relation hôte pathogène

VI.1. Le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné joue un rôle clef dans les premières défenses contre HCMV, particulièrement lors de la primo-infection. Il permet la mise en place des conditions optimales de la réponse immunitaire adaptative.

VI.1.a. La reconnaissance des signaux de danger

L'initiation de la réponse immunitaire innée est permise par la reconnaissance des *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) par les *pattern recognition receptors* (PRRs).

La stimulation des *Toll-like receptors* (TLR) comme TLR2 (Compton et al. 2003), TLR3 (K. H. Yew et Harrison 2011), TLR4 (K.-H. Yew et al. 2012, 4), et TLR9 (Wujcicka et al. 2015, 9) par HCMV joue un rôle crucial dans la mise en place de la réponse innée et permet la transduction de signaux pro-inflammatoires. TLR2 reconnaît la gB et la gH de HCMV et entraîne l'activation de la voie NF- κ B puis la production de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-8, l'IL -12 et IFN (interféron)- β (Boehme, Guerrero, et Compton 2006; Compton et al. 2003). Les récepteurs intracellulaires TLR3 et TLR9 sont quant à eux impliqués dans la détection de l'ADN de HCMV et induisent la production de TNF α par les monocytes (K.-H. Yew, Carsten, et Harrison 2010).

La famille des *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-*like receptor* (NLRs) induit une réponse NF- κ B lors de stimulation par des pathogènes bactériens mais joue également un rôle dans les défenses contre HCMV. En effet, l'activation de NOD2 et de *Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 2* (RIPK2) par HCMV est un puissant suppresseur de la réplication virale. NOD2 permet l'activation des voies NF- κ B et induit la production d'IL-8 et d'IFN- β (Kapoor, Forman, et Arav-Boger 2014). La signalisation intracellulaire médiée par NOD1 entraîne la suppression de la réplication de HCMV. En effet, la voie de NOD1 implique la kinase I κ B (IKK) qui permet l'activation et la translocation intra-nucléaire de *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3) afin d'activer les gènes inductibles des IFN de type I (Fan et al. 2016). La production d'IFN permise par IRF3 est également possible par la voie

cGAS-STING Cyclic (*GMP-AMP synthase-Stimulator of Interferon Genes*) qui reconnaît la présence d'ADN double brin cytosolique (Lio et al. 2016).

En résumé, la détection de HCMV par les PRRs permet la production d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires permettant le recrutement des cellules du système immunitaire au niveau du lieu de l'infection. Afin d'échapper à ces systèmes anti-viraux, HCMV a développé différents moyens d'éviction du système immunitaire inné avec notamment l'inhibition de la voie des IFN. La protéine pp65 semble être au centre de l'inhibition de cette voie par la déphosphorylation d'IRF3, le blocage de l'interaction cGAS-STING et l'inhibition de NF- κ B (Marshall et Geballe 2009).

VI.1.b. Reconnaissance des cellules infectées

La reconnaissance de HCMV comme pathogène et l'activation des voies citées précédemment amorcent la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale adaptée. Il existe plusieurs cellules du système immunitaire inné jouant un rôle important dans la réponse anti-HCMV comme les cellules *Natural killer* (NK) et les lymphocytes T *gamma delta* (LT $\gamma\delta$).

Les cellules NK, qui représentent 5 à 15% des lymphocytes circulants, sont capables de réagir rapidement à une grande variété de stimuli sans posséder de récepteurs spécifiques d'antigène. Ainsi, les individus ayant un déficit en cellules NK ont une plus grande sensibilité aux infections par les herpès virus comme HCMV (Orange 2013). Lors d'une infection par le HCMV, les cellules NK sont en première ligne des défenses antivirales. Les cellules NK peuvent reconnaître et détruire les cellules infectées grâce à leur propriété cytotoxique, et produire des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Coudert, Andoniou, et Degli-Esposti 2010). Les granules lytiques des cellules NK sont constitués de la perforine et de granzymes. Les cytokines inflammatoires, telles que IFN γ et TNF α , favorisent l'activation des DC et des macrophages. Ces cellules présentatrices d'antigène (CPA) activées présentent des peptides dérivés de virus sur les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et amorcent ainsi la réponse LT spécifiques d'antigène. Les cytokines libérées par les CPA (IL-15, IL-12, IL-18) favorisent quant à elles, l'activation et la survie des cellules NK et des LT (Coudert, Andoniou, et Degli-Esposti 2010).

Chez l'Homme, il existe deux familles de récepteurs des cellules NK : les récepteurs *Natural-killer group 2* (NKG2) et les récepteurs *Killer-cell immunoglobulin-like receptors* (KIR). Ces récepteurs possèdent un motif intracytoplasmique responsable de la transduction d'un signal activateur (motif ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activator motif*) ou inhibiteur (motif

ITIM : *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*). Les cellules NK sont activées lorsque les signaux activateurs reçus sont supérieurs aux signaux inhibiteurs. Les récepteurs NKG2 reconnaissent les molécules HLA-E, appartenant aux molécules CMH de classe I non classiques. Parmi ces récepteurs, NKG2A et NKG2B sont inhibiteurs, alors que NKG2C, NKG2E et NKG2H sont activateurs (Abel et al. 2018).

Il a été récemment décrit une réponse NK « spécifique » au cours de l'infection par le HCMV, durant laquelle des peptides viraux sont présentés par le HLA-E des cellules infectées et reconnus par NKG2C, ce qui entraîne l'activation, l'expansion et la différenciation de cellules NK adaptatives (Hammer et al. 2018). Le récepteur activateur NKG2D reconnaît des molécules homologues au CMH de classe I, appelées *MHC-I related protein A* (MIC-A) et MIC-B, exprimées par les cellules épithéliales et endothéliales. La surexpression de MIC-A et MIC-B en condition de stress cellulaire active les cellules NK cytotoxiques. De plus, *UL-16 binding protein* (ULBP), se lie à la glycoprotéine UL-16 de HCMV et stimule la cytotoxicité NK via le récepteur NKG2D (Sutherland, Chalupny, et Cosman 2001).

Les récepteurs KIR reconnaissent les molécules CMH de classe I classiques, qui sont exprimées au niveau membranaire par les cellules nucléées de l'organisme, et qui sont considérées comme une empreinte protéique du « soi ». Ainsi, les cellules NK analysent le niveau d'expression du CMH de classe I, ce qui leur confère un rôle clé dans l'immunosurveillance. En effet, la perte partielle ou totale de l'expression du CMH de classe I est un mécanisme d'échappement viral fréquent afin d'éviter une reconnaissance spécifique par les lymphocytes T. L'hypothèse du « soi-manquant », énoncée dès 1985, a rendu célèbre le rôle des cellules NK dans la tolérance au « soi », c'est-à-dire leur capacité à repérer et détruire les cellules anormales tout en épargnant les cellules normales de l'organisme (Ljunggren et Kärre 1990)

HCMV a développé un ensemble de mécanismes de régulation afin d'échapper à la réponse antivirale des cellules NK (Figure 10). Ainsi la protéine pUL142 permet une séquestration dans le Golgi de MIC-A, l'un des ligands du récepteur activateur NKG2D (Ashiru et al. 2009). Alors que HCMV induit une perte d'expression du CMH de classe I (voir plus loin), ce qui le rend vulnérable à la cytotoxicité NK par la reconnaissance du « soi manquant », il parvient à leurrer les cellules NK en produisant la molécule virale pUL18, un homologue du CMH de classe I et ligand du récepteur *Leukocyte Ig-like Receptor* LIR-1 exprimé par certaines cellules NK (Wagner, Ljunggren, et Achour 2008). De plus, HCMV synthétise la protéine pUL40 de séquence similaire au ligand du HLA-E entraînant une surexpression du HLA-E reconnu par NKG2A, un ligand inhibiteur des cellules NK (Uibrecht et al. 2000). Les fibres F-actine des cellules cibles peuvent être perturbées par l'expression de pUL135 ce qui altère la

formation de la synapse immunologique entre la cellule NK et la cellule infectée, diminuant la mort cellulaire par cytotoxicité (Stanton et al. 2014). Une autre protéine virale, pUL141, interfère dans les voies de mort cellulaire. La protéine pUL141 est responsable de la régulation négative de *TNF-related apoptosis inducing ligand receptors 1 and 2* TRAIL-R1 et R2 des cellules infectées par HCMV diminuant ainsi la mort cellulaire par apoptose (W. Smith et al. 2013).

Finalement, les cellules NK présentent une activité antivirale importante et précoce, cependant largement contrecarrée par HCMV à travers la synthèse de véritables « immuno-évadines » capables d'inhiber de façon complémentaire les différentes voies d'activation des cellules NK.

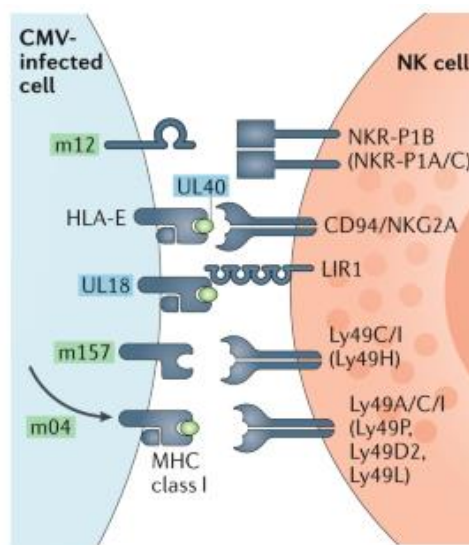


Figure 10 : Stratégies d'évasion immunitaire de CMV centrées sur les cellules NK
 Les protéines murines sont surlignées en vert ; les protéines surlignées en bleu sont humaines.
 La protéine m04 permet l'export du CMH de classe I à la membrane afin d'être reconnu par le récepteur Ly49 et d'éviter une lyse cellulaire à la manière de pUL18 pour l'Homme.
 De nombreuses mutations de la protéine m157, correspondant à un CMH-like, permettent l'échappement aux réponses des cellules NK dépendantes de Ly49H.
 La protéine pUL40 entraîne une surexpression du HLA-E reconnu par NKG2A, un ligand inhibiteur des cellules NK.
 La protéine m12 diminue la fonction effectrice des cellules NK en interagissant avec le récepteur inhibiteur NKR-P1B.
 Issu de (Berry et al. 2020)

D'autres cellules immunitaires intéressantes dans la réponse anti-HCMV sont les lymphocytes T gamma delta (LT $\gamma\delta$). Les LT $\gamma\delta$ sont des lymphocytes T faiblement représentés dans le sang périphériques (<10% des lymphocytes T circulants), car localisés majoritairement au niveau des muqueuses et des épithéliums. Les LT $\gamma\delta$, contrairement aux LT $\alpha\beta$ classiques, ne sont pas dépendants de la reconnaissance de l'antigène présenté par le

CMH. Les LT $\gamma\delta$ reconnaissent MIC-A, MIC-B ou le CD1d présents sur la membrane des CPA et des cellules infectées. Ils peuvent répondre à une grande variété de stimuli indépendamment de leur nature moléculaire (peptidique, lipidique ou phospho-antigénique). Le répertoire restreint du TCR gamma delta et la rapidité de réponse permet communément de classer les LT $\gamma\delta$ dans le système immunitaire inné (Chien, Meyer, et Bonneville 2014). Lors de la primo-infection à HCMV, les LT $\gamma\delta$ sont rapidement activés par les cytokines pro-inflammatoires IFN α/β , IL-12 et IL-18. Ils sont capables de cytotoxicité et sécrètent d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ et le TNF α (Halary et al. 2005). En plus de cette réponse rapide, une expansion clonale et une différenciation en LT $\gamma\delta$ *effector memory-like* est observée dans l'infection par le HCMV, mais pas dans d'autres infections virales (Herpès simplex virus, Epstein-Barr virus, virus de la grippe et varicelle-zona virus) (Déchanet et al. 1999), ce qui suggère l'implication du TCR $\gamma\delta$ et la sélection de certaines sous-populations de LT $\gamma\delta$, reflétant une réponse cellulaire *adaptive-like* (Pitard et al. 2008). L'infection par le HCMV laisse une empreinte spécifique sur le compartiment des LT $\gamma\delta$: elle entraîne une expansion durable des LT $\gamma\delta$ oligoclonaux dans le sang des individus séropositifs, et elle induit leur différenciation en cellules effectrices mémoires exprimant un phénotype TEMRA (CD45RA⁺ effector memory T cell). Cette réponse *adaptive-like* permet une expansion plus rapide des LT $\gamma\delta$ lors de la réponse secondaire au CMV et est associée à une meilleure résolution de l'infection que la réponse primaire (Pitard et al. 2008).

Finalement, les LT $\gamma\delta$ sont à la fois fonctionnellement proches des cellules NK de par leur réponse antivirale précoce « *innate-like* » et proches des lymphocytes T conventionnels en raison de leur expansion clonale et à la persistance de cellules « *memory-like* », ce qui permet une réponse globale antivirale dès la réponse immunitaire primaire et prolongée lors des réponses secondaires concomitantes aux phases de réactivations virales (Figure 11) (Khairallah, Déchanet-Merville, et Capone 2017).

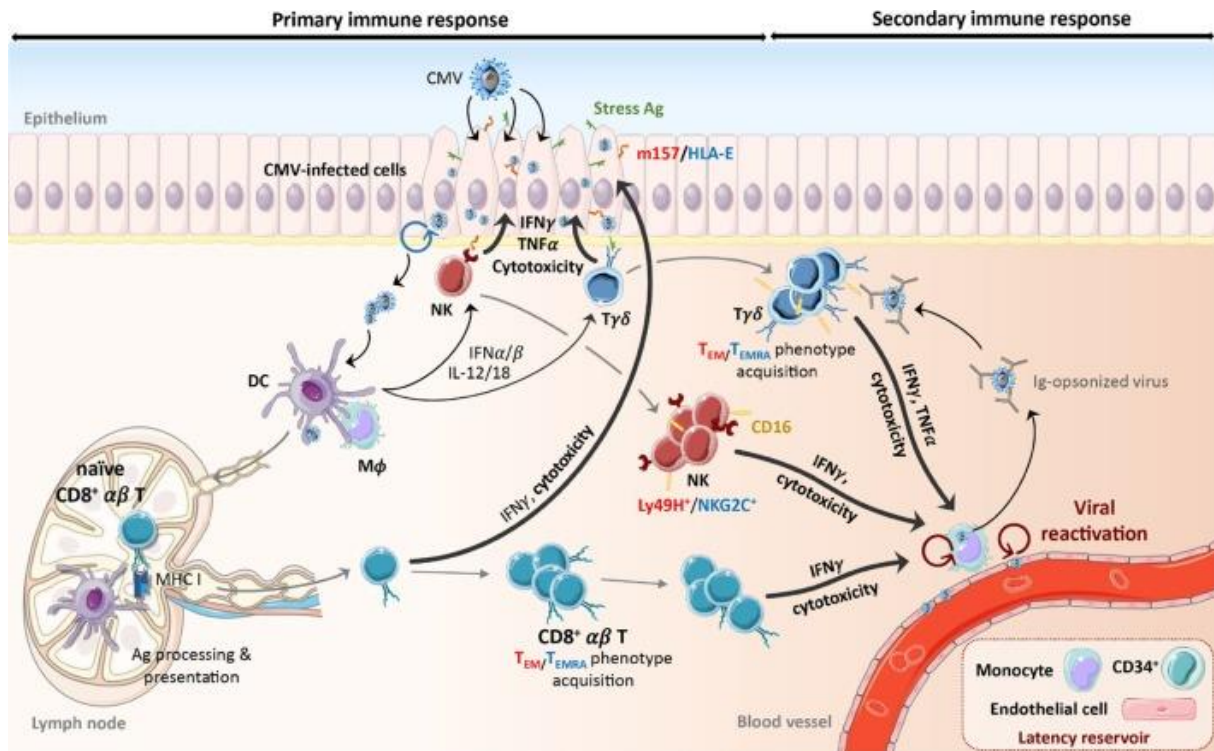


Figure 11 : Représentation générale de la réponse immunitaire cellulaire anti-CMV
 Lors de l'infection primaire de HCMV, les CPA sont activées par des TLR et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IFN $\alpha\beta$, IL-12 et IL-18) qui induisent l'activation des cellules NK et des L $\gamma\delta$ induisant l'expansion des cellules NK Ly49H (souris) ou NKG2C (humaines) et des LT $\gamma\delta_{EM}$ (souris) ou TEMRA $\gamma\delta$ (humaines). L'activation des CD entraîne leur maturation et leur migration vers les ganglions lymphatiques induisant la différenciation de LT CD8 + $\alpha\beta$ T $_{EM}$ ou TEMRA. Les cellules NK activées, les cellules LT $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ peuvent lyser et éliminer les cellules infectées par HCMV et contrôler la réplication virale. Malgré cette réponse immunitaire, HCMV persiste chez son hôte. Pendant les épisodes de réactivation virale, les cellules immunitaires induites par HCMV réagissent rapidement à la présence de virions.

La couleur rouge est associée à la souris alors que la couleur bleue est associée à l'homme
 Issu de (Khairallah, Déchanet-Merville, et Capone 2017)

VI.2. Le système immunitaire adaptatif

L'activation du système immunitaire inné permet la bonne mise en place du système immunitaire adaptatif. On peut séparer le système adaptatif en 2 catégories de réponse : la réponse à médiation cellulaire et la réponse humorale.

Le système immunitaire adaptatif cellulaire est basé sur les LT CD8+ et les LT CD4+. Ces lymphocytes T conventionnels expriment le TCR $\alpha\beta$ et nécessitent une présentation antigénique par les molécules du CMH de classe I pour les LT CD8+ et CMH de classe II pour les LT CD4+ : ils ont une réponse spécifique d'antigène et sont restreints à la reconnaissance du complexe CMH-peptide. Les lymphocytes spécifiques des peptides viraux présentés sont alors activés et se différencient en cellules mémoires et effectrices

après une phase d'expansion clonale. Les LT CD8+ sont des lymphocytes majoritairement cytotoxiques qui permettent la cytolysse des cellules infectées lors de la réplication virale. Les LT CD4+ contribuent non seulement à l'activité cytotoxique notamment par leur action auxiliaire mais contribuent également à une veille des cellules infectées par HCMV en phase de latence (Mason et al. 2013). La réponse cellulaire T anti-HCMV accapare un nombre de lymphocytes particulièrement important : environ 10% des lymphocytes sanguins sont dirigés contre HCMV chez les individus séropositifs (Sylwester et al. 2005) participant ainsi à l'immunosénescence induite par HCMV.

La littérature scientifique concernant les réponses immunitaires cellulaires anti-HCMV s'est essentiellement focalisée sur les LT CD8+. La réponse des LT CD8+ aux peptides immunodominants de HCMV comme pp65 et IE1 (présentées par HLA-A2 et HLA-B7) peut atteindre 5 à 10% des LT CD8+ sanguins totaux. Au sein des LT CD8+ comme des LT CD4+, plus de 10% des lymphocytes spécifiques reconnaissent pp65, IE1 et IE2 (Sylwester et al. 2005). D'ordre général, il existe des sous populations de LT comme les LT *effector memory* (LT_{EM}) recirculants et les LT *central memory* (LT_{CM}) résidents des organes lymphoïdes secondaires. Les LT spécifiques de HCMV présentent plusieurs caractéristiques associées à leur maturation, comme la baisse d'expression des co-récepteurs CD27 et CD28, et la surexpression de CD57, de *killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1* (KLRG1), de la perforine et du granzyme B (Pardieck et al. 2018). Les LT_{EM} sont des lymphocytes à longue durée de vie présents majoritairement au niveau tissulaire et dans le sang. Ils représentent une part importante des lymphocytes spécifiques anti-HCMV due à la persistance « à bas bruit » d'antigènes de HCMV lors d'événements de réactivation virale (Seckert et al. 2012). L'origine et l'entretien du pool des LT_{EM} ont été montrés chez la souris et proviennent probablement de la stimulation et de la différenciation des LT_{CM} spécifiques (ayant un fort potentiel réplicatif (Snyder et al. 2008). Ainsi, les LT_{CM} présents dans les organes lymphoïdes secondaires représentent un pool de lymphocytes capables d'une expansion rapide lors de la réactivation virale (Figure 12). Au niveau tissulaire, les LT *resident memory* (LT_{RM}) participent également aux réponses immunitaires lors de réactivations virales tissulaires mais sans recirculation sanguine (C. J. Smith, Quinn, et Snyder 2016).

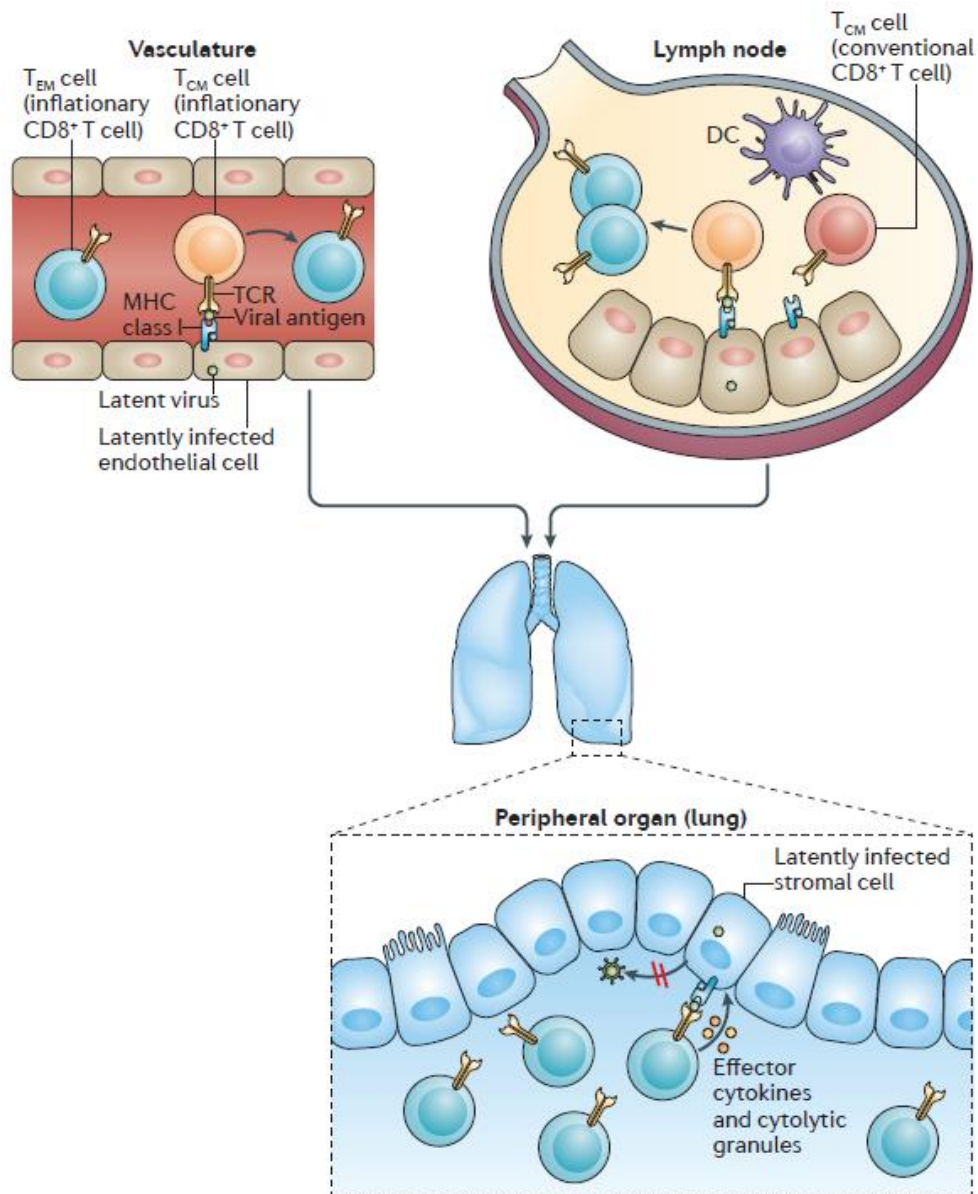


Figure 12 : Evolution des cellules T mémoires

Des antigènes de HCMV sont présentés par des cellules présentatrices d'antigène (CPA) dans les ganglions lymphatiques ou au niveau du système vasculaire (par exemple). Ces antigènes peuvent conduire à la différenciation des lymphocytes T central memory (LT_{CM}) spécifiques, à fort potentiel de division, en cellules LT effeteur memory (LT_{EM}) qui recirculent dans les tissus où ils peuvent exercer leurs fonctions effectrices antivirales et maintenir le contrôle à long terme de la réplication virale. Issu de (Klenerman et Oxenius 2016)

Les LT CD4 + et CD8 + semblent avoir un rôle crucial dans la résolution de l'infection, ainsi que dans le contrôle de la réplication virale (Polić et al. 1998) (Figure 13).

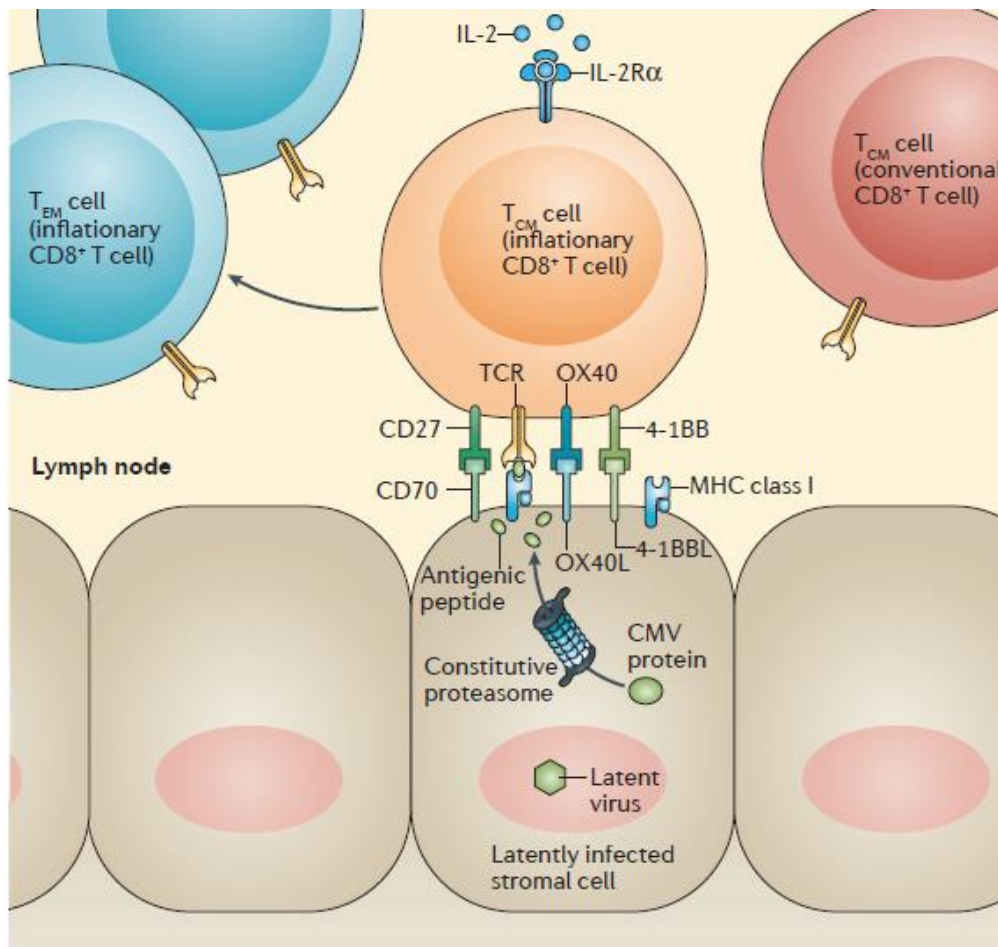


Figure 13 : Reconnaissance du virus latent par les LT CD8

La présentation des antigènes de HCMV des cellules infectées est accompagnée des signaux de co-stimulation médié par des molécules telles que 4-1BB, OX40 et CD70 et de cytokines de la famille des interleukines-2 (IL-2) afin de déclencher la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. Issu de (Klenerman et Oxenius 2016)

Les LT CD8+ sont les principales cellules luttant contre la réactivation virale. Cela a été mis en avant par l'efficacité des LT CD8+ à contrôler la réactivation virale par transfert adoptif de LT CD8+ spécifiques de HCMV chez des patients immunodéprimés (Riddell et al. 1992). L'intérêt des LT CD8+ semble aussi largement complété par les LT CD4+ qui participent également au contrôle viral (Einsele et al. 2002). Une autre preuve de l'intérêt des LT CD4+ spécifiques de HCMV est leur augmentation avec l'âge. Malheureusement elle est associée à une diminution de la production de l'IL-2, une augmentation de l'expression de CD57 et une diminution des molécules de co-stimulation CD28 et CD27. Ce phénotype est caractéristique d'un épuisement cellulaire, aussi appelé « exhaustion », dû à une réponse

antivirale chronique. Cette inflation de la réponse mémoire des LT CD4+ spécifiques de HCMV contribue ainsi à l'immunosénescence induite par HCMV (Pourgheysari et al. 2007).

Les réponses immunitaires cellulaires sont complétées par la réponse humorale. Comme nous l'avons vu, les glycoprotéines d'enveloppe sont nécessaires à l'entrée du virus dans les cellules cibles et conditionnent son tropisme cellulaire. Plusieurs études ont montré l'importance des anticorps neutralisants contre ces glycoprotéines, et notamment dans le cadre de la recherche vaccinale. La synthèse d'anticorps anti-gB (Griffiths et al. 2011) ou d'anticorps anti-complexes pentamériques (Ha et al. 2017) permettent une protection contre HCMV, mais l'efficacité vaccinale est seulement partielle, d'environ 50% pour les essais sur la gB (Griffiths et al. 2011). De plus, une primo-infection ne permet pas de développer une protection immunitaire suffisante pour empêcher une réinfection par différentes souches de HCMV (Ross et al. 2010). Les anticorps anti-HCMV permettent néanmoins de limiter ces réinfections et d'empêcher la dissémination de HCMV dans l'organisme lors de la réactivation virale (Krmpotić et al. 2019)

Malgré un système immunitaire adaptatif extrêmement mobilisé contre HCMV, ce virus persiste à vie dans l'organisme. En complément des stratégies développées contre l'activité antivirale des cellules NK, HCMV a développé de nombreuses stratégies d'échappement à la réponse T. Quelques-unes de ces stratégies sont répertoriées ici.

Un mécanisme majeur d'évasion est l'inhibition de la présentation des antigènes viraux par le CMH de classe I. Le génome du HCMV code cinq protéines, gpUS2, gpUS3, gpUS6, gpUS10 et gpUS11, qui bloquent la génération et / ou l'exportation du CMH de classe I et induisent une perte de son expression membranaire (Wiertz et al. 1996; Jones et al. 1996; Jones et Sun 1997; Furman et al. 2002; Ahn et al. 1997). Ce mécanisme empêche la cellule infectée de présenter les peptides viraux aux LT CD8+, diminuant ainsi la réponse antivirale cytotoxique (Figure 14). La glycoprotéine US2 peut également dégrader les molécules CMH de classe II empêchant ainsi l'activation correcte des LT CD4+ (Tomazin et al. 1999).

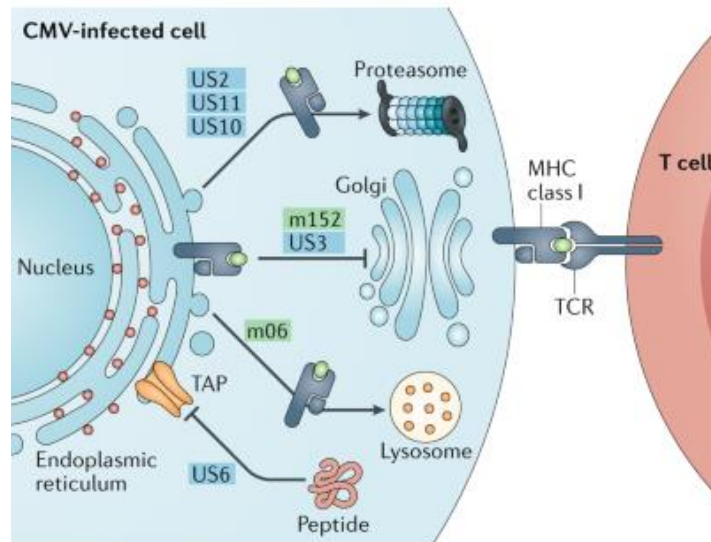


Figure 14 : Stratégies d'évasion immunitaire de CMV centrées sur les LT

Les protéines humaines US2, US10, US11 et murines m06 permettent la dégradation du CMH de classe I empêchant la reconnaissance par les LT. US3 et m152 bloquent le transport du MHC de classe I vers l'appareil de Golgi. La protéine US6 empêche le chargement du peptidique sur le CMH de classe I en se liant à la sous-unité TAP. Les protéines murines sont surlignées en vert ; les protéines surlignées en bleue sont humaines
 Issu de (Berry et al. 2020)

La synthèse par HCMV d'homologues de cytokines correspond à un autre type de mécanisme d'échappement immunitaire. Parmi ces homologues, on retrouve le gène *UL111A* codant pour l'homologue de l'interleukine-10 de CMV (cmvIL-10) à propriété immunomodulatrice. CmvIL-10 ne semble pas nécessaire pour établir la latence *in vitro* mais permet de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires et de moduler la différenciation cellulaire (Cheung et al. 2009). CmvIL-10 aurait donc un rôle immunomodulateur et permettrait de limiter la capacité du système immunitaire à éliminer les cellules infectées en phase de latence (Avdic et al. 2011). CmvIL-10 limite également la clairance immunitaire du virus par diminution de l'expression du CMH de classe II des CPA. Il est difficile d'estimer l'importance globale de ce mécanisme d'échappement immunitaire cependant une nouvelle stratégie vaccinale chez les Macaques rhésus semble être intéressante. Ces animaux ont été immunisés avec un variant de rhcmvIL-10 modifiés pour éviter la cross-réaction avec l'IL-10. Des anticorps neutralisants anti-rhcmvIL-10 sans neutralisation croisée l'IL-10 ont été obtenus après vaccination et un *challenge* par RhCMV a montré une plus faible réplique de RhCMV. Cette inhibition d'un mécanisme d'échappement de CMV par la vaccination pourrait diversifier les stratégies vaccinales (Eberhardt et al. 2013).

Par ailleurs, HCMV modifie son environnement cellulaire afin de faciliter sa propagation et sa persistance dans les cellules infectées. Les gènes *UL146* et *UL147* codent les deux chimiokines virales : vCXCL1 et vCXCL2. La chimiokine pUL146 permet d'attirer les polynucléaires neutrophiles en activant les récepteurs aux chimiokines CXCR1 et CXCR2 des cellules endothéliales infectées. Cette stratégie peut paraître paradoxale, mais HCMV en tire parti car les polynucléaires neutrophiles servent alors de cellules transporteuses, pouvant ainsi étendre l'infection à d'autres cellules endothéliales (Lüttichau 2010).

Une autre stratégie d'évasion de HCMV consiste à développer des mécanismes anti-apoptotiques comme l'inhibition de la caspase-8 par pUL36 (Skaletskaya et al. 2001) ou la synthèse de pUL37, une protéine inhibitrice en aval de la caspase-8 et de la protéine Bid (Goldmacher et al. 1999). Il favorise ainsi la survie de la cellule hôte, ce qui lui permet de prolonger son cycle réplcatif et d'assurer un pool de cellules réservoirs lorsqu'il rentre en phase de latence.

Le système immunitaire inné et adaptatif, cellulaire et humoral permet donc de contenir le virus sans pour autant l'éliminer.

VII. Formes cliniques des infections par le HCMV

Le HCMV présente différentes formes cliniques selon l'état immunitaire de l'individu. Bien qu'elle passe inaperçue dans la majorité des cas, elle peut aussi entraîner des infections graves et des complications sévères lors de réactivations virales, pouvant mettre en jeu le pronostic vital chez des individus fragilisés.

L'infection par le CMV correspond à un test diagnostique biologique positif en l'absence de symptôme alors que la maladie à CMV correspond à la détection virale dans le compartiment sanguin en présence de symptômes (Ljungman et al. 2017).

VII.1. Infection par le HCMV chez l'individu immunocompétent

La primo-infection par le HCMV est dans la majorité des cas asymptomatique. Parfois, des symptômes cliniques se manifestent par un syndrome mononucléosique associant fatigue, fièvre et adénopathies. On considère la primo-infection des individus immunocompétents comme non sévère voire banale. Cependant, nous pouvons retrouver dans la littérature différents cas d'infections sévères à HCMV relevées par Rafailidis et col. Ces auteurs ont analysé, dans la littérature, 290 cas de primo-infections sévères à HCMV chez des individus immunocompétents. Les atteintes du système digestif semblent être les plus fréquentes avec

les colites en premier plan (Rafailidis et al. 2008). Le système digestif serait probablement un site privilégié de réactivation virale chez les individus immunocompétents, ce qui est particulièrement intéressant dans le cadre de mon projet de thèse. Le système nerveux est le second site de manifestation infectieuse avec des myélites, des encéphalites, des méningites ou des radiculopathies (Rafailidis et al. 2008). Il est classiquement retrouvé des anomalies de la formule sanguine telles qu'une monocytose et une lymphocytose avec présence de lymphocytes activés ; des atteintes hématologiques comme des cytopénies sont parfois retrouvées chez les immunocompétents. D'autres manifestations moins fréquentes peuvent être retrouvées comme des atteintes pulmonaires ou hépatiques, des rétinites, des uvéites (Rafailidis et al. 2008). Les cas rapportés dans la littérature restent néanmoins peu fréquents en comparaison des complications potentielles chez des personnes immunodéprimées, démontrant l'efficacité du système immunitaire dans la résolution de la primo-infection.

VII.2. Infection par le HCMV chez l'individu immunodéprimé

L'immunodépression peut être définie traditionnellement par une ou plusieurs anomalies du système immunitaire entraînant une sensibilité accrue aux infections. De manière générale, toute anomalie du système immunitaire accompagnée par une combinaison d'infections récurrentes, de malignité, d'auto-immunité, ou d'atopie peut être considérée comme une immunodépression. Les immunodépressions les plus fréquentes sont acquises : la malnutrition, le virus de l'immunodéficience acquise (VIH), les traitements immunosuppresseurs comme les corticoïdes, la splénectomie, les maladies métaboliques, les greffes d'organes ou hématologiques, le sepsis en sont des exemples (Chinen et Shearer 2010).

Ainsi, avant l'introduction des traitements antirétroviraux, l'infection par le HCMV était l'une des infections opportunistes les plus fréquentes des patients infectés par le VIH et environ 40% des patients séropositifs pour le VIH souffraient de manifestations cliniques dues à HCMV. Lorsque ces patients ont un nombre de LT CD4+ < 100 mm³ le risque de maladie à CMV est important. Un autre facteur de risque de maladie à HCMV est une virémie HCMV > 100 000 copies/mL. Les manifestations cliniques de la maladie à HCMV comprennent des atteintes ophtalmiques (particulièrement des rétinites), gastrointestinales, hépatiques, des encéphalites et des pneumopathies à HCMV (Steininger, Puchhammer-Stöckl, et Popow-Kraupp 2006). Actuellement, la mise en place précoce d'un traitement antirétroviral permet à la fois un contrôle virologique avec une charge virale VIH indétectable, et une épargne

immunologique avec des taux de LT CD4+ suffisants pour contrôler l'apparition de maladie à germe opportuniste, dont HCMV. Ceci a réduit de façon drastique les pathologies associées à la réactivation virale de HCMV chez les patients VIH traités.

La réactivation de HCMV est une des problématiques majeures des patients ayant bénéficié d'une greffe d'organe ou d'une greffe de CSH. HCMV est impliqué dans les pertes de l'organe greffé (M. Stern et al. 2014) et dans les maladies du greffon contre l'hôte (GVH) (Chan et Logan 2017). Ainsi, les risques de complications liées à HCMV chez les receveurs de greffe d'organes (R) varient en fonction du statut sérologique du donneur (D) (Tableau 1) : la transplantation HCMV D- / R- est à faible risque, alors que les greffes D+ / R+ ou D- / R+ sont à risque modéré de réactivation virale, et les greffes D+ / R- sont à risque élevé de primo-infection par le HCMV issu du greffon (Humar, Snyderman, et AST Infectious Diseases Community of Practice 2009). En cas de réactivation virale des symptômes digestifs, des méningoencéphalites, des hépatites, des myocardites et des pneumopathies sont possibles (Humar, Snyderman, et AST Infectious Diseases Community of Practice 2009). La sélection des donneurs, la surveillance préemptive ou prophylactique des patients greffés permettent de minimiser le rôle délétère de HCMV chez ces patients immunodéprimés (A. Stern et Papanicolaou 2019).

Tableau 1 : Facteurs de risque de maladie à HCMV en greffe d'organe solide

	Risque élevé	Risque intermédiaire	Risque faible	Commentaires
Statut sérologique	D+/R-	D+/R+, D-/R+	D-/R-	Tous les tests ne sont pas équivalents
Immunosuppresseurs	Sérum antilymphocytaire (thymoglobuline, alemtuzumab, OKT3)	MMF, azathioprine, tacrolimus, ciclosporine, CS haute dose	CS, inhibiteur mTOR	Risque élevé avec tous les traitements à forte dose
Organe greffé	Poumon, pancréas, intestin	Cœur, tissu composite	Foie, rein	Corrélié aux forts niveaux d'immunosuppression
Réponse cellulaire spécifique anti-CMV	Faible	Intermédiaire	Élevée	Données encore limitées

CS : corticostéroïdes, MMF : mycophénolate mofétil, OKT3 : muromonab-CD3

Issu de (Hantz, Moret, et Alain 2019)

VII.3. Les infections congénitales par le HCMV

En plus des transmissions horizontales précédemment évoquées, HCMV peut se transmettre de manière verticale au fœtus par le placenta. HCMV est la principale cause infectieuse des anomalies congénitales. L'incidence de l'infection congénitale par le HCMV est d'environ 0,2 à 2% (William D Rawlinson et al. 2017). En France, la séroprévalence HCMV est relativement faible comparée à la prévalence mondiale chez les femmes en âge

de procréer (Figure 3), donc le risque de primo-infection durant la grossesse est non négligeable. Lors d'une primo-infection maternelle, le risque de transmission au fœtus est d'environ 30%. Une réactivation virale est également possible chez les femmes séropositives avec un risque de transmission d'environ 1% (Zammarchi et al. 2020). L'infection congénitale par le HCMV est associée à des séquelles cliniques graves chez le fœtus. À la naissance, bien que 85 à 90% des nourrissons infectés soient asymptomatiques, 10 à 15% présentent une maladie à HCMV. Ainsi, l'infection congénitale par le HCMV est la première cause de perte d'audition d'origine non génétique. On retrouve également des atteintes du système nerveux central, hépatiques et hématologiques (Marsico et Kimberlin 2017). La maladie des inclusions cytomégaliqes généralisées est exceptionnelle : elle atteint moins de 5% des nouveau-nés infectés soit 1 à 5 cas pour 10 000 naissances. Les formes sévères consistent en une infection généralisée, ictéro-hémorragique, avec des pétéchies, une hépatosplénomégalie, un ictère, une microcéphalie chez un nouveau-né de petit poids, souvent prématuré. Elles s'accompagnent d'une mortalité de 30% à court ou moyen terme, les enfants survivants restant porteurs de séquelles neurologiques dans 90% des cas. Actuellement, il n'existe pas de recommandations en faveur d'un dépistage généralisé de l'infection par le HCMV lors de la grossesse. Il est recommandé de pratiquer une sérologie HCMV, voire l'avidité des IgG selon le contexte lors de suspicion de primo-infection ou de réactivation virale. Une PCR CMV sur liquide amniotique peut également être proposée à partir de 6 semaines après l'infection afin de confirmer l'atteinte fœtale (William D Rawlinson et al. 2017).

VIII. HCMV et traitements

VIII.1. Antiviraux

Devant la dissémination mondiale de HCMV, ses capacités d'échappement immunologique et son impact sur la santé publique, différents traitements antiviraux ont été développés en prophylaxie chez les patients allogreffes de moelle et les transplantés d'organe.

Actuellement le ganciclovir intra-veineux ou *per os* et sa prodrogue valganciclovir *per os* sont les deux thérapeutiques les plus utilisées. Le valganciclovir est métabolisé en ganciclovir par des estérases hépatiques et intestinales. Le ganciclovir, un analogue acyclique de la guanosine, inhibe l'ADN polymérase pUL54 une fois qu'il est sous sa forme triphosphorylée. Il est à noter que la première phosphorylation est permise par la kinase pUL97. Ces traitements, considérés comme les « gold-standards » lors de la réactivation virale ou en prophylaxie chez les personnes greffées, ont néanmoins des effets secondaires comme la

neutropénie et la thrombopénie (B. A. Krishna, Wills, et Sinclair 2019). De plus, des résistances à ces traitements sont apparues avec des mutations du gène *UL97* détectées dans la plupart des cas de résistance au ganciclovir. Les mutations de *UL54* peuvent, quant à elles, conférer une résistance à différentes thérapeutiques antivirales et sont susceptibles d'émerger après une prise prolongée de ganciclovir (Hakki et Chou 2011). En effet, le cidofovir et le foscarnet sont des antiviraux qui inhibent aussi la polymérase pUL54 et une résistance croisée peut apparaître lors de mutations touchant *UL54*. Néanmoins, le cidofovir et le foscarnet ont l'avantage d'avoir moins d'effets cytopéniants mais leur néphrotoxicité est problématique pour les patients transplantés rénaux (Upadhyayula et Michaels 2013).

D'autres antiviraux ont donc été développés en cas de contre-indication ou de résistance virale. Le maribavir, un inhibiteur de pUL97 indépendant de pUL54, a présenté moins d'hématotoxicité et de néphrotoxicité que ses prédécesseurs (ganciclovir, valganciclovir) (Marty et al. 2011). Le letermovir, un nouvel antiviral avec peu d'effets secondaires, est un inhibiteur de pUL56 prometteur qui a l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans la prophylaxie de la réactivation de HCMV et de la maladie à CMV chez les patients allogreffés (B. A. Krishna, Wills, et Sinclair 2019). La protéine pUL56 fait partie d'un complexe (pUL51/pUL56/pUL89) impliqué dans le clivage et « l'empaquetage » de l'ADN viral (Ligat et al. 2018). De rares mutations des gènes *UL89* et *UL51* ont néanmoins été décrites *in vitro* conférant une sensibilité réduite au letermovir (Chou 2017). Chez les patients, peu de cas de résistances au letermovir ont été actuellement décrits (Cherrier et al. 2018; Douglas et al. 2020) mais les cas de résistances restent à rechercher en cas d'inefficacité thérapeutique.

Le mécanisme d'action des antiviraux est représenté par la Figure 15.

Au sein d'une cohorte française 346 patients, Hantz et coll. ont suspecté une résistance aux traitements antiviraux chez 10,7% des patients, dont 11,5% chez les patients transplantés d'organe et 6,8% ayant eu une allogreffe. Une résistance virologique par mutations de *UL97* ou *UL54* a été retrouvée dans 5,2% des 346 patients de la cohorte avec 5,9% de résistance chez les patients greffés d'organe et 1,7% chez les allogreffés (Hantz et al. 2010).

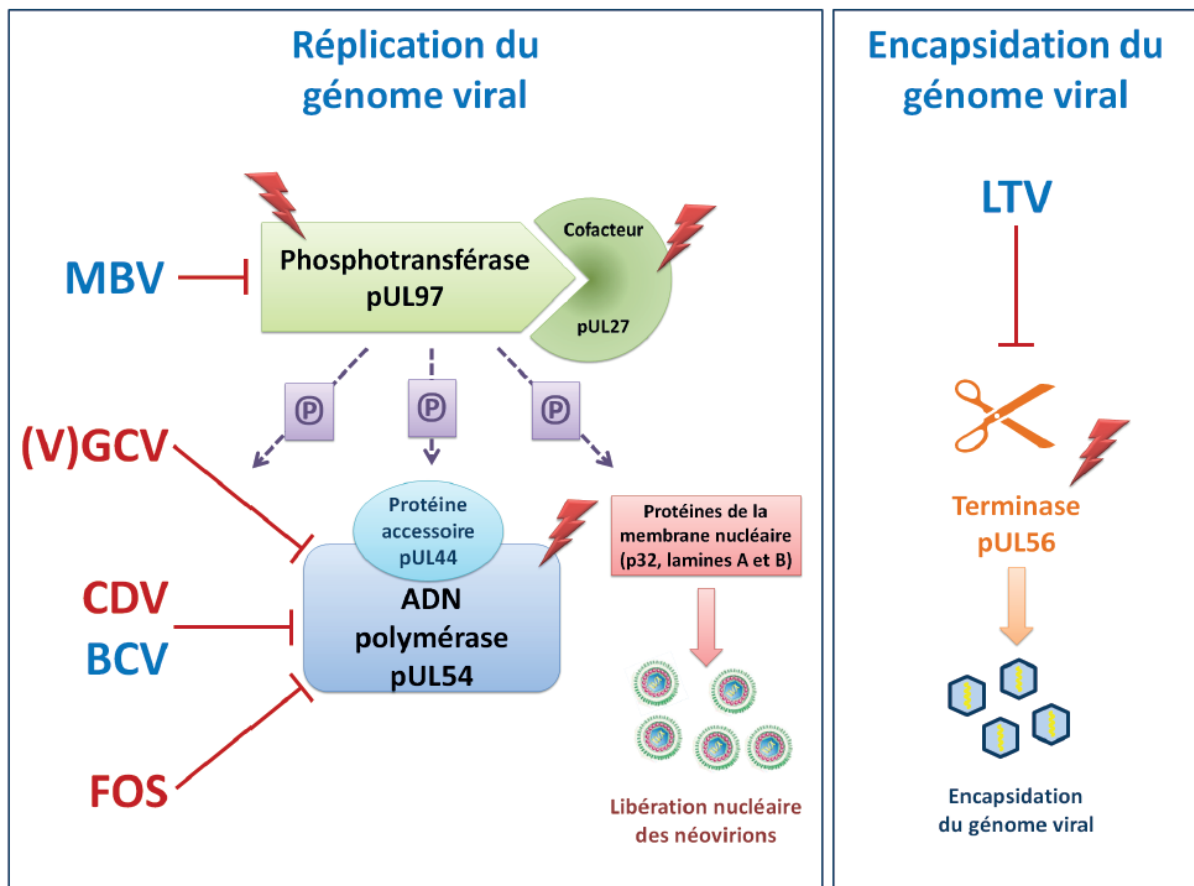


Figure 15 : Mécanisme d'action des antiviraux

L'ADN polymérase virale pUL54 est la principale cible des antiviraux actuellement disponibles : Dans la cellule infectée par le CMV, les analogues nucléosidiques (ganciclovir ou sa prodrogue valganciclovir) subissent une première étape de phosphorylation par la phosphotransférase virale pUL97 avant d'être phosphorylés par les kinases cellulaires. Les analogues nucléotidiques (cidofovir ou sa prodrogue brincidofovir) sont directement phosphorylés par les kinases cellulaires. Le foscarnet est directement actif sur l'ADN polymérase pUL54. Le maribavir est un inhibiteur direct de la phosphotransférase virale pUL97. Le létermovir est un inhibiteur de la terminase virale pUL56. Des résistances peuvent émerger par apparition de mutation(s) sur les différentes enzymes virales. Les éclairs rouges correspondent à des mutations de résistance aux antiviraux ; @correspond à une phosphorylation. BCV : brincidofovir ; CDV : cidofovir ; FOS : foscarnet ; LTV : létermovir ; MBV : maribavir ; (V)GCV : (val)ganciclovir. Issu de (Alain et Garrigue 2019)

VIII.2. Thérapie Cellulaire

Comme nous l'avons vu, un déficit en LT cytotoxiques spécifiques augmente le risque de réactivation du HCMV. La thérapie cellulaire à base d'un transfert adoptif de LT dans le but de restaurer les réponses anti-HCMV semble être une stratégie thérapeutique particulièrement intéressante chez les greffés de moelle (Lilleri et al. 2008). La première thérapie cellulaire non spécifique étudiée dans le cadre de l'allogreffe était l'injection de lymphocytes issus du donneurs (DLI). Cependant les DLI ont entraîné des problèmes de GvH du fait d'une alloréactivité et la résolution de la réactivation virale n'était pas obtenue,

probablement à cause d'une trop faible quantité de lymphocytes spécifiques anti-HCMV (Kim et al. 2004). Une autre technique de thérapie cellulaire consiste à expandre les lymphocytes anti-HCMV *in vitro* avant d'injecter spécifiquement ces LT CD8+ au receveur (Walter et al. 1995). La thérapie cellulaire spécifique anti-HCMV a permis ainsi de résoudre des épisodes de réactivation virale, même en cas de résistance aux thérapies médicamenteuses (Einsele et al. 2002). Il semblerait que la reconstitution du pool cellulaire T effecteur et mémoire garantisse une protection longue contre HCMV, favorisé par le transfert combiné de LT CD8+ et CD4+ (Peggs et al. 2009). De plus ces études n'ont pas montré de toxicité importante ou de majoration de GvH contrairement aux DLI.

D'autres pistes sont actuellement à l'étude dans les traitements par thérapies cellulaires des réactivations virales ou primo-infection à HCMV. Une des limites de la thérapie classique est son applicabilité uniquement au donneur séropositif : l'expansion cellulaire ne peut se concevoir à partir d'un pool lymphocytaire naïf. On peut noter le développement d'une thérapie cellulaire basée sur des LT naïfs du donneur dans lesquels ont été transférés par rétrovirus des gènes du TCR spécifique de HCMV reconnaissant des épitopes de pp65 (Schub et al. 2009). Cette dernière stratégie relativement lourde sera sûrement supplantée par une thérapeutique novatrice particulièrement appréciée des hématologues : les *autologous chimeric antigen receptor (CAR) T-cells*. Des CAR-T cells dérivés des LT CD8+ et CD4+ reconnaissant la gB de HCMV ont été produits avec des résultats pré-cliniques encourageant en terme de cytotoxicité (Olbrich et al. 2020).

Finalement la thérapie cellulaire spécifique anti-HCMV semble utile dans les cas graves de réactivation ou de primo-infection par le HCMV lors notamment d'une greffe hématopoïétique ou lors de résistance aux traitement antiviraux classiques.

VIII.3. Vaccination

Le développement d'un vaccin est un enjeu de santé public mondial. Actuellement, il n'existe malheureusement aucun vaccin évalué comme suffisamment efficace pour être commercialisé. Les objectifs prophylactiques des vaccins HCMV seraient prioritairement d'éviter l'infection par le HCMV des sujets sains, ainsi que d'éviter les infections congénitales. Un autre objectif, thérapeutique, serait d'éviter les réactivations virales chez les personnes immunodéprimées, voire d'éliminer les réservoirs du virus. Différents types de vaccins vivants atténués ou recombinants ont été évalués dans la littérature (Tableau 2).

Tableau 2 : Essais cliniques vaccinaux publiés contre HCMV

Type de vaccin	Antigène utilisé	Phase clinique	Référence
Vaccin vivant	Souche Towne	Phase I/II	(Plotkin et al. 1975)
	Souche AD 169 avec restauration de l'expression du complexe pentamérique	Préclinique	(D. Wang et al. 2016)
	Souche AD 169 avec restauration de l'expression du complexe pentamérique	Phase I	(Stuart P. Adler et al. 2019)
	Souche Towne/Toledo	Phase I	(Stuart P. Adler et al. 2016)
Vaccin sous unitaire	gB	Phase I	(R. F. Pass et al. 1999; Mitchell et al. 2002) (Robert F. Pass et al. 2009;
	gB	Phase II	Griffiths et al. 2011; Bernstein et al. 2016)
Vaccin à vecteur viral	gB	Phase I	(S. P. Adler et al. 1999)
	Pp65	Phase I	(Berencsi et al. 2001)
	gB/IE-1/pp65	Phase I	(Bernstein et al. 2009)
	pp65/IE1/IE2	Phase I	(La Rosa et al. 2017)
Vaccin par cellules dendritiques	pp65	Phase I	(Van Craenenbroeck et al. 2015)
Vaccin à ADN	gB/IE1/pp65	Phase I	(Jacobson et al. 2009)
	gB/pp65	Phase II	(Kharfan-Dabaja et al. 2012; Vincenti et al. 2018)

Adapté de (Gerna et Lilleri 2019)

Plotkin et col. ont effectué leurs recherches sur les vaccins vivants atténués dérivés de la souche Towne après 125 passages dans des fibroblastes (Plotkin et al. 1975). Ce vaccin vivant Towne n'empêchait pas les femmes en âge de procréer d'être infectées par HCMV (S. P. Adler et al. 1995). Une explication de l'échec de ce vaccin serait l'acquisition de mutations dans les gènes codant pour le pentamère gH/gL/UL128,130,131 lors des différents passages en laboratoire de cette souche (Ryckman et al. 2006). Or comme nous l'avons vu précédemment, ce pentamère permet l'entrée du virus dans les cellules épithéliales et endothéliales. La souche AD169 a également subi des mutations (Wilkinson et al. 2015)

rendant les vaccins AD169 inefficaces pour protéger des primo-infections. Toujours concernant les vaccins vivants, un vaccin chimérique dérivé des souches Towne/Toledo a été testé en phase 1 retrouvant une bonne innocuité mais une immunogénicité décevante avec une production d'anticorps chez seulement 11 des 36 sujets sains vaccinés (Stuart P. Adler et al. 2016).

Les stratégies de vaccination sous-unitaire par protéine recombinante ont été évaluées à plusieurs reprises avec une efficacité d'environ 50%, i.e. la diminution de l'incidence de primo-infection de HCMV dans une phase 2 utilisant la gB adjuvantée de MF59 (un adjuvant lipidique dérivé du squalène) (Robert F. Pass et al. 2009). La gB/MF59 a également permis de diminuer la virémie et l'utilisation de traitement antiviraux (ganciclovir) chez des patients ayant eu une greffe d'organe, par rapport au groupe placebo, dans un essai de phase 2 (Griffiths et al. 2011). L'utilisation de protéines recombinantes de la gB donnant des résultats jugés insuffisants, des essais vaccinaux se sont alors concentrés sur des complexes glycoprotéiques. Ainsi, l'étude en phase 1 d'un vaccin vivant atténué V160 dérivé de la souche AD169 avec des mutations réparées et surexprimant le complexe pentamérique gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131, formulé avec un adjuvant d'aluminium, montre une bonne immunité cellulaire et humorale maintenue sur 12 mois ainsi qu'une bonne tolérance (Stuart P. Adler et al. 2019).

Des stratégies vaccinales anti-HCMV reposant sur l'utilisation de vecteurs viraux afin d'immuniser les sujets contre des antigènes viraux immunodominants ont été utilisées pour adresser des protéines comme la pp65 ou la gB. Le *canarypox* virus a été utilisé dans des essais de phase 1 pour induire une immunité cellulaire satisfaisante anti-pp65 (souche Towne) (Berencsi et al. 2001) et une immunité humorale satisfaisante anti-gB chez des sujets sains (S. P. Adler et al. 1999). Afin d'améliorer l'efficacité vaccinale, les vaccins vectorisés par des virus ont augmenté leur nombre de cible et ont permis des réponses immunitaires cellulaires et humorales combinées. Des vaccins exprimant la protéine gB et une protéine de fusion IE-1/pp65 vectorisés par le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne ont montré de bonnes réponses immunitaire dans un essai de phase 1 (Bernstein et al. 2009). D'autres essais thérapeutiques de phase 1 utilisent le *Modified Vaccinia Ankara* comme vecteur d'expression des protéines pp65, IE-1 (exon-4), et IE-2 (exon-5) (La Rosa et al. 2017) montrant une expansion de cellules T mémoires et une bonne tolérance vaccinale encourageant un essai de phase 2 chez les patients infectés par HCMV en attente de greffes de CSH afin de diminuer les complications post-greffe (#NCT02506933).

La vaccination en utilisant des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC) a également été développée pour HCMV. La transfection d'ARNm de pp65 dans les Mo-DC autologues de sujets sains ou ayant reçu une allogreffe de CSH a permis de montrer une expansion de cellules T spécifiques productrices d'IFN γ avec néanmoins un risque augmenté de GvH chez ces patients (Van Craenenbroeck et al. 2015). Ce type de vaccin nécessitant des cellules autologues semble réalisable uniquement chez les patients en attente de greffe et est actuellement inenvisageable pour la majorité de la population.

Des vaccins à ADN ont également été développés. 108 participants d'une phase 2 séropositifs pour HCMV ont reçu un placebo ou un vaccin ADN codant pour la gB et la pp65 avant une greffe de CSH, suivi de 3 rappels. Malheureusement, aucune différence significative n'a été observée entre les 2 groupes quant à la nécessité de l'utilisation d'antiviraux lors du suivi virémique des patients (Kharfan-Dabaja et al. 2012). De manière équivalente, une phase 2 du vaccin à ADN ASP0113 codant pour la gB et la pp65 n'a pas montré d'efficacité sur la virémie de patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale (Vincenti et al. 2018). Des vaccins ARN sont également en cours de développement. Une phase 1 de Moderna est actuellement en cours (NCT03382405) afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité des vaccins RNA-1647 comprenant les ARNm de la gB et du complexe pentamérique et mRNA-1443 comprenant l'ARNm de la protéine pp65.

Finalement, la production de vaccin anti-HCMV reste un enjeu de santé public mondial puisque ce virus semble déjouer toutes les stratégies vaccinales actuelles. Ainsi de nombreux essais sont actuellement en cours et sont rapportés dans le Tableau 3. Celles-ci se concentrent essentiellement sur des vaccins multi-antigéniques permettant de développer des réponses immunitaires cellulaires et humorales fortes mais dépendantes de la souche virale utilisée. De plus, l'infection par plusieurs génotypes de HCMV ne semble pas rare au cours de la primo-infection rendant les stratégies vaccinales complexes (Ross et al. 2020). Ainsi, la production d'anticorps neutralisants est dépendante des souches virales, et des mutations dans des régions codant pour la gO peut impliquer des diminutions de neutralisation d'anticorps anti-gH faisant partie du complexe pentamérique (Day et al. 2020). Cette observation intéressante nous laisse entrevoir l'importance des épitopes conformationnels des glycoprotéines de l'enveloppe virale dans la production d'anticorps neutralisants et l'impact de diverses mutations sur les complexes glycoprotéiques entiers.

Tableau 3 : Vaccins contre HCMV en cours de développement

Vaccine Category	Vaccines	Antigen Used	Adjuvant	Manufacturer	CT Identifier	Phase
Attenuated and DISC vaccines	V160-001	gB, pp65, IE1	Aluminum phosphate or none	MSD	NCT01986010	1
	Towne-Toledo Chimera Vaccine			CMV Research Foundation. International AIDS Vaccine Institute	NCT01195571	1
	VCL-CT02 Plu Towne CMV			UC-SF, Vical	NCT00370006	1
					NCT00373412	1
Recombinant/Subunit vaccines	GSK1492903A	gB	Proprietary	GSK	NCT00435396	1
	gB subunit	gB	MF59	University College, London	NCT01357915	1
	gB/ MF59	gB	MF59	NIAID	NCT00299260	2
	gB/ MF59	gB	MF59	Sanofi Pasteur	NCT01883206	2
Vectored vaccines	AVX601 HCMV-MVA Triplex	gB, pp65, IE1	None	AlphaVax, Inc	NCT00439803	1
			None	(Novartis, GSK)	NCT01941056	1
		pp65, IE1-exon4,	None	City of Hope, National Cancer Institute	NCT02506933	2
	HB-101	IE2- exon5 gB, pp65	None		NCT02798692	
	ALVAC-pp65	pp65	None	Hookipa Biotech NHLBI	NCT00353977	
DNA, mRNA vaccines	ASP0113	gB, pp65	CRL 1005BAK	Astellas, Vical	NCT02103426	1
	VCL-CB01	gB, pp65		Astellas, Vical	NCT01903928	2
Peptide Vaccines	CMVpp65- A*0201 peptide; containing either helper T lymphocyte (HTL)	gB, pentamer complex; pp65; T cell epitope fused to either PADRE or CMV tetanus epitope	CRL 1005BAK	Moderna	NCT01974206	2
			None		NCT01877655	3
			None		NCT00285259	2
	PADRE peptide or tetanus toxoid peptide			City of Hope, National Cancer Institute	NCT00712634	1
	Tetanus-HCMVpp65 fusion peptide (CMVpp65- A*0201; CMVPepVax)	pp65; T cell epitope fused to tetanus epitope		Cancer Institute	NCT00722839	1
				City of Hope, National Cancer Institute	NCT01588015	1
					NCT02396134	2

Issu de (Esposito et al. 2021)

Une stratégie vaccinale élégante a été récemment proposée (Valencia et al. 2019). Elle se base sur un virus vivant atténué de singe, le rhesusCMV (RhCMV), délété par les auteurs à la fois du gène codant pour la gL (délétion responsable de son atténuation) et des gènes *Rh178* et *Rh182-189* responsables de l'évasion immunitaire liée aux protéines du CMH de classe I, afin d'améliorer la réponse immunitaire des LT CD8. Ce vaccin RhCMV a permis l'élaboration d'une réponse immunitaire robuste même si le titre des anticorps neutralisants anti-gB était inférieur à une vaccination par gB recombinante seule. Les auteurs ont procédé à un challenge avec 10^6 plaque-forming unit (PFU) de RhCMV inoculé par voie sous-cutanée qui a induit une primo-infection par le RhCMV chez la totalité des singes. Même si l'infection

par le CMV est préférentiellement oro-pharyngée et respiratoire, cet essai pré-clinique se mettant dans les meilleures dispositions possibles (sélection de vaccin muté, infection par une souche identique) démontre un échec lors du challenge viral. Dans la littérature, les autres essais pré-cliniques et cliniques décrivant une bonne réponse cellulaire et humorale du système immunitaire mais éprouvent des difficultés à développer une prophylaxie efficace permettant la mise en place d'une AMM.

La rectocolite hémorragique (RCH)

I. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

La rectocolite hémorragique (RCH) a été nommée ainsi et caractérisée en 1909 par la *Royal Society of Medicine* de Londres comme l'une des deux principales formes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Allchin 1909). La RCH est caractérisée par une inflammation des muqueuses débutant dans le rectum et s'étendant de manière proximale et de manière continue dans le colon se manifestant par des selles glairo-sanglantes. La 2^e forme des MICI, la maladie de Crohn (MC), est caractérisée par des lésions discontinues atteignant potentiellement tout le tractus intestinal (Hibi et Ogata 2006). L'inflammation dans la RCH est généralement limitée à la muqueuse avec des lésions superficielles de la paroi intestinale, tandis que la MC est caractérisée par une inflammation transmurale atteignant toute la paroi intestinale. La physiopathologie des MICI est complexe avec plusieurs facteurs favorisant les poussées de cette maladie dont une réponse immunitaire dérégulée, un microbiote intestinal altéré (dysbiose), des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux (Hibi et Ogata 2006). Le diagnostic des MICI repose sur un faisceau d'arguments cliniques, endoscopiques et histologiques. Il n'est cependant pas toujours simple et les diagnostics différentiels doivent être recherchés. Les MICI évoluent par poussées entrecoupées de périodes de rémission et l'objectif de leurs traitements est de diminuer le nombre de poussées et d'allonger la période de rémission (Fernando Magro et al. 2017).

La suite de l'exposé se consacrera principalement à la RCH puisque le rôle péjoratif de HCMV chez les patients atteints de MICI a particulièrement été démontré dans le cadre de la RCH et non dans la MC. Ce lien RCH / HCMV sera détaillé dans la 3^{ème} partie de cette introduction et a fait l'objet d'une revue publiée dans *Microorganisms*.

II. Contexte historique et épidémiologie

II.1. Un peu d'histoire

Le médecin Sir Samuel Wilks a publié en 1859 un *case report* en utilisant les termes de « *ulcerative colitis* » pour décrire la maladie que nous connaissons aujourd'hui comme la RCH ou la colite ulcéreuse. Ainsi, plusieurs publications au cours de la seconde moitié du XIX^e siècle ont répertorié cette maladie diarrhéique grave et persistante qui ne semblait pas d'origine infectieuse (Allchin 1909). Les premières thérapeutiques des patients atteints de

RCH consistaient en la pratique d'iléostomie (Cattell 1942), de colectomie totale (Wright 1942) ou de transfusion sanguine (Bourne 1926). Des colectomies ont été également proposées à des patients atteints de cancer du côlon associé à la RCH (Wangensteen et Toon 1948) rendant déjà compte d'une complication possible de la RCH. Il faut attendre le milieu du XX^e siècle pour voir arriver des traitements médicamenteux avec la preuve de l'efficacité des corticoïdes sur la morbi-mortalité liée à la RCH (Truelove et Witts 1955). Malheureusement, l'utilisation des corticoïdes en traitement de fond entraîne des effets secondaires importants comme l'ostéoporose, des troubles métaboliques et endocriniens. Par la suite, la sulfasalazine initialement utilisée dans la polyarthrite rhumatoïde, et l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA), sont des médicaments aux propriétés anti-inflammatoires qui ont démontré leur efficacité dans la RCH (Azad Khan, Piris, et Truelove 1977). L'azathioprine, un pro-médicament dont le métabolite actif est la 6-mercaptopurine, a aussi été développée comme traitement de fond des patients atteints de RCH (Jewell et Truelove 1974). Permises par une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie et des développements technologiques, une évolution majeure dans la prise en charge des patients atteints de RCH est l'arrivée des anticorps monoclonaux thérapeutiques comme l'anti-TNF α (Rutgeerts et al. 2005).

II.2. L'épidémiologie

L'incidence et la prévalence de la RCH les plus élevées entre 1990 et 2016 ont été enregistrées en Europe, en Amérique du Nord et en Océanie (Figure 16). En Europe de l'Ouest l'incidence est de 1,7 à 17,2 pour 100 000 habitants, en Amérique du Nord de 8,8 à 23,1 et de 7,3 à 17,4 en Océanie (Ng et al. 2017). En Europe de l'Ouest, la prévalence est de 43,1 à 412 pour 100 000 habitants, en Amérique du Nord de 139,8 à 286,3 et de 145 à 196 (Ng et al. 2017). Les incidences de la RCH continuent d'augmenter dans ces régions du monde et les prévisions de prévalence pour les pays industrialisés devraient croître devenant ainsi un enjeu majeur de santé publique au niveau mondial (Kaplan 2015). En France, de 1988 à 2014, 7 362 patients étaient enregistrés avec une RCH (Fumery et al. 2018). Au cours de cette période, l'incidence de la RCH semble stable à 4,4 pour 100 000 habitants. En général, le diagnostic de RCH en France est posé entre 17 et 39 ans. Cependant une augmentation considérable de l'incidence a été observée chez les adolescents âgés de 10 à 16 ans passant de 1,6 à 4,1 en moins de 30 ans pour 100 000 habitants (+156%) (Fumery et al. 2018). Cette augmentation pourrait être le reflet d'un diagnostic et d'une prise en charge de plus en plus précoce comme le reflet d'une augmentation du nombre de cas de cette pathologie.

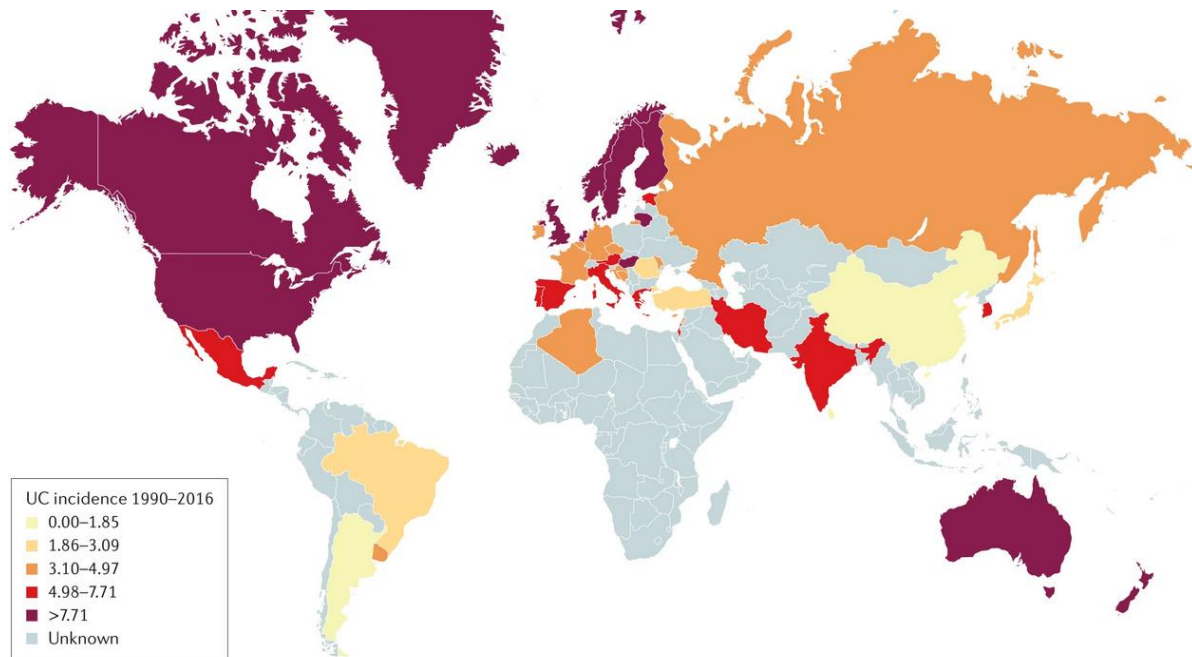


Figure 16 : incidence de la rectocolite hémorragique de 1990 à 2016
 L'incidence de la RCH la plus élevée est en Amérique du Nord, en Europe du Nord et en Océanie (>7,7).
 L'Europe de l'Ouest et la Russie ont également une incidence élevée (>3,1).
 Issu de (Taku Kobayashi et al. 2020)

III. Physiopathologie de la RCH

La physiopathologie de la RCH est complexe, multifactorielle et n'est que partiellement comprise. En résumé, la RCH est une maladie avec une altération du microbiote intestinal et une atteinte de la barrière intestinale augmentant le passage des microorganismes au niveau muqueux, amenant un contexte inflammatoire et une dérégulation immunitaire. Cette inflammation va être entretenue et amplifiée par le système immunitaire présent au niveau des muqueuses entraînant à son tour une altération de la barrière intestinale. Cette boucle inflammatoire conduit ainsi à la chronicité de cette maladie. Sa physiopathologie est résumée par la Figure 17. Les mécanismes immunologiques en jeu dans la RCH sont détaillés ci-après.

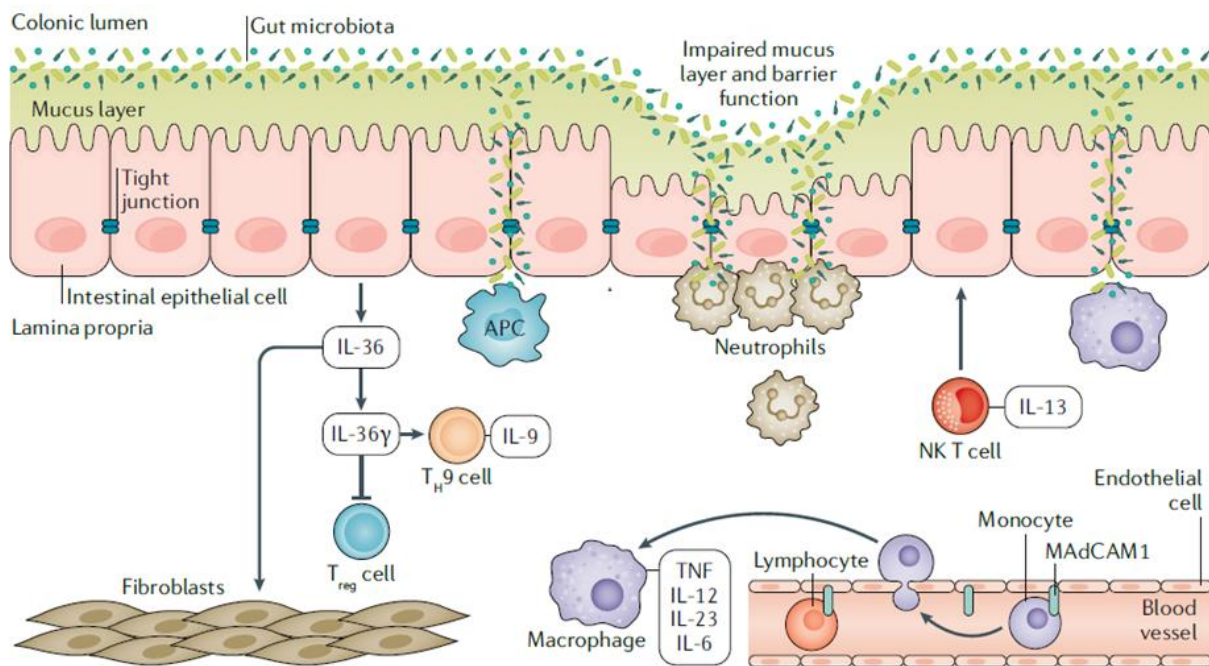


Figure 17 : Physiopathologie de la rectocolite hémorragique

De multiples facteurs contribuent à la physiopathologie RCH. Le microbiote intestinal est perturbé et sa diversité diminuée. La couche de mucus dans la RCH est altérée et cela se caractérise par une diminution de la synthèse de la mucine dans le colon. Ces atteintes entraînent une brèche de la barrière épithéliale et facilite l'entrée de microorganismes dans la muqueuse intestinale activant les macrophages et les CPA. Les chimiokines alors synthétisées attirent les neutrophiles qui construisent la première ligne de réponse cellulaire. Les macrophages produisent le TNF α , IL-12, IL-23 et IL-6 : des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-36 inhibe les Treg, induit la polarisation en LTH9 augmentant la fibrose intestinale. L'IL-13 libérée par les cellules NKT contribue également à la dérégulation de de la barrière intestinale.

Adapté de (Taku Kobayashi et al. 2020)

III.1. L'atteinte de la barrière intestinale

L'homéostasie intestinale repose sur un équilibre fragile maintenu par différents acteurs. Le principal facteur de cette homéostasie est le microbiote intestinal qui fournit des composants nutritionnels et alimentaires qui entretiennent la fonction de la barrière intestinale. La couche de mucus et l'épithélium représentent la première ligne de défense contre l'invasion de microorganismes (Figure 17). La lamina propria est responsable de la préservation d'un état tolérogène chez un individu en bonne santé. Ainsi, la dysbiose, une dysfonction du mucus, un défaut de la barrière intestinale et/ou un état pro-inflammatoire peut perturber cette homéostasie (Martini et al. 2017).

Chez les patients atteints de RCH avec une maladie active, on constate une faiblesse de la couche muqueuse avec une diminution de la synthèse de mucine 2 (Van Klinken et al. 1999). En effet la mucine 2, une glycoprotéine synthétisée par les cellules caliciformes, forme une structure polymérisée qui sert à protéger l'épithélium intestinal. L'IL-13 identifiée

comme une cytokine clef de la physiopathologie de la RCH altère la fonction de barrière épithéliale en déstabilisant les jonctions serrées, en augmentant l'apoptose épithéliale, et en diminuant la vitesse de réparation de cet épithélium (Heller et al. 2005).

La barrière intestinale est importante dans la physiopathologie de la RCH. En effet, une atteinte de celle-ci augmente la présentation antigénique dans la lamina propria et la stimulation des cellules immunitaires locales entraînant une production de cytokines/chimiokines permettant d'entretenir l'inflammation locale et de recruter différentes cellules du système immunitaire (Figure 18) (M. F. Neurath 2019). Le recrutement lymphocytaire est permis par l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ exprimée à la membrane des lymphocytes T, qui reconnaît la protéine *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1* (MAdCAM-1) à la surface de l'endothélium vasculaire intestinal. Le recrutement lymphocytaire au niveau intestinal est responsable de l'entretien de l'inflammation et peut être freiné par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti- $\alpha 4\beta 7$ comme le védolizumab ayant prouvé son efficacité dans la RCH (Feagan et al. 2013).

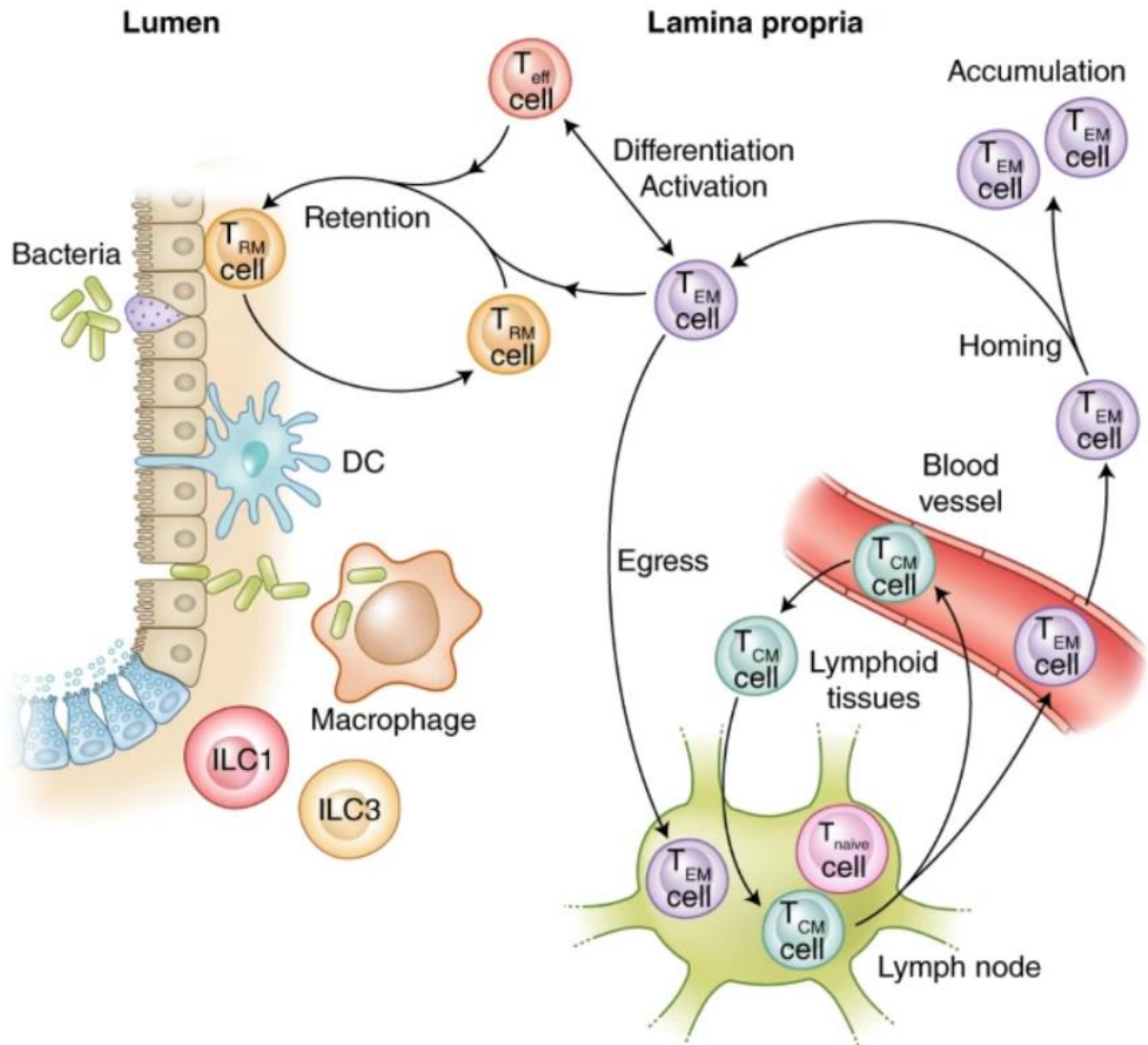


Figure 18 : Migration cellulaire au niveau de la muqueuse intestinale
 Contrairement aux LT_{CM}, les LT_{EM} réintègrent le tissu intestinal ce qui conduit à leur accumulation dans les muqueuses. Les LT_{EM}, peuvent se différencier en LT effecteurs provoquer des lésions tissulaires et peuvent se différencier en cellules T_{RM} qui résident en permanence dans le tissu. Ces lymphocytes tissulaires entretiennent une inflammation locale comme d'autres cellules du systèmes immunitaires : les macrophages, les CD et les ILC.
 Issu de (M. F. Neurath 2019)

III.2. La réponse immunitaire muqueuse

Les différentes cytokines et voies de différenciation lymphocytaire sont représentées par la Figure 19 afin de résumer l'immunité des muqueuses dans la RCH.

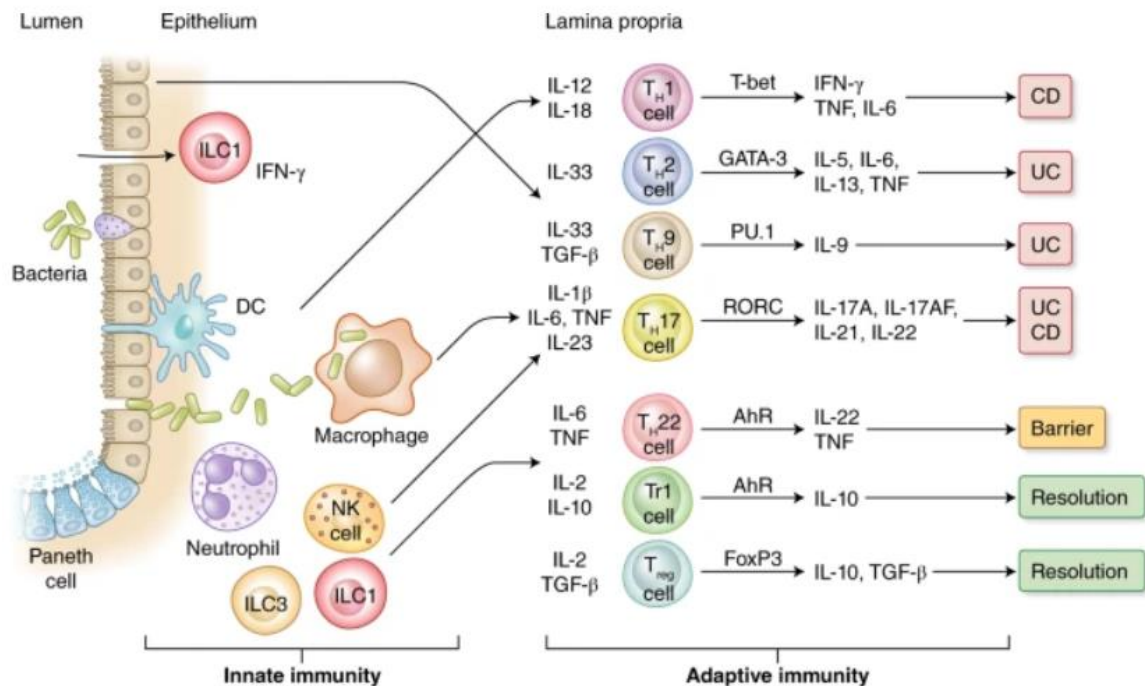


Figure 19 : La réponse immunitaire muqueuse dans les MICI

Les cellules immunitaires innées impliquées dans la physiopathologie des MICI sont sur la gauche de cette figure. Les macrophages, les DC, les neutrophiles, les ILC produisent des cytokines induisant la polarisation des cellules du système immunitaire adaptatif. Les polarisations Th2, Th9, Th17 sont retrouvées dans la RCH alors que la MC est plutôt polarisée Th1, Th17. Issu de (M. F. Neurath 2019)

III.2.a. Les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont recrutés au niveau de la zone inflammatoire (Figure 17) de la muqueuse notamment par l'IL-1 β et seraient une source importante de production d'IL-23 (Kvedaraite et al. 2016) jouant de ce fait un rôle dans la physiopathologie de la RCH en favorisant la différenciation des LT vers les Th17. La protéine-arginine désiminase de type 4, l'élastase et la myéloperoxydase sont des protéines synthétisées par les neutrophiles qui sont élevées dans la muqueuse des patients atteints de RCH, que cela soit en phase de rémission ou en phase active de la maladie. Les neutrophiles des patients atteints de RCH libèrent localement ces protéines associées à la voie *neutrophil extracellular traps* (NET) en réponse à une stimulation par le TNF α . Une expression réduite de ces protéines est observée lors de la mise en place de traitement par anti-TNF α , ce qui suggère un rôle des neutrophiles dans la physiopathologie de la RCH à travers le phénomène de « NETose »

(Dinallo et al. 2019), mécanisme impliqué dans la réponse antimicrobienne qui peut causer des dommages tissulaires lorsqu'il n'est pas régulé (Papayannopoulos 2018). En effet la « NETose » est un mécanisme immunitaire inné médié par les neutrophiles qui protège contre différents types de pathogènes. La « NETose » est également impliqué dans des pathologies associée à une dérégulation du système immunitaire comme les maladies inflammatoires chroniques pouvant induire des lésions tissulaires (Papayannopoulos 2018). Le TNF α et la perméabilité tissulaire augmentés entraînant une reconnaissance des pathogènes par les neutrophiles sont des arguments en faveur du rôle de la « NETose » dans la RCH.

III.2.b. Une orientation Th2

Classiquement la RCH est considérée comme une maladie de type Th2 et la MC de type Th1. Plusieurs cytokines clés comme le TNF α sont partagées par ces 2 pathologies et sont la cible de traitements spécifiques anti-cytokines communs. Néanmoins la distinction immunologique de ces 2 pathologies reste complexe.

L'IL-13 est surexprimée dans la lamina propria des patients atteints de RCH affectant ainsi la barrière intestinale (Heller et al. 2005). Une étude murine de modèle de colite RCH-like induite par l'oxazolone a identifié les cellules NKT comme les cellules productrices d'IL-13 (Heller et al. 2002). Cependant, un essai clinique de phase II mené chez des patients atteints de RCH modérée à sévère traités par un anticorps monoclonal anti-IL-13 n'a montré aucun bénéfice clinique statistiquement significatif (Danese et al. 2015) minimisant probablement le poids de cette cytokine seule dans une physiopathologie plus globale. D'autres part, les LT CD4 $^{+}$ de la muqueuse de patients de RCH cliniquement active sécrètent de l'IL-5, cytokine majeure de la voie Th2 (Fuss et al. 1996). Ces différentes données nous amènent à penser que l'orientation Th2 est une des voies de différenciation représentée dans la RCH.

III.2.c. Une orientation Th9

Plus récemment, les LT sécrétant l'IL-9 et exprimant les facteurs de transcription *Interferon regulatory factor 4* (IRF4) et PU.1 ont été retrouvés dans des biopsies de muqueuse inflammatoire des patients atteints de RCH, ouvrant la voie Th9 (Nalleweg et al. 2015). Les lymphocytes Th9, induits par les cytokines IL-4 et TGF β (présentes au niveau de la muqueuse intestinale), semblent jouer un rôle primordial dans la physiopathologie de la RCH en altérant la cicatrisation des muqueuses et en exacerbant l'activité de la maladie (Gerlach et al. 2014).

L'IL-36, une cytokine pro-inflammatoire de la famille de l'IL-1, présente un taux élevé au niveau de la muqueuse des patients atteints de RCH (Nishida et al. 2016). L'IL-36 augmente la fibrose intestinale (Scheibe et al. 2019), inhibe l'expression de Foxp3 altérant ainsi la différenciation en Lymphocytes T régulateurs (Treg), et semble promouvoir la différenciation en Th9 (Harusato et al. 2017).

Le rôle des Th9 dans la RCH reste encore à explorer mais des possibilités thérapeutiques sont déjà en cours de développement. L'inhibition de l'axe IL-36/IL-36 Récepteur (IL-36R) permettrait d'avoir un effet combiné anti-inflammatoire et anti-fibrotique, intéressant dans la RCH où la fibrose intestinale persiste. Le spesolimab, un antagoniste de l'IL-36R, fait actuellement l'objet d'essais cliniques dans la RCH (Neufert, Neurath, et Atreya 2020). Comme le suggère cette revue, il est également permis d'imaginer une combinaison d'un anti-IL36R avec d'autres types d'anticorps monoclonaux comme les anti-TNF α . Si cette thérapie se révèle efficace dans le traitement de la RCH, il faudra néanmoins rester attentif au risque de réactivation virale de HCMV, étant donné le rôle de l'IL-36 dans l'immunité antivirale, en particulier dans les infections à herpèsvirus (Peng Wang, Gamero, et Jensen 2019), bien que son rôle dans l'infection par le HCMV reste méconnu.

III.2.d. Une orientation Th17

La production de TNF α majoritairement par les macrophages CD14+, mais aussi par les fibroblastes chez les patients atteints de MICI induit une inflammation intestinale chronique avec une induction de mort cellulaire, d'angiogenèse, d'activation macrophagique et lymphocytaire et des lésions des cellules épithéliales (Sands et Kaplan 2007; Günther et al. 2011). Le TNF α est une cytokine centrale dans la physiopathologie des MICI, entretenant l'inflammation locale de la muqueuse des patients atteints de RCH. Son rôle essentiel a donné lieu à des thérapeutiques basées sur les anticorps monoclonaux anti-TNF α avec un succès thérapeutique qui a complètement changé la prise en charge des patients RCH (Lamb et al. 2019). Une autre cytokine essentielle à la physiopathologie de la RCH est l'IL-23 produite par les macrophages (T. Kobayashi et al. 2008) et les neutrophiles (Kvedaraite et al. 2016). Cette production d'IL-23 favorise la différenciation vers la voie Th17 avec une synthèse d'IL-17 jouant également un rôle important dans la physiopathologie de la RCH par recrutement de neutrophiles (Zeng et al. 2019), et par l'atteinte de la barrière intestinale avec l'augmentation de sa perméabilité (Maxwell et al. 2015). Les *innate lymphocyte cells 3* (ILC3) (des lymphocytes dépourvus de TCR et donc incapables de reconnaissance spécifique d'antigène) jouent également un rôle dans le remodelage tissulaire et l'inflammation de la lamina propria par production d'IL-22 et IL-17 (Zeng et al. 2019). L'importance de cet axe

Th17 a été confirmée par l'efficacité des traitements par anticorps monoclonaux anti-p40 (sous unité commune de l'IL-12 et de l'IL-23) chez les patients atteints de RCH (Sands et al. 2019)

III.2.e. Le contre poids des Treg

Le rôle anti-inflammatoire clé de l'IL-10 a fortement été suggéré par la mise en place d'un modèle murin déficient en IL-10 (IL-10^{-/-}) induisant des colites spontanées (Kühn et al. 1993). L'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire produite par les Treg, est importante pour la résolution des colites expérimentales (Uhlir et al. 2006). De plus, on retrouve chez les patients atteints de RCH une quantité diminuée de Treg circulants avec une capacité fonctionnelle altérée, corrélée à l'activité de la maladie suggérant l'importance de cette sous population lymphocytaire dans la physiopathologie de la RCH (Mohammadnia-Afrouzi et al. 2015). Des études plus approfondies du rôle des Treg tissulaires seraient probablement intéressantes pour se rendre compte de l'impact de cette sous population lymphocytaire dans la physiopathologie.

III.3. L'altération du microbiote

L'homéostasie de la muqueuse intestinale est basée sur la coexistence de divers commensaux qui ont colonisé l'intestin. Il semblerait que les troubles de la flore intestinale jouent un rôle important dans la pathogenèse de la RCH ouvrant la voie à une nouvelle stratégie thérapeutique : la transplantation de microbiote fécal.

Le microbiote intestinal colonise le tractus gastro-intestinal et en particulier le côlon, car il fournit un environnement nutritionnel privilégié pour les microorganismes intestinaux dont les principaux représentants sont les Firmicutes et les Bactéroïdes (Rinninella et al. 2019). La flore intestinale joue un rôle crucial dans la santé humaine, bien que la relation entre les microorganismes et la santé de l'hôte reste encore mal comprise (Tomás-Barberán, Selma, et Espín 2016). Par exemple, les acides gras à chaîne courte qui sont des métabolites bactériens ont un effet positif sur la réparation des cellules épithéliales, la production de mucine et la bonne mise en place des jonctions serrées (Guo, Liu, et Hao 2020). Le développement de la RCH n'est pas lié à une bactérie en particulier, mais l'atteinte de la diversité du microbiote est documentée pour cette pathologie (Ott et al. 2008; Frank et al. 2007). En plus de cette dysbiose bactérienne, une altération de la composition et de la diversification des fungi est également remarquée chez les patients atteints de MICI (Sokol et al. 2017). Dans la RCH, la flore intestinale et son intrication avec les cellules de l'immunité

innée et adaptative joue probablement un rôle fondamental dans la physiopathologie de la RCH (Geremia et al. 2014).

L'étude de cette dysbiose a permis de développer une nouvelle stratégie thérapeutique par transplantation de microbiote fécal. Des études ont montré son efficacité dans des infections aiguës à *Clostridium difficile* mais il semble plus délicat d'étudier ses bénéfices dans le cadre de la RCH qui est une maladie chronique (Fairhurst et Travis 2018). Il semblerait que la transplantation fécale soit efficace dans l'induction de rémission des patients atteints de RCH mais l'entretien de cette efficacité sur le long terme reste encore à être démontrée et de nouvelles études devront confirmer ces résultats (Paramsothy et al. 2017).

III.4. L'axe cerveau-intestin

La modulation psycho-neuro-endocrinienne-immunitaire par l'axe cerveau-intestin a probablement un rôle clé dans la pathogenèse des MICI. L'axe cerveau-intestin implique des interactions entre différents composants : le système nerveux autonome, le système nerveux central, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et le système digestif (Bonaz et Bernstein 2013). Le stress serait impliqué dans l'initiation et la rechute des colites expérimentales dans des modèles murins de colite induite par un agent chimique, le *dinitrobenzenesulfonic acid* (DNBS). Le stress surajouté au DNBS augmente la perméabilité colique et diminue la sécrétion de mucus. Ce modèle intéressant montre que cette prédisposition à la colite accrue par le stress est médiée par les LT CD4+. Les auteurs concluent à un rôle du stress dans la colite expérimentale en facilitant l'entrée des microorganismes intraluminaux dans la muqueuse activant ainsi les cellules LT CD4+ et majorant l'inflammation (Qiu et al. 1999). Nous allons essayer de résumer l'axe cerveau-intestin et son potentiel rôle physiopathologique dans la RCH.

Les catécholamines, des neuromédiateurs du système nerveux sympathique, agissent par l'intermédiaire des récepteurs α - et β -adrénergiques. Ils interviennent en tant que médiateurs du stress induisant l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires via l'activation de la voie de signalisation de NF- κ B (Johnson et al. 2005). Le système parasympathique via le nerf vague semble quant à lui avoir un rôle anti-inflammatoire. En effet, l'acétylcholine libérée à l'extrémité distale efférente du nerf vague, diminue la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α synthétisé par les macrophages via le récepteur nicotinique α 7 de l'acétylcholine (Pavlov et al. 2003). Or le stress diminue l'activité du nerf vague et augmente celui du système sympathique ce qui pourrait avoir un effet pro-inflammatoire au niveau intestinal (R. H. Straub et al. 2006).

L'hypoactivité du complexe préfrontal-amygdalien est fortement influencée par le stress. Le complexe préfrontal-amygdalien régule les cellules immunitaires périphériques via les voies autonomes et neuroendocrines (Tracey 2002). Il contrôle également le tonus parasympathique en diminuant l'influx du nerf vague. Une dérégulation de cet équilibre entre l'amygdale et le complexe préfrontal-amygdalien induirait un déséquilibre entre l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et le système nerveux autonome comme cela peut être observé dans les MICI, et induirait un état pro-inflammatoire (Rainer H. Straub et al. 2002).

La perméabilité intestinale augmentée par le stress a été montrée dans des modèles expérimentaux animaux : cette perméabilité permet aux microorganismes de traverser la barrière intestinale et d'activer la réponse immunitaire au niveau des muqueuses (Kilian et al. 1998) et des organes lymphoïdes secondaires (Bailey, Engler, et Sheridan 2006). Aussi, le système nerveux sympathique (par la libération de catécholamines) stimule la multiplication des bactériennes intestinales. La modification du microbiote intestinal induite par le stress pourrait ainsi modifier l'équilibre immunologique hôte-microbiote et la sensibilité aux infections pouvant jouer un rôle dans la physiopathologie de la RCH (Lyte, Vulchanova, et Brown 2011).

Des épisodes de stress très précoces dans la vie pourraient également influencer la RCH. Des modèles animaux de séparation maternelle montrent l'induction d'un stress dès le début de la vie avec une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Plotsky et al. 2005). Le modèle de séparation maternelle prédispose les rats adultes à une augmentation des bactéries dans la lamina propria, à une altération de la barrière épithéliale du côlon et une modification du système immunitaire muqueux (Barreau et al. 2004). Ce stress néonatal provoque également des altérations importantes du microbiote intestinal (O'Mahony et al. 2011).

Ces différents liens entre le système nerveux et l'appareil digestif pourraient avoir un rôle dans la physiopathologie de la RCH (Figure 20) et pourraient être intéressants pour d'autres types de thérapies. Malheureusement, ces facteurs sont difficiles à étudier et il semble délicat de démêler l'axe cerveau-intestin.

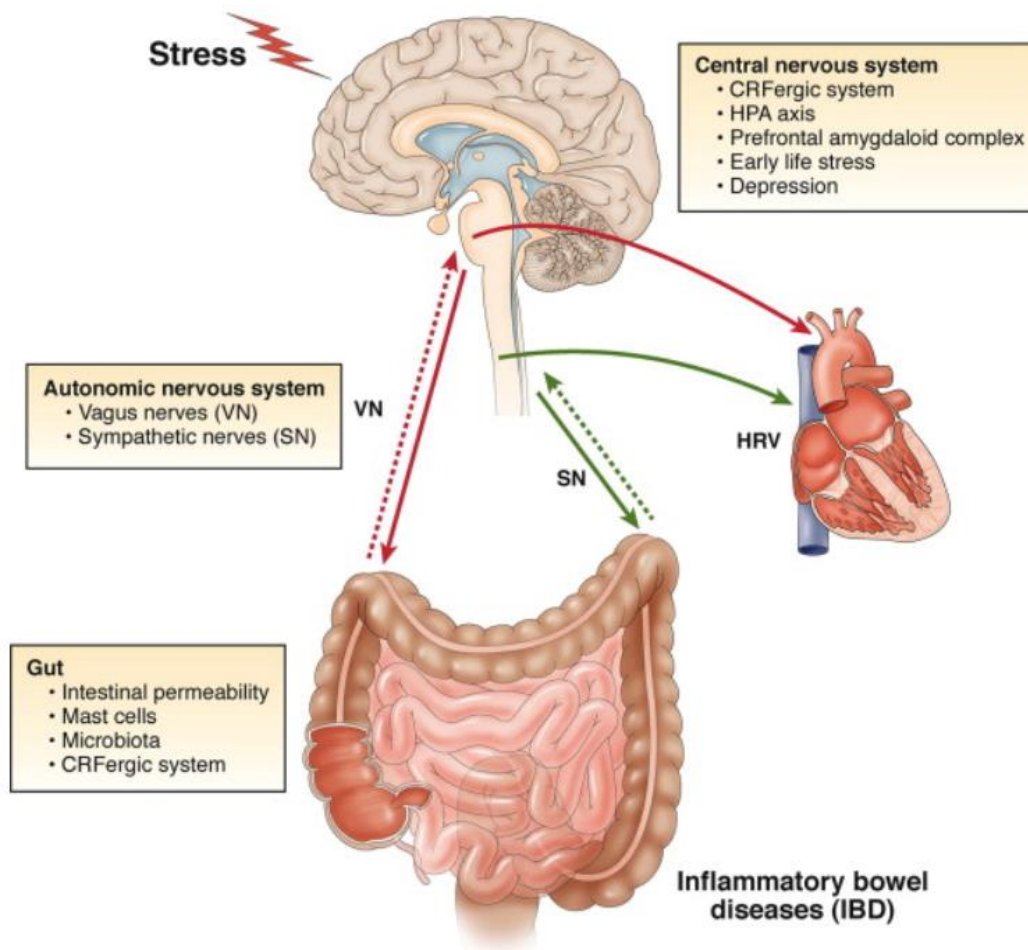


Figure 20 : Importance de l'axe cerveau-intestin dans la physiopathologie de la rectocolite hémorragique

Différents liens unissent l'axe cerveau-intestin : le système nerveux autonome via le système parasympathique (le nerf vague) et le système sympathique, le système nerveux central à travers le stress, la dépression, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
 Issu de (Bonaz et Bernstein 2013)

IV. Facteurs de risque de la RCH

Différents facteurs de risque de RCH ont été étudiés, nous essayerons ici d'en lister quelques-uns.

Le tabac est classiquement un facteur de risque de la maladie de Crohn mais il semblerait qu'il soit protecteur dans la RCH (Mahid et al. 2006). Cependant ce rôle protecteur du tabac dans la RCH reste controversé (Amarapurkar et al. 2018; Peiqi Wang et al. 2018). Dans tous les cas, le tabagisme représente une cause majeure de décès dans le monde et la morbi-mortalité liée au tabagisme supplante nettement tous les avantages possibles du tabac dans la RCH. Une autre addiction fréquente, l'alcoolisme chronique, ne semble pas non plus être un facteur de risque ni un facteur protecteur de la RCH (Amarapurkar et al. 2018).

La RCH étant une pathologie intestinale, le lien entre une malnutrition et le risque de RCH semble intéressant à étudier. Il semblerait que la nourriture industrielle favoriserait l'augmentation des pathologies auto-immunes, et augmenterait la perméabilité intestinale dont on connaît son impact physiopathologique (Lerner et Matthias 2015). Malgré les habitudes alimentaires extrêmement difficiles à étudier, une alimentation végétane semble être un facteur protecteur de la RCH (Amarapurkar et al. 2018). L'étude de facteurs perturbant le microbiote intestinal est également intéressant. Pourtant, une méta-analyse sur la prise d'antibiotiques dans les MICI ne montre pas que les antibiotiques soient un facteur de risque de RCH (Ungaro et al. 2014).

Certaines équipes ont effectué des recherches sur le potentiel rôle protecteur des helminthes chez les patients atteints de MICI. Dans une étude de phase II, l'administration d'œufs de *Trichuris suis*, une helminthe porcine n'étant pas pathogène pour l'homme, semble permettre une amélioration clinique de la maladie par rapport à un groupe placebo (Summers et al. 2005). L'explication serait l'induction par ce traitement de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Elliott et al. 2003).

Concernant les milieux d'habitation, il ne semblerait pas que les milieux urbains ou ruraux aient un impact comme facteur de risque de la RCH (Y.-F. Wang et al. 2013; Amarapurkar et al. 2018).

Le stress pourrait être un facteur de risque dans la RCH et avoir un rôle dans sa physiopathologie. Comme nous l'avons vu précédemment, l'axe cerveau-intestin semble avoir un impact dans l'évolution de cette pathologie (Bonaz et Bernstein 2013). De futures études seront utiles pour mieux définir le rôle du stress dans la RCH, et mieux cibler les facteurs de risque liés au stress dans cette pathologie.

V. Diagnostic de la RCH

Le diagnostic de la RCH doit être le plus précoce possible afin de commencer les traitements rapidement. Les critères diagnostiques de la RCH sont basés sur l'association des symptômes cliniques, de l'aspect endoscopique, de l'analyse histologique et de l'exclusion de diagnostics différentiels (MC, colites infectieuses ou d'origine tumorale) (Lamb et al. 2019; Rubin et al. 2019; Fernando Magro et al. 2017).

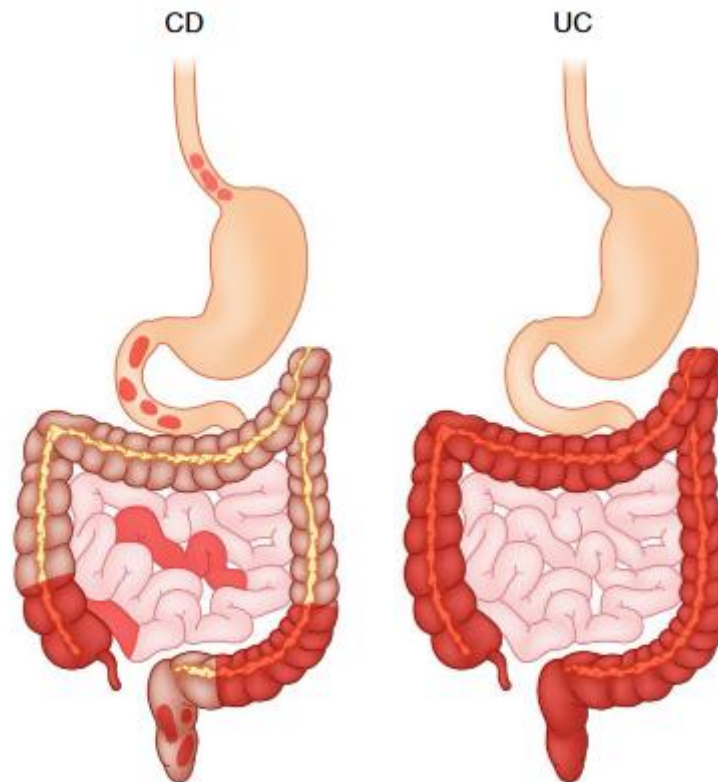


Figure 21 : Schéma de la localisation des atteintes de la MC et de la RCH
 L'inflammation dans la MC (CD pour Crohn disease, à gauche) a un aspect segmenté et affecte fréquemment l'iléon terminal ; en revanche, l'inflammation dans la RCH (UC pour ulcerative colitis, à droite) affecte généralement le rectum et parfois l'ensemble du côlon.
 Issu de (M. F. Neurath 2019)

V.1. La clinique

Plus de 90% des patients atteints de RCH active déclarent avoir des rectorragies. Les symptômes associés reflètent généralement la gravité de l'atteinte des muqueuses. Des selles molles pendant plus de 6 semaines permettent souvent de différencier la RCH d'une colite d'origine infectieuse. Les autres symptômes d'une RCH active sont l'urgence rectale, un ténesme, un exsudat glairo-sanglant, des défécations nocturnes et des crampes abdominales (Fernando Magro et al. 2017). L'apparition de la RCH est généralement insidieuse avec des symptômes présents pendant des semaines voire des mois avant l'avis médical. La présentation d'une poussée sévère inaugurale survient dans environ 15% des cas, avec des symptômes systémiques tels que perte de poids, fièvre, tachycardie, nausées et vomissements (Burisch et al. 2014; Baumgart et Sandborn 2007). D'autres atteintes extra-digestives sont associées à la RCH telles des spondyl-arthropathies axiale ou périphérique, une épisclérite, un érythème noueux dans environ 10 à 20% des cas et peuvent précéder les symptômes intestinaux chez 10% des patients (Harbord et al. 2016).

L'histoire naturelle de la RCH est caractérisée par des épisodes de rechute et des périodes de rémission. Une évolution continue de la maladie peut se produire dans environ 5% des cas, tout comme un seul épisode aigu suivi d'une rémission prolongée (Langholz et al. 1994). Chez 10% des patients, le diagnostic peut évoluer vers la MC ou être réfuté au cours des 5 premières années (Melmed et al. 2007).

V.2. La biologie médicale

Les marqueurs sériques les plus étudiés dans les MICI sont les anticorps anti-cytoplasme des polyinucléaires neutrophiles (ANCA) et les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Habituellement dans la RCH, les pANCA ou les ANCA atypiques sont positifs et les ASCA sont négatifs. Ces marqueurs sont à utiliser avec prudence devant une sensibilité médiocre d'environ 60% (Pang et al. 2020).

La numération formule sanguine peut révéler une thrombocytose secondaire à une inflammation chronique, une anémie secondaire aux rectorragies indiquant une maladie active grave ou chronique, et une leucocytose qui pose la question d'une complication infectieuse.

Les marqueurs biologiques de l'inflammation chronique peuvent être normaux dans la RCH légère ou modérée. La *C Reactive Protein* (CRP) est un biomarqueur précoce de l'inflammation corrélé à la gravité des colites dans la RCH (à l'exception des rectites), et est largement utilisé du fait de sa simplicité de dosage dans le sang périphérique (Vermeire, Van Assche, et Rutgeerts 2005). La calprotectine fécale contenue dans les granulations des neutrophiles reflète l'inflammation colique car elle témoigne du recrutement de ces cellules dans la RCH. Elle en devient un bon biomarqueur de l'activité de la maladie ainsi qu'une aide au diagnostic. Elle n'est cependant pas spécifique de la RCH car elle est aussi augmentée en cas d'une inflammation intestinale d'étiologie différente (Manceau et al. 2017).

V.3. L'endoscopie

L'inflammation commence de manière caractéristique dans le rectum et s'étend de manière proximale de manière continue, confluyente et concentrique pour affecter une étendue variable du côlon ou de toute sa surface muqueuse. Cependant, la représentation endoscopique caractéristique de cette maladie est discutée et la RCH pourrait se présenter par une inflammation colique avec une épargne rectale et une inflammation par plaques péri-appendiculaires (Fefferman et Farrell 2005).

Différents scores endoscopiques existent pour évaluer l'activité de la RCH. Le score de Mayo et l'*Endoscopic Index of Severity* (UCEIS) sont largement utilisés pour évaluer la gravité de la maladie, les réponses aux traitements tant dans la pratique courante que dans les essais cliniques (Figure 22) (Rubin et al. 2019).










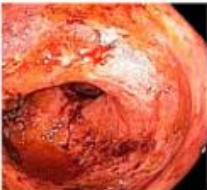


Endoscopic Assessment of Disease Activity			UCEIS Score	Mayo Score	Endoscopic Features
			0	0	Normal
			1-3	1	Erythema, decreased vascular pattern, mild friability
			4-6	2	Marked erythema, absent vascular pattern, friability, erosions
			7-8	3	Spontaneous bleeding, ulceration

Figure 22: Score Mayo et *Endoscopic Index of Severity*
Issu de (Rubin et al. 2019)

Une autre classification qui nous intéressera dans cet exposé est la classification de Montréal qui permet de rendre compte de l'étendue endoscopique de la maladie (Satsangi et al. 2006). Ainsi, le type E1 correspond à la rectite, E2 à une atteinte du colon gauche et E3 à une atteinte totale du colon : la pancolite (Figure 23).

Le suivi endoscopique est également utile afin de diagnostiquer la complication à craindre sur le long terme : le cancer colorectal. Une méta-analyse de 2001 a conclu à un risque de développer un cancer colorectal après la découverte de la RCH de 2% à 10 ans, 8% à 20 ans, et 18% à 30 ans (Eaden, Abrams, et Mayberry 2001). Ces chiffres imposent une surveillance endoscopique et la recherche de cancer chez les patients atteints de RCH, particulièrement en cas de maladie étendue (Beaugerie et al. 2013).

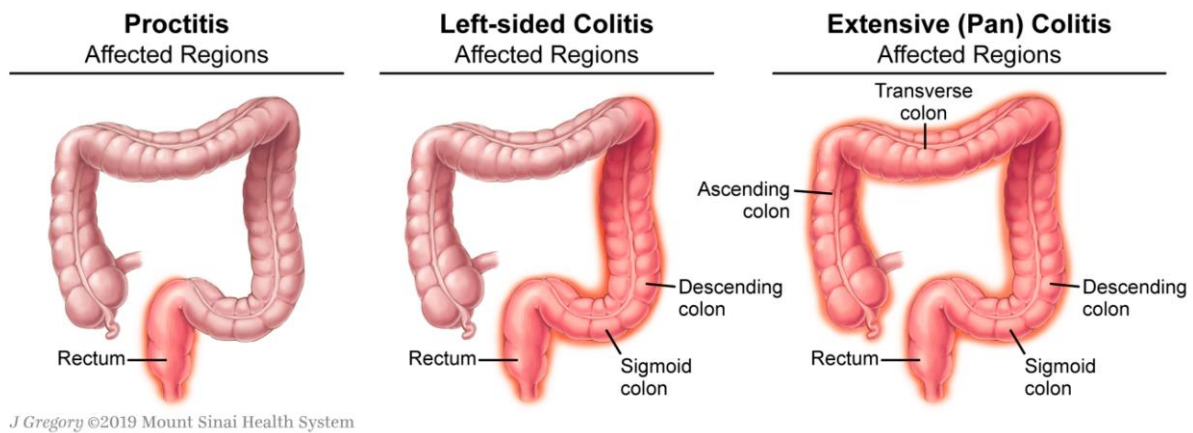


Figure 23 : Classification de Montréal

Le type E1 correspond à la rectite, E2 à une atteinte du colon gauche et E3 à une atteinte totale du colon : la pancolite.

Issu de (Kayal et Shah 2019)

V.4. L'histologie

Au moment du diagnostic, des biopsies systématiques segmentaires du colon sont recommandées. Les caractéristiques histopathologiques de la RCH comprennent des modifications de l'architecture muqueuse (modifications de la morphologie des cryptes et une diminution de leur densité), une infiltration de cellules immunitaires et une altération de l'épithélium (perte de cellules caliciformes ou *goblet cells*) (Tableau 4). L'histopathologie a également un rôle dans l'aide au diagnostic différentiel permettant l'exclusion d'autres étiologies infectieuses, ischémiques ou tumorales ainsi que dans le suivi de l'activité de la maladie (DeRoche, Xiao, et Liu 2014).

Tableau 4 : Caractéristiques histologiques de la RCH et de la MC

	Ulcerative colitis	Crohn's disease
Crypt architectural irregularity	Diffuse (continuous)	Focal (discontinuous)
Chronic inflammation	Diffuse(continuous) Decrease proximally	Focal (discontinuous) Variable
Patchiness	Uncommon	Common
Localization	Superficial Transmucosal Sometimes in submucosa	Transmural
Serositis	Absent except in fulminant colitis	Present
Lymphoid aggregates	Frequent in mucosa, submucosa	Common, transmural
Granulomas	Absent, except with ruptured crypts	Present
Acute inflammation	Diffuse (continuous)	Focal (discontinuous)
Crypt epithelial polymorphs	Diffuse (continuous)	Focal (discontinuous)
Crypt abscesses	Common	Uncommon
Mucin depletion	Present, pronounced	Uncommon, mild
Neuronal hyperplasia	Rare	Common
Muscular hypertrophy	Absent	Present
Paneth cell metaplasia	Present	Uncommon
Pyloric gland metaplasia	Rare	Present

Issu de (F. Magro et al. 2013)

Chez les patients atteints de RCH, la guérison histologique est un objectif thérapeutique majeur. Le score histologique de Nancy est une classification couramment utilisée pour mesurer l'activité histologique de la RCH (Tableau 5) : l'absence de maladie histologique correspond au grade 0, un infiltrat inflammatoire chronique (plasmocytaire) sans infiltrat inflammatoire aigu (absence de neutrophiles) correspond au grade 1, une maladie légèrement active avec quelques neutrophiles correspond au grade 2, une maladie modérément active avec plusieurs neutrophiles correspond au grade 3 et une maladie sévère avec la présence d'ulcération de la muqueuse correspond au grade 4 (Figure24). Les principaux avantages du score de Nancy sont sa fiabilité intra-observateur et inter-observateur, sa simplicité et sa facilité d'utilisation (Marchal-Bressenot et al. 2017).

Tableau 5 : Description des items du score de Nancy

Predicted GVE	Selected items			New score
	Ulceration	Acute inflammatory cells infiltrate	Chronic inflammatory infiltrate	
0	None (0 point)	None (0 point)	None (0 point)	Grade 0
1	None (0 point)	None (0 point)	Mild (1 point)	
2	None (0 point)			Grade 1
3	None (0 point)	None (0 point)	Moderate or marked increase (3 points)	
4	None (0 point)			
5	None (0 point)	Mild (2 points)	Moderate or marked increase (3 points)	Grade 2
6	None (0 point)	Moderate (3 points)	Moderate or marked increase (3 points)	Grade 3
7	None (0 point)	Severe (4 points)	Moderate or marked increase (3 points)	
8	Yes (2 points)	Moderate (3 points)	Moderate or marked increase (3 points)	Grade 4
9	Yes (2 points)	Severe (4 points)	Moderate or marked increase (3 points)	

The predicted GVE is ordinal, containing eight ranks ranging from 0 to 9. The values 2 and 4 are not possible with this system scoring.
GVE, Global Visual Evaluation.

Issu de (Marchal-Bressenot et al. 2017)

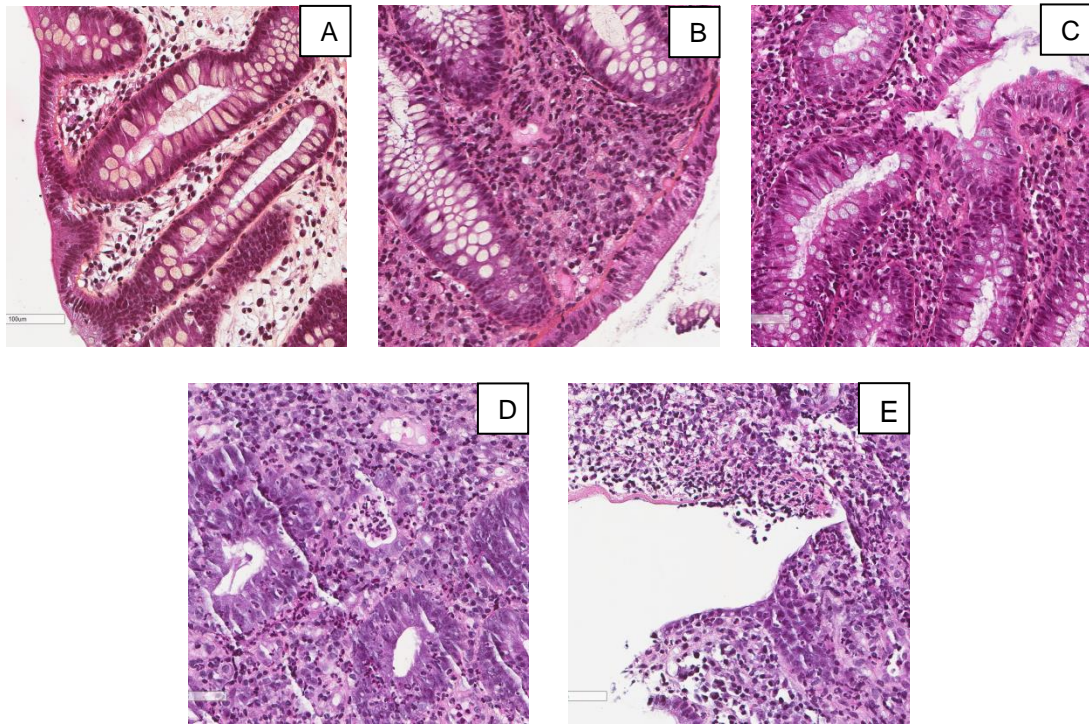


Figure 24 : Représentation des différents grades du score de Nancy

Muqueuse ne présentant pas d'augmentation du nombre de cellules inflammatoires chroniques ; absence d'élément inflammatoire aigu : grade 0 de l'indice de Nancy (HES \times 200). (B) Muqueuse présentant une augmentation modérée à sévère du nombre de cellules inflammatoires chroniques ; absence d'élément inflammatoire aigu : grade 1 de l'indice de Nancy (HES \times 200). (C) Muqueuse présentant de rares polynucléaires neutrophiles dans la lamina propria et/ou dans l'épithélium ; absence d'ulcération : grade 2 de l'indice de Nancy (HES \times 200). (D) Muqueuse présentant une infiltration modérée à sévère par des polynucléaires neutrophiles dans la lamina propria et/ou dans l'épithélium ; absence d'ulcération : grade 3 de l'indice de Nancy. (HES \times 200). (E) Muqueuse présentant une ulcération : grade 4 de l'indice de Nancy (HES \times 200). HES, Hématoxylin-Eosine-Safran.

Images fournies par le Dr Casteillo, Laboratoire d'Anatomopathologie, Saint Etienne, France

V.5. Les facteurs de mauvais pronostics de la RCH

Les facteurs de mauvais pronostic sont également basés sur la clinique, les analyses biologiques et endoscopiques (Tableau 6).

Tableau 6 : Facteur de mauvais pronostic de la RCH

Facteurs de mauvais pronostic de la RCH
Un âge < 40 ans au diagnostic
Une colite étendue
Des scores endoscopiques élevés (Score Mayo endoscopique à 3, UCEIS ≥ 7)
Une hospitalisation pour colite
Une Protéine C réactive élevée
Une albuminémie abaissée

UCEIS: *Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity*
Issu de (Rubin et al. 2019)

VI. Traitements de la RCH

L'approche thérapeutique chez les patients atteints de RCH dépend principalement de la gravité de la maladie, de l'étendue de l'inflammation et de sa rapidité d'évolution dans le temps. L'objectif thérapeutique est la résolution des symptômes cliniques avec la limitation de la diarrhée et des rectorragies, ainsi que la diminution de l'inflammation de la muqueuse dans un délai de 3 mois après la mise en place des traitements (Peyrin-Biroulet et al. 2015).

Plusieurs thérapeutiques existent pour permettre la résolution des poussées. Nous allons brièvement citer les principales molécules ayant l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France dans ce chapitre.

VI.1. Les thérapeutiques classiques

La plupart des patients atteints de RCH bénéficient de thérapeutiques chimiques classiques comme le 5-ASA, les corticostéroïdes et les thiopurines (azathioprine ou 6-mercaptopurine) (Harbord et al. 2017).

Le mécanisme d'action du 5-ASA dans la RCH est mal connu. Le 5-ASA diminue l'inflammation intestinale en bloquant la cyclooxygénase et en inhibant la production de prostaglandines. Il permet aussi une inhibition de la voie NFκB ce qui induit une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Il réduirait le chimiotactisme et la phagocytose et inhiberait l'activation des LT (Hauso, Martinsen, et Waldum 2015).

Les corticostéroïdes sont lipophiles et traversent passivement la membrane plasmique et nucléaire pour aller activer les récepteurs aux glucocorticoïdes. Leur activation permet la diminution du chimiotactisme des cellules du système immunitaire vers les sites inflammatoires ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires. Les corticostéroïdes inhibent également les fonctions des LT, la phagocytose, et augmentent la synthèse de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Dubois-Camacho et al. 2017).

L'azathioprine a aussi un mécanisme d'action mal compris dans la RCH. Il s'agit d'un pro-médicament métabolisé en un analogues des bases puriques comme la 6-thioguaninenucleotides (6-TGN) et le 6-thioguanine triphosphate (6-TGTP). Lors de la division cellulaire, une petite proportion de 6-TGN est incorporée dans l'ADN au lieu de la guanine conduisant à la mort cellulaire. Le rôle anti-inflammatoire de l'azathioprine dans la RCH vient du 6-TGTP qui bloque Rac1 (une GTPase) supprimant les réponses pro-inflammatoires des LT par l'induction de l'apoptose et par l'altération de la synapse immunologique LT / CPA (de Boer et al. 2018).

En général, les patients avec une colite légère à modérée bénéficient d'une thérapie par 5-ASA en première intention. Les corticostéroïdes oraux sont recommandés sur des périodes courtes et doivent être réduits progressivement après avoir obtenu une rémission clinique pour éviter leurs effets indésirables, tandis que le traitement de fond par 5-ASA est poursuivi pour le maintien de la rémission. Les thiopurines sont également efficaces pour maintenir la rémission dans la RCH mais il faut être vigilant quant à leurs effets indésirables (myélotoxicité, toxicités hépatique et pancréatique) (Harbord et al. 2017).

VI.2. Les anticorps monoclonaux

Les premiers anticorps monoclonaux ayant fait la preuve de leur efficacité dans la RCH sont les anti-TNF α comme l'infliximab, l'adalimumab et le golimumab. Ils ont révolutionné la prise en charge des patients RCH, et particulièrement dans les RCH sévères ou résistantes aux thérapeutiques classiques (Harbord et al. 2017). Comme nous l'avons vu, le TNF α a un rôle majeur dans la physiopathologie de la RCH et les biothérapies anti-TNF α permettent d'atteindre la rémission clinique et d'éviter les poussées de colite. Les anti-TNF α réduisent l'activation de la voie NF κ B, inhibant l'activation des lymphocytes T et des macrophages. On observe également une réparation épithélio-muqueuse (Levin, Wildenberg, et van den Brink 2016). Afin d'optimiser les doses thérapeutiques, il est maintenant de pratique courante de monitorer ces biothérapies. Cela est d'autant plus intéressant que les anti-TNF α sont

fortement immunogènes et des anticorps anti-médicaments peuvent être synthétisés rendant ces traitements inefficaces (Yanai et al. 2015).

Le védolizumab est une anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$ qui inhibe l'adhésion des lymphocytes T à la molécule MAdCAM-1 principalement exprimée sur les cellules endothéliales intestinales, diminuant ainsi le recrutement intestinal des lymphocytes T (Wyant, Fedyk, et Abhyankar 2016). Le védolizumab permet d'induire et de maintenir une rémission clinique et une cicatrisation muqueuse chez les patients atteints de RCH modérée à sévère (Harbord et al. 2017).

Un autre anticorps monoclonal, l'ustekinumab qui a eu l'AMM en France en 2020, permet l'induction et le maintien de la rémission chez les patients atteints RCH (Sands et al. 2019). L'ustekinumab est un anti-p40 (sous unité commune de l'Il-12 et de l'Il-23) qui agit en tant qu'inhibiteur de la voie Th17, largement impliquée dans la physiopathologie de la RCH.

VI.3. Les inhibiteurs de JAK

Le tofacitinib, une molécule administrée par voie orale ciblant préférentiellement JAK1 et JAK3, diminue les réponses immunitaires et inflammatoires de la voie JAK/STAT et a montré une efficacité chez les patients atteints de RCH modérée à sévère (Harbord et al. 2017). Ce traitement récent semble être très efficace avec peu d'effets secondaires répertoriés mais la littérature reste prudente concernant la potentielle toxicité en ce qui concerne les réactivations virales (D'Amico et al. 2019).

Finalement, les traitements médicaux utilisés et ceux en cours d'étude dans la RCH sont résumés dans le Tableau 7 (Taku Kobayashi et al. 2020). Du fait de la meilleure connaissance de la physiopathologie, la diversification de l'arsenal thérapeutique offre de plus en plus de choix aux médecins avant d'envisager les solutions chirurgicales.

Tableau 7 : Traitements actuels et en cours de développement de la RCH

	Anti-TNF	Anti-adhesion molecules	JAK inhibitors	Anti-IL-12 and/or anti-IL-23	Immunosuppressants	S1P receptor modulators	Anti-cytokines (others)
Phase I and/or II		• AJM347	• Peficitinib • TD-1473 • Deucravacitinib		• Apremilast • GSK2831781 • Ravagalimab	• Amiselimod	• Spesolimab • PF-06480605
Phase III		• AJM300 • Ontalizumab • Etrolizumab	• Filgotinib • Upadacitinib	• Brazikumab • Risankizumab • Guselkumab • Mirikizumab		• Etrasimod • Ozanimod	• Spesolimab
Launched	• Adalimumab • Golimumab • Infliximab	• Vedolizumab	• Tofacitinib	• Ustekinumab	• Tacrolimus • Cyclosporine		

• Oral administration • Intravenous or subcutaneous

Les anti-TNF α : infliximab, adalimumab, golimumab.

Les anti-molécules d'adhésion : AJM347 (inhibiteur de l' α 4 β 7-intégrine), étrolizumab (anticorps anti- β 7-intégrine), AJM300 (anticorps anti- α 4-intégrine), ontalizumab (anticorps anti-MadCAM1), vedolizumab (anti- α 4 β 7-intégrine anticorps).

Les inhibiteurs de JAK : peficitinib, deucravacitinib, TD-1473, filgotinib, upadacitinib, tofacitinib.

Les anticorps anti-IL23 : ustékinumab, brazikumab, risankizumab, guselkumab, mirikizumab.

D'autres immunosuppresseurs : aprémilast (inhibiteur de la phosphodiesterase 4), GSK2831781 (anticorps anti-LAG3), ravagalimab (anticorps anti-CD40), tacrolimus, cyclosporine.

Des immunomodulateurs des récepteurs de la sphingosine 1 phosphate (S1P) : amisélimod, étrasimod, ozanimod.

Les molécules ciblant les cytokines : spesolimab (anticorps anti-IL36R), PF-06480605 (anticorps anti-TNFSF15).

Issu de (Taku Kobayashi et al. 2020)

VI.4. La chirurgie

Les principales indications de la colectomie dans la RCH sont les formes réfractaires aux différentes lignes thérapeutiques, une mauvaise tolérance aux médicaments impliquant l'impossibilité d'une prise en charge médicamenteuse et un cancer colorectal (Harbord et al. 2017).

Le mégacôlon toxique défini comme une dilatation non obstructive totale ou segmentaire du côlon associé à une toxicité systémique est une complication grave de la RCH mettant en jeu le pronostic vital du patient. Une prise en charge médicale urgente intensive est nécessaire et souvent associée à une intervention chirurgicale précoce afin de réduire la mortalité (Gan et Beck 2003).

Relation entre HCMV et RCH

I. La réactivation de HCMV dans un environnement inflammatoire

De nombreuses conditions inflammatoires sont associées à une réactivation de HCMV.

Le sepsis, défini par une réaction inflammatoire systémique associée à une infection sévère, est un bon exemple de facteur déclenchant de réactivation virale (Walton et al. 2014). La septicémie altère l'immunité innée et adaptative par de multiples mécanismes, notamment par l'épuisement du système immunitaire, et induit, par l'apoptose des cellules immunitaires, la réactivation et la dissémination de virus latents (Hotchkiss et al. 2001). Ainsi, environ 25% des patients séropositifs présentant une septicémie avaient une virémie positive avec une charge virale moyenne de 6409 copies/ml signant une réactivation systémique de HCMV (Walton et al. 2014). Le lipopolysaccharide (LPS), un composant de la paroi cellulaire bactérienne, est un PAMP qui se lie au récepteur TLR4 de reconnaissance d'agents pathogènes, active les voies NF- κ B et AP-1 et induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL6, TNF α et IL1 β (Ishii et al. 2008). Il a été récemment montré que le LPS permet la réactivation de HCMV dans les cellules dendritiques dérivées des monocytes via l'action de l'IL6, qui reprogramme la méthylation des histones de MIEP via la voie ERK (Dupont et al. 2019). Ainsi une septicémie bactérienne joue un rôle direct sur la réactivation virale de HCMV. De manière intéressante, les patients, sans notion d'immunosuppression préalable mais hospitalisés en soins intensifs, ont également un risque plus important de réactivation virale (OR : 4,3 [1.6–11.9], $p=0.005$) dont les causes sont multifactorielles (porte d'entrée infectieuse, traitement immunosuppresseur, défaillance d'organe, dénutrition, etc) (Limaye et al. 2008).

Quand on s'intéresse à la transplantation rénale, les greffons issus de donneurs séropositifs HCMV (D+) sont considérés comme des réservoirs viraux et sont le terrain d'une réactivation HCMV chez des receveurs séronégatifs (R-), avec une augmentation de l'expression des gènes IE dans les jours suivant la transplantation (Hummel et al. 2001). Cette augmentation d'expression des gènes précoces de HCMV est corrélée à l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL1 et l'IFN γ et est corrélée à l'activation du facteur de transcription viral MIEP via les voies NF- κ B et AP-1 (Hummel et al. 2001). Ainsi, l'état inflammatoire chronique des patients en attente de greffe rénale s'ajoute à l'immunosuppression induite par les traitements anti-rejets pour constituer un terrain privilégié de réactivation virale et de développement de co-morbidités importantes (Hantz, Moret, et Alain 2019).

Dans le cadre de la réactivation de HCMV lors de la greffe de CSH, le risque maximal de réactivation pour les patients est observé pour les greffes D- / R+. La réactivation est due à une absence de mémoire immunitaire anti-HCMV du greffon médullaire immunocompétent mais naïf pour le HCMV (D-), et la persistance de réservoirs viraux chez le patient (R+), en état d'immunodépression induit pour permettre la prise de greffe mais favorisant la réactivation virale par suppression de ses lymphocytes mémoires spécifiques (Stern et al. 2019). De plus, le conditionnement pré-greffe induit un état pro-inflammatoire avec la synthèse de cytokines telles que l'IFN γ , le TNF α et l'IL6 qui sont impliquées dans la réactivation virale dans les cellules myéloïdes via le promoteur MIEP, ce qui favorise la réactivation de HCMV dans les cellules myéloïdes (Stern et al. 2019).

Le TNF α est une cytokine qui induit la réactivation de HCMV, notamment dans les cellules myéloïdes dans lesquelles HCMV est en phase de latence, en induisant l'expression des gènes IE1/2. La liaison du TNF α à son récepteur TNFR1 active une cascade de signalisation intra-cellulaire et conduit à l'activation de MIEP représentant la première étape de réactivation virale (Forte et al. 2020; 2018).

Finalement, comme nous l'avons vu dans la partie «la latence de HCMV », MIEP joue un rôle majeur dans la réactivation de HCMV (Forte et al. 2020) avec des sites de liaison pour des facteurs de transcription comme Elk1, NF- κ B et AP-1. La réactivation virale est ainsi permise par des stimuli qui augmentent notamment les concentrations de TNF α lors d'infection, d'inflammation aiguë ou chronique, ou d'altération du système immunitaire.

Dans cette thèse, nous nous intéressons tout particulièrement à la réactivation de HCMV chez les patients atteints de RCH. La physiopathologie précédemment résumée met en avant l'atteinte inflammatoire de cette pathologie avec une atteinte de la barrière intestinale, la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 et le TNF α , une rupture de tolérance impliquant une difficulté de retour à un état d'équilibre immunitaire. Ce contexte pro-inflammatoire constitue un terrain privilégié pour la réactivation de HCMV même si les connaissances concernant la physiopathologie de la réactivation restent encore limitées. Une hypothèse de réactivation virale préférentielle dans la RCH plutôt que dans la MC est formulée dans notre revue publiée dans *Microorganisms* en 2020 (Jentzer et al. 2020).

Lors de la réactivation de HCMV, une boucle amplificatrice inflammatoire est entretenue car HCMV induit la production de TNF α . En effet, la stimulation des TLR par HCMV permet la transduction de signaux pro-inflammatoires et notamment la production de TNF α par les monocytes et les macrophages particulièrement via les TLR3 et TLR9 impliqués dans la

détection de l'ADN de HCMV (K.-H. Yew, Carsten, et Harrison 2010). De plus, le TLR2 reconnaît la gB et la gH de HCMV et entraîne l'activation de la voie NF- κ B puis la production de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-8, l'IL -12 et IFN- β (Boehme, Guerrero, et Compton 2006; Compton et al. 2003). Ainsi, cet environnement pro-inflammatoire induit par la réactivation de HCMV permet d'entretenir et d'amplifier l'inflammation locale chez les patients atteints de RCH en poussée (Goodman et al. 2015; Nakase et al. 2014).

II. Rationnel et travaux du laboratoire

L'équipe du GIMAP (Groupe sur l'Immunité des Muqueuses et des Agents Pathogènes) est forte d'une expérience importante dans l'étude de l'infection par HCMV dans le cadre de la RCH, notamment du fait de la collaboration entre la Virologie, l'Immunologie et la Gastro-entérologie. La thématique RCH / HCMV a conduit à plusieurs publications de membres du GIMAP dont les apports scientifiques sont résumés ci-après et rendent compte du rôle péjoratif de HCMV dans la RCH.

HCMV est un virus largement répandu dans la population générale et la RCH fait partie des maladies inflammatoires fréquentes. HCMV infecte de nombreuses cellules de l'organisme : les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses constituant un véritable réservoir viral (Christian Sinzger et al., s. d.; You et Johnson 2012) susceptible de se réactiver. Cette réactivation de HCMV sous forme de colite à CMV est plus fréquente dans la RCH que dans la maladie de Crohn (Roblin et al. 2012; Römkens et al. 2016).

L'hypothèse physiopathologique de cette réactivation préférentielle pourrait être expliquée par des différences dysimmunitaires entre ces 2 pathologies. En effet, la RCH est orientée Th2, Th9, Th17 et la MC est orientée Th1, Th17 impliquant une surveillance immunitaire antivirale moins forte pour la RCH que pour la MC (Jentzer et al. 2020).

Afin de diagnostiquer une colite à HCMV dans la RCH, HCMV doit être recherché dans le tissu colique inflammatoire, soit par immunohistochimie (IHC) soit par PCR en temps réel (Zidar et al. 2015; Rahier et al. 2014; Pillet 2016; Pillet et al. 2012). Lors d'une rechute de la RCH, une colite à CMV est associée à un surrisque de complications comme le mégacôlon toxique (Criscuoli et al. 2015) ou la nécessité d'une prise en charge par colectomie (Schenk et al. 2019). Ainsi une colite à CMV est un indicateur de mauvais pronostic chez les patients présentant des poussées de RCH et une stratégie efficace de prise en charge de la colite à CMV est nécessaire (Oh et al. 2019; Zhang et al. 2016). De plus une méta-analyse a évalué

un risque 2,34 fois plus élevé de rechute cortico-résistante chez les patients séropositifs par rapport aux patients séronégatifs rendant compte du rôle péjoratif de HCMV dans la prise en charge de la RCH (Liu et al. 2018). La charge virale HCMV mesurée par PCR quantitative (qPCR) dans au moins 2 biopsies du tissu inflammatoire muqueux permet de prédire la résistance aux corticoïdes et aux autres lignes d'immunosuppresseurs (Roblin et al. 2011; Pillet et al. 2016). Un traitement par ganciclovir permet de réduire la charge virale tissulaire et de restaurer la sensibilité aux immunosuppresseurs (Pillet 2016; Roblin et al. 2011) et l'administration d'anticorps monoclonaux anti-TNF α ne majore pas le risque de réactivation virale ni la charge virale CMV tissulaire (Pillet et al. 2015).

Le choix d'une publication d'une revue se concentrant sur le lien HCMV et RCH s'inscrit dans la continuité de cette thématique. Cette revue a permis de mettre en lumière les hypothèses physiopathologiques de réactivation virale, les différents moyens diagnostiques de colite à HCMV, le rôle péjoratif de HCMV dans la RCH, l'utilisation d'antiviraux et d'autres thérapeutiques approuvées au moment de la publication.

III. Rédaction d'une revue publiée dans *Microorganisms* en 2020

« Cytomegalovirus and Inflammatory Bowel Diseases (IBD) with a Special Focus on the Link with Ulcerative Colitis (UC) »

Le cytomégalovirus (CMV) infecte environ 40% des adultes en France et persiste tout au long de la vie en tant que microorganisme latent dans différents organes, dont l'intestin. Une relation étroite est observée entre l'inflammation qui favorise l'expression virale et la réplication virale et l'exacerbation l'inflammation. Dans ce contexte, la colite à CMV peut avoir un impact sur le pronostic des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), et notamment de ceux atteints d'une rectocolite hémorragique (RCH). Dans la RCH, l'inflammation de la muqueuse et les cytokines Th2, associées aux médicaments immunomodulateurs utilisés pour contrôler les poussées, favorisent la réactivation virale dans l'intestin, ce qui à son tour augmente l'inflammation muqueuse, diminue l'efficacité des corticoïdes et des immunosuppresseurs (la probabilité de résistance aux stéroïdes est multipliée par 20 en cas de colite à CMV), et augmente le risque de colectomie. Cette revue met l'accent sur les outils virologiques recommandés pour explorer la colite à CMV au cours d'une MICI et souligne l'intérêt d'utiliser le ganciclovir pour traiter les poussées associées à la colite à CMV chez les patients atteints de RCH.

Cytomegalovirus and inflammatory bowel diseases (IBD) with a special focus on the link with ulcerative colitis (UC)

Alexandre Jentzer^{1,2,3}, Pauline Veyrard^{1,4}, Xavier Roblin^{1,4}, Pierre Saint-Sardos⁵, Nicolas Rochereau¹, Stéphane Paul^{1,3}, Thomas Bourlet^{1,2}, Bruno Pozzetto^{1,2}, Sylvie Pillet^{1,2,*}

¹GIMAP EA 3064, Medicine Faculty of Saint-Etienne, University of Lyon, France;

²Laboratory of infectious agents and hygiene, University Hospital Saint-Etienne, France;

³Laboratory of Immunology, University Hospital Saint-Etienne, France;

⁴Department of Gastroenterology, University Hospital Saint-Etienne, France;

⁵Laboratory of Bacteriology, University Hospital of Clermont-Ferrand, France.

*Corresponding author: sylvie.pillet@univ-st-etienne.fr

DOI : 10.3390/microorganisms8071078

Abstract

Cytomegalovirus (CMV) infects approximately 40% of adults in France and persists lifelong as a latent agent in different organs, including gut. A close relationship is observed between inflammation that favors viral expression and viral replication that exacerbates inflammation. In this context, CMV colitis may impact the prognosis of patients suffering from inflammatory bowel diseases (IBD), and notably those with ulcerative colitis (UC). In UC, the mucosal inflammation and Th2 cytokines, together with immunomodulatory drugs used for controlling flare-ups, favors viral reactivation within the gut, which in turn increases mucosal inflammation, impairs corticoid and immunosuppressor efficacy (the probability of steroid resistance is multiplied by more than 20 in case of CMV colitis), and enhances the risk for colectomy. This review emphasizes the virological tools that are recommended for exploring CMV colitis during IBD and underlines the interest of using ganciclovir for treating flare-ups associated to CMV colitis in UC patients.

Keywords

Ulcerative colitis; CMV-associated colitis; Th2 cytokines; inflammation; Tumor Necrosis Factor α ; ganciclovir

Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBDs) primarily involve two main entities: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). IBDs affect mainly young and active subjects with a diagnosis generally made between 20 and 30 years old. Their annual incidence is increasing overall, with a relative stabilisation in western countries [1], but an accelerating incidence in newly industrialised countries, where the way of life is becoming “westernised” [2]. The incidence is also increasing in adolescents as reported by a recent French study [3]. These chronic diseases are incurable and disabling with a major impact on the socio-professional life of patients. Their pathophysiology is complex and dominated by chronic inflammation of the digestive tract, and involves genetic factors affecting innate and adaptive immune responses of the digestive mucosa together with environmental factors (Figure 1) [4–6]. IBDs are clinically characterized by the alternation of acute inflammatory flares and asymptomatic phases during remission [4,7]. The administration of anti-inflammatory or immunosuppressive drugs (steroids, azathioprine, cyclosporine, monoclonal antibodies especially directed against Tumor Necrosis Factor α [TNF- α] or $\alpha 4\beta 7$ integrin in the case of UC most often allows controlling the acute phase and lengthening the periods of remission. Several lines of treatment are sometimes necessary to achieve intestinal mucosa healing [8,9]. Despite these different therapeutic options, inflammation can lead to tissue necrosis requiring a partial or total colectomy.

Human cytomegalovirus (CMV), also termed human betaherpesvirus 5, is an opportunistic pathogen involved in many inflammatory processes [10]. The diagnosis of CMV colitis in IBD patients is difficult due to the absence of clinical or endoscopic symptoms that differentiate CMV colitis from colitis associated with the inflammatory disease itself; it is based exclusively on the detection of histological or viral markers in the intestinal mucosa [11,12]. The aim of this review is to highlight the place of colonic CMV infection during IBD by emphasizing the relationships between CMV infection of the colonic mucosa and inflammatory flare-up of UC, the virus and the inflammation interacting each other, which results in perpetuating and worsening colonic lesions. We will also show how, in UC, immunosuppressive and antiviral treatments can help controlling the colonic inflammation.

Brief recalls on the pathophysiology of CMV infection

Beyond these reminders limited to the objectives of this review, the reader interested in more information is invited referring to recent general reviews on the subject [13,14].

Cell tropism and transmission of CMV

CMV belongs to the *beta-Herpesvirinae* subfamily within the *Herpesviridae* family. Ubiquitous around the world, it infects exclusively humans. The viral genome is a double-stranded DNA molecule protected by a capsid of icosahedral symmetry, a tegument, and an envelope. Fragile in the outside environment, CMV is transmitted through close contacts with secretions (saliva, milk, genital secretion, and semen) and biological fluids (urine) from an infected individual. At time of primary infection, a viremia allows the virus to spread to all the organs; blood and organs are potential sources of iatrogenic transmission. During pregnancy, it can be transmitted from mother to foetus, CMV being the most common source of viral congenital infections (0.5-2%) of all live births and the main non-genetic cause of congenital sensorineural hearing loss and neurological damage [15]. CMV replicates in many cell types, including endothelial cells, epithelial cells, fibroblasts, and monocytes/macrophages.

Lytic replication cycle

In vitro, the viral cycle has mainly been studied in fibroblast cells. The attachment of a viral glycoprotein complex to cellular receptors (glycosaminoglycans like heparan sulfate, integrins or even many growth factor receptors) allows the nucleocapsid to enter the cytosol and then into the cell nucleus. Viral genes expression progresses in 3 phases: the immediate early (IE) genes encode transcription factors that induce the expression of early (E) genes; these genes code for proteins involved notably in the replication of the viral genome, including viral DNA polymerase (pUL54) and thymidine kinase (pUL97). After replication of the viral DNA and expression of the structural or late (L) genes (capsid, envelope glycoproteins and the tegument proteins), the viral genome is encapsidated. The nucleocapsid is matured during a complex pathway through cellular membranes to release new

virions by budding. Transmission to a new cell takes place either through free virus particles or through intercellular contact.

Latency and reactivation

Both innate and adaptive immunity are mobilised to control rapidly CMV replication [13,16], with a crucial role for Innate-Lymphoid Cells (ILCs) and Natural Killer (NK) cells, production of neutralizing antibodies and expansion of cytotoxic T lymphocytes. CMV then enters the latency phase, stopping the production of infectious particles and reducing viral expression to the proteins that maintains the latency program. This program is established for life in the body although the molecular and viral processes are still relatively unknown. Latent CMV infection is mainly observed in circulating hematopoietic CD34+ progenitors and monocytes, but other cells (notably endothelial cells), disseminated in the tissues, are probably susceptible to contain the latent genome *in vivo* [17]. During latency, viral DNA persists as an episome in the nucleus without integration into the cellular genome; viral expression is limited to specific proteins whose main role is to inhibit the presentation of viral epitopes to immune cells. Latent infection should be differentiated from persistence with low production of infectious particles, below the detection limit of standard techniques.

CMV can reactivate with the production of new infectious viral particles. The factors implicated are still poorly identified; stimulation of the immune system by infection, significant stress, inflammation, allogenic stimulations (pregnancy, transfusion, organ or hematopoietic stem cell transplant), or immunodepression (administration of immunosuppressive treatments and chemotherapy, HIV infection) can induce CMV reactivation. Reinfections with different strains are also possible.

Infection vs disease

In most cases, CMV infection is restricted by the immune system. However, CMV can affect the function of organs (brain, lung, digestive tract, ...) leading to end-organ disease: in these cases, the term of CMV disease is to be used and an antiviral therapy should be administrated to hamper life-threatening disease [18]. CMV disease mainly occurs in immunosuppressed patients but cases are reported even in immunocompetent patients, especially after primary infection. In case of CMV disease, CMV replication markers are detected in the infected organ; viremia can be absent, especially when the reactivation occurs primarily in the organ before disseminating to the peripheral blood. CMV colitis in UC patients should be considered as a CMV disease.

CMV and inflammation

The interactions between CMV and the immune system are complex, both the actors of innate immunity and those of the adaptive response [10,16,19,20]. CMV is often considered as an "immunopathogenic" virus [10]. Activation of the immune system begins very early activated after infection, upon recognition of viral proteins by Toll Like Receptors (TLR) or activation of type I interferons (IFNs) [20]. CMV infection increases the secretion of numerous cytokines including TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-6, PDGF, RANTES, MCP-1, MIP-1 α and MIP-1 β [20,21]. Recognition of infected cells by cytotoxic cells also induces the production of pro-inflammatory cytokines [20]. A population of unconventional T lymphocytes, T $\gamma\delta$ lymphocytes plays a preponderant role during CMV infection and is notably present in the intestinal tissue. In case of CMV infection, they are able to induce an early synthesis of pro-inflammatory cytokines and to develop their cytotoxic activity [22]. A major evasion mechanism is the inhibition of human leucocyte antigen (HLA) class I-restricted antigen presentation [16]. The processing and the presentation of CMV antigenic peptides via the HLA class I pathway was blocked to prevent specific lymphotoxicity. Several viral proteins block HLA class I-peptide complexes trafficking and induce a rapid downregulation in HLA class I expression. Antigen presentation through the MHC class II pathway is also hindered by CMV. This downregulation of HLA molecules exposes to NK-mediated lysis; in counterpart, CMV developed various tactics to impede NK cell recognition. CMV also encodes a variety of other cytokines homologues (IL-10) with distinct subversive functions and that mimic the behaviour of host proteins to divert the immune response [16]. The virus also activates the expression of inflammatory cytokines through the stimulation of the transcription factor NF κ B, cyclooxygenase-2 and

5-lipoxygenase [23]. All these pro-inflammatory mediators participate in the activation of viral replication. The development of a vicious circle between CMV infection and inflammation has been reported [10,21,24]. Because of the close interactions between CMV and the immune system, host genetics are probably implicated in the virus pathogenesis [25], although no routine test is currently available for predicting the risk of severe or recurrent infection.

Antiviral drugs against CMV

The main antiviral molecule used in prophylactic or curative treatment, especially in immunocompromised patients, is ganciclovir (GCV) and its orally administered prodrug, valganciclovir. This analogue of guanosine is an inhibitor of the viral polymerase (pUL54), acting as a chain terminator [26]. In case of resistance to GCV, two others inhibitors of pUL54 can be used, although more toxic for kidney functions: foscarnet, a structural analogue of the pyrophosphate anion that selectively inhibits the pyrophosphate binding site on viral DNA polymerase, or cidofovir that competes with viral polymerase as an analogue of cytidine. Letermovir, a new antiviral drug that inhibits pUL56 subunit during CMV particles maturation [27], is now used as preventive therapy in HSC receivers [28]. Other molecules (cidofovir esters, maribavir, artesunate, etc.) are arriving on the market; however, their indications remain presently extremely limited. There is currently no CMV vaccine although many teams are working either to prevent primary infection, or to limit the consequences of the infection, particularly in immunocompromised patients [29].

CMV infection of the digestive tract in immunocompromised and immunocompetent patients

CMV seroprevalence is estimated to be around 66 % of the adult population in western countries; a higher seroprevalence is observed in low economic countries [30]. CMV seropositive people harbor latent CMV genome in many tissues, including the entire digestive tract; the colon is considered a major site for latency and viral reactivation. Viral inclusions are often found in endothelial cells but also in macrophages, in epithelial cells, in fibroblasts and in smooth muscle cells [31,32]. The mechanism of the pathogenesis of CMV colitis remains poorly understood; replication of the virus in endothelial cells could generate vasculitis associated with microvessel thrombosis and local ulceration, which would induce ischemic colitis [33,34]. The recruitment to the mucosa of CMV-infected monocytes promotes the dissemination of inflammatory macrophages in the inflamed tissue [35,36]. CMV also disrupts epithelial tight junctions, enhancing bacterial translocation as well as inflammation of the gut [37].

In immunocompetent patients, several cases of digestive damages have been reported in primary infection, ranging from esophagitis to proctitis (excluding IBD) [32,38]. The diagnosis is often evocated late, after performing an endoscopy with detection of viral markers in the biopsy, leading to delay the antiviral treatment, which may engage vital prognosis [39]. In addition, digestive damages are observed in newborns with congenital CMV infection and can be complicated by necrotizing enterocolitis [40].

In immunocompromised patients, the digestive tropism of CMV is expressed by the frequency of digestive infections, particularly in recipients of stem cells or organ transplant and in HIV-infected patients infected at AIDS stage [16,19,24,32,41,42]. In addition, CMV infection is a major cause of graft rejection after intestinal transplantation [10].

Controversial role of CMV infection in IBD inflammatory flares - analysis of confounding factors

In the absence of a specific study of CMV seroprevalence in IBD patients, it can be reasonably considered to be at least equivalent to that of the general population. In moderate to severe UC adult patients, CMV colitis is observed in 25-30% [43–45], especially those exhibiting steroid refractory disease [46]. The detection of CMV in colonic mucosa is less frequent in IBD children than in adults [47], probably because of lower seroprevalence of CMV infection in the pediatric population [48] and lower risk of viral reactivation; however, the consequences of CMV colitis on IBD evolution is similar to that observed in adults [49,50]. CMV colitis can reveal the inflammatory disease which was not diagnosed until the viral episode [14]. In contrast, CMV infection is not considered to be an etiology of

the inflammatory disease (**Figure 1**). Reactivated by damage to the intestinal mucosa and local inflammation, it can promote flare-ups, exacerbate mucosal damages, and shorten the periods of remission.

During the last 10 years, the role of CMV in IBD flare-ups has been highly debated, some authors favoring an active role of the virus in inflammatory flares whereas others promoted the concept of the innocent bystander in which CMV infection plays no role in the progression of the disease [46,52]. A meta-analysis published in 2006 showed a prevalence of CMV infection in IBD patients ranging from 0.5 to 100% [53]. Two studies on UC patients published ten years ago illustrate this controversy: the first reported an identical colectomy rate between CMV positive and CMV negative patients, and spontaneous disappearance of markers of infection in CMV positive patients [54], while the second showed an association between CMV infection and steroid resistance [55]. These discrepancies can be explained by the inclusion of patients with different inflammatory diseases (UC *versus* CD), with heterogeneous clinical scores and treatments, or using inappropriate CMV detection methods.

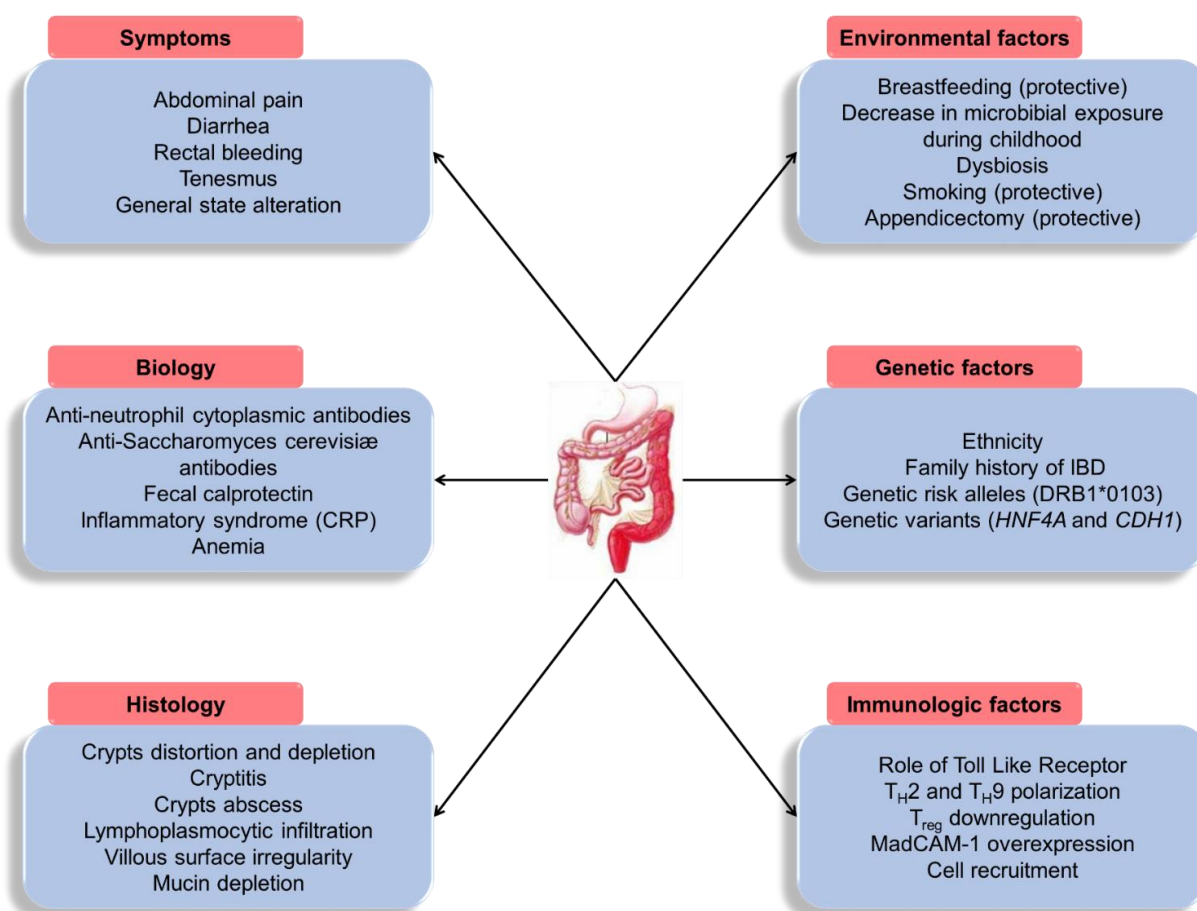


Figure 1: Main characteristics and risk factors of ulcerative colitis.
 CRP: C-reactive protein; IBD: inflammatory bowel disease; TH, T helper cell.

Differences between primary infection and tissue reactivation

It is important to distinguish the specific case of primary CMV infection in patient with an established IBD (UC or CD) and treated with immunosuppressive therapy (especially azathioprine). In this context, the clinical

presentations of CMV primary infection associate a significant viremia with tissue damage, pneumonia and hemophagocytic lymphohistiocytosis. CMV primary infection can lead to the patient death, even if ganciclovir is quickly introduced [46]. This risk of primary infection is high in low seroprevalence IBD populations [56]. Digestive damages are rarely described in this case and will be excluded from the scope of this review.

UC versus CD

Anatomically, UC and CD affect the digestive tract in different ways: in UC, the damage of the rectum is constant together with variable and continue lesions of the colon, whereas in CD the lesions are discontinuous throughout the whole digestive tract. From a immunological point of view, CD is characterized by a T_H1/T_H17 with production of $IFN-\gamma$ exhibiting antiviral properties and a T_c activation [20], whereas, in UC, the T_H2/T_H9 profile does not prevent CMV replication [57] (**Figure 2**). These major immunological differences could explain why CMV tissue reactivation is rare in CD flares whereas it is frequent in UC patients. In our cohort, we showed that CMV tissue infection was of 11% in steroid refractory CD patients versus 38% in UC patients [58]; similar differences have been reported in recent reviews [46,59].

Figure 2A

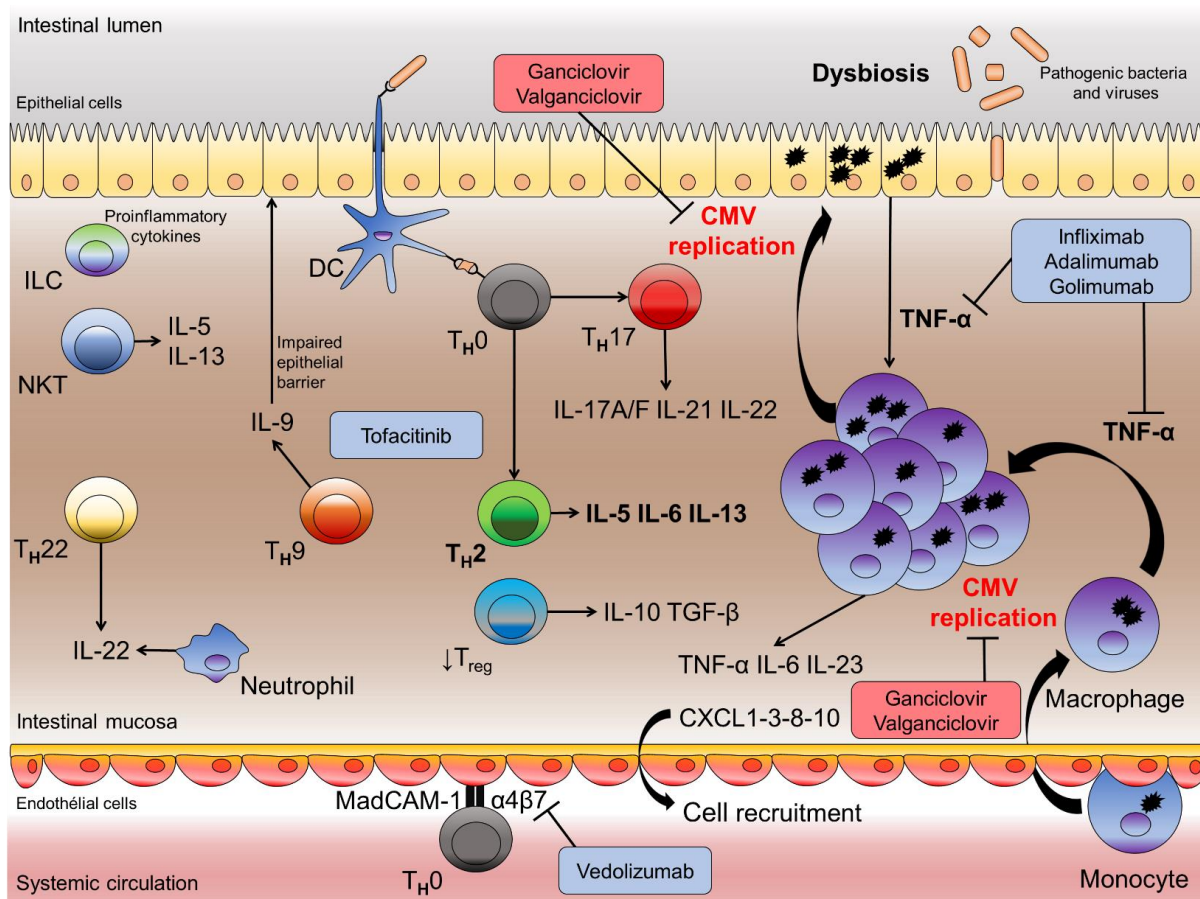


Figure 2B

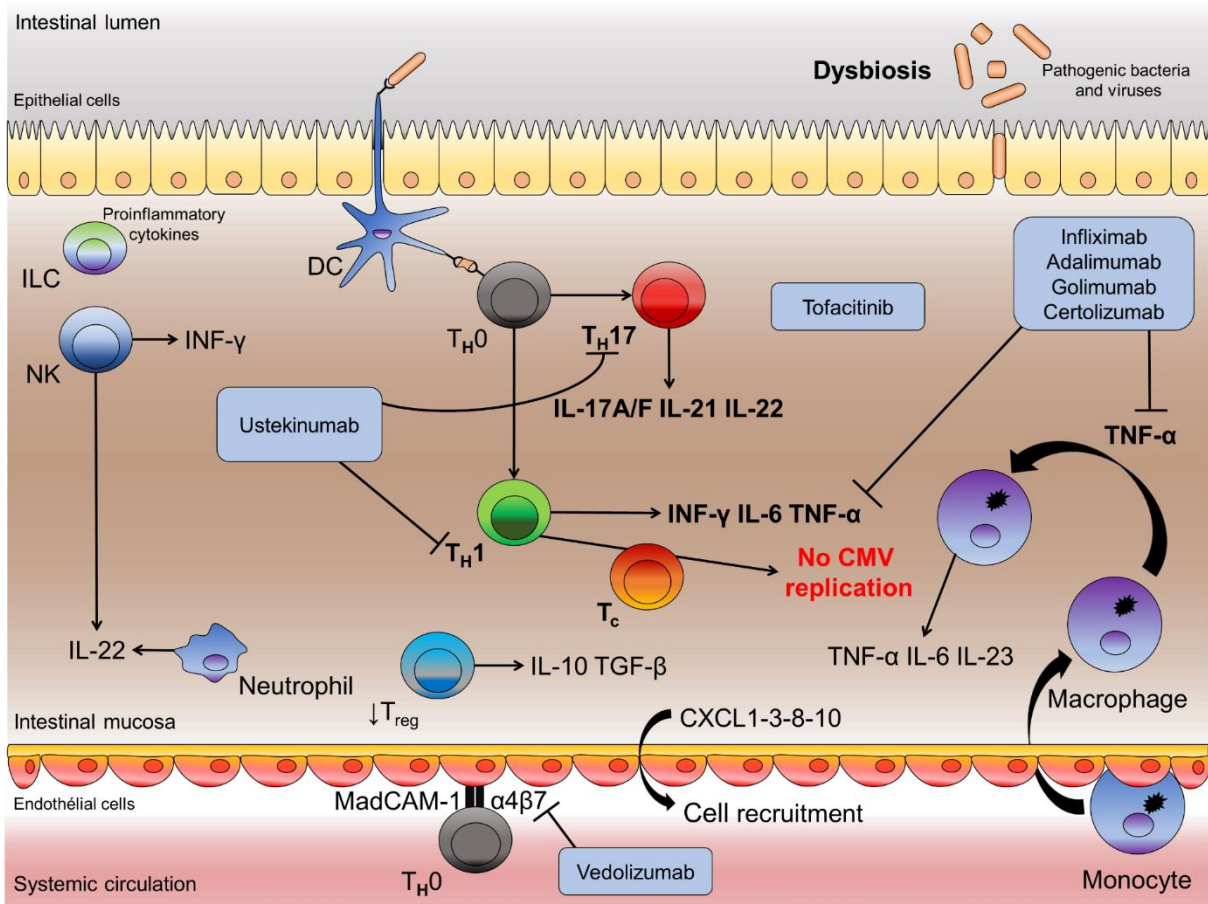


Figure 2: Pathophysiological hypothesis of ulcerative colitis and Crohn's disease in the context of CMV viral reactivation.

The rupture of the epithelial junctions increases intestinal permeability and facilitates the passage of microorganisms from the intestinal lumen to the lamina propria. Microorganisms are processed by DC and macrophages through Toll Like Receptor (TLR). Antigens are primed by human leukocyte antigen (HLA) type II to be presented to TH by TCR (T cell receptor). In the presence of pathogenic bacteria and viruses (dysbiosis), MAMPs stimulate the production of proinflammatory cytokines from epithelial cells, DCs and macrophages. Activated macrophages synthesize proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-23. ILC, NK, NKT also participate in pathophysiology of IBD. Treg have a reduced functionality that does not allow them to counteract the local inflammatory state. Chemokines such as CXCL1-3-8-10 allow cell recruitment which amplifies local inflammation. MadCAM-1 and $\alpha 4\beta 7$ integrin are important molecules for the passage of lymphocytes into the lamina propria. The hematopoietic cells, especially monocytes under the effect of proinflammatory cytokines (TNF- α) and chemokines, are recruited from the intestinal mucosa, where they differentiate into macrophages.

A-In ulcerative colitis, TH differentiate into TH2 with secretion of IL-5, IL-6 and IL-13 and into TH17 with secretion of IL-17 A/F, IL-21 and IL-22. IL-9 produced by TH9 cells inhibits cellular proliferation and repair and has a negative effect on intestinal barrier function. IL-22 produced by TH22 allow the epithelial proliferation. TH2, TH9 polarization of ulcerative colitis would allow viral reactivation and multiplication. Then infection of intestinal cells such as epithelial cells would allow TNF- α production and induces an inflammatory amplifying loop promoting viral replication.

B-In Crohn's disease, TH differentiate into TH1 with secretion of INF- γ IL-6 TNF- α and into TH17 with secretion of IL-17 A/F, IL-21 and IL-22. TH1, TH17 polarization of Crohn's disease would allow better activation of Tc and would prevent CMV replication by controlling the reservoir.

The treatments shown in the figure have received approval in France for IBD. The monoclonal antibodies anti-TNF- α are commonly used in IBD: Infliximab, Adalimumab, Golimumab are used for both CD and UC. Certolizumab is only recommended for CD patients. These treatments inhibit a key player promoting inflammatory the TNF- α . Vedolizumab is a humanized monoclonal antibody to the $\alpha 4\beta 7$ -integrin that blocks lymphocyte trafficking to the gut and is approved for treatment of patients with CD and UC. Ustekinumab, a human anti-IL-12 and anti-IL-23 monoclonal antibody, has indicated in CD. JAKs (janus

kinase) are members of intracellular non-receptor tyrosine protein kinases that convert extracellular into a wide range of cellular processes, including immune and inflammatory responses (JAK/STAT pathway). Tofacitinib blocks JAKs-mediated inflammatory pathways and modulates the adaptive and innate immune responses involved in IBD pathogenesis. Adapted from [5,60,61].

Abbreviations: CMV: cytomegalovirus; CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand; DC: dendritic cell; IL: interleukin; ILC: innate lymphoid cell; INF- γ : interferon gamma; JAK: janus kinase; MadCAM-1: mucosal addressin cell adhesion molecule 1; MAMPs: microbe-associated molecular pattern; NK: natural killer cell; NKT: natural killer T cell; NOD2: nucleotide binding oligomerization domain 2; Tc: cytotoxic T cell; TGF- β : transforming growth factor beta; TH: T helper cell; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; Treg: regulatory T cell.

Virological diagnosis of CMV colitis

CMV mucosal infection cannot be diagnosed by endoscopic examination of the mucosa alone and viral markers should be analyzed in the clinical specimens [12,62]. The reported methods for detecting CMV infection are very heterogeneous and constitute a major bias in results' interpretation. CMV infection can be demonstrated by using either indirect methods (detection of specific IgM and IgG) or direct ones (detection of virus or its components). Some of these methods (reviewed in [36,46]) are not suitable for assessing the tissue reactivation of CMV from its intestinal reservoir.

The presence of IgG against CMV allows targeting patients already exposed to CMV, i.e. at risk of viral reactivation. IgM and IgG serology can also be used to demonstrate a primary infection of unfavorable prognosis. Apart from these indications, serology is not of interest for monitoring patients with IBD.

Except in primary infection, viremia is uncommon in UC patients [44,63,64] and only occurs after several days or weeks of CMV replication in inflammatory colonic tissue. Consequently, viremia can be considered as a marker of less favorable prognosis. In contrast, in order to monitor immunosuppressed patients, techniques that aim to detect CMV in peripheral blood (pp65 antigenemia and viral load by qPCR) are not enough sensitive to early assess CMV colitis [41,65,66]. Studies supporting the role of CMV as innocent bystander have globally detected the stigma of CMV infection in patient's blood by using pp65 antigenemia or serological techniques, and have rarely focused on the presence of CMV in gut [46].

As CMV reactivation initially localizes in the colon of UC patients, the techniques detecting CMV markers in the tissue are the most relevant [44,66] and are currently recommended by guidelines [67,68]. Histological examination with observation of "owl-eye" cells after hematoxylin-eosin (H&E) staining reflects the CMV *in vivo* cytopathogenic effect and are pathognomonic of the tissue infection. In a recent study comparing different methods, the presence of "owl-eye" cells is of bad prognosis with increased risk of colectomy in IBD patients [69,70]. However, histopathological analysis alone is not recommended to assess CMV colitis in IBD patients [71,72]. In order to increase the sensitivity of this technique [73], cells expressing very early (IE) and early (E) virus antigens can be revealed by immunohistochemistry (IHC); this technique also allows a semi-quantification of viral infection after counting the number of colored nuclei by field under an optical microscope [74].

Molecular methods that measure of tissue viral load by qPCR are more and more used. Nested PCR assays should be prohibited due to the high risk of contamination generating false positive results. Fresh biopsies should be preferred to formalin-fixed and paraffinized ones, the treatment for histological examination reducing the integrity of nucleic acids and consequently the sensitivity of the molecular assay.

International guidelines recommend IHC or tissue qPCR [67,68], both being the techniques currently used by various teams. qPCR is more sensitive than IHC [74–76], more reliable and independent of the observer [77]. This molecular technique may however give "false positive" results in case of low viral load. It does not assess the infectious character of the detected genome, whereas observation of infected cells expressing viral antigens does.

The definition of viral load thresholds for therapeutic management of patients is urgently needed [26,41,44,48]; a consensus on results expression using qPCR must also be established since each team uses different units (**Table 1**), which makes it difficult to compare results [20–22].

Table 1: Thresholds proposed in the literature to consider CMV infection to be of significant impact.

Method	Number of patients	Reference	Threshold
IHC			
	80 UC	[82]	0.01 cells/mm ²
	114 UC	[83]	1 inclusion body in histology, positive specific IHC staining for CMV in 10–20 fields of colonic biopsies
	13 CD, 18 UC	[84]	semiquantitative ranging from 1 to 3 (1=rare, 2=common and easy to find, and 3=numerous cells positive for CMV)
	30 UC, 8 CD	[85]	semiquantitative ranging from 1 to 3 (1=rare, 2=common and easy to find, and 3=numerous cells positive for CMV)
	95 UC	[86]	≥ 5 IHC positive cells/biopsy
	46 UC	[87]	colectomy was only associated with > 2 positive cells/biopsy
	257 UC	[70]	semiquantitative low grade (1 to 4 inclusion bodies per section) high grade (at least 5 inclusion bodies per section)
qPCR			
	30 UC	[88]	10 copies/μg of DNA
	42 UC	[44]	10 copies/mg of tissue
	40 IBD	[80]	>1000 copies/100,000 cells
	149 UC	[81]	5 IU/100,000 cells
	92 UC, 9 CD	[64]	≥ 316 copies/mg of DNA
	75 IBD	[89]	10,000 copies/μg of DNA
	103 UC, 30 CD	[45]	> 600 copies/100 000 cells of tissue
	47 IBD	[42]	> 250 copies/mg of tissue

IHC: immunohistochemistry, qPCR: quantitative polymerase chain reaction, UC: ulcerative colitis, CD: Crohn's disease, IBD: inflammatory bowel disease, IU: international unit.

The mucosal site to sample is also questionable. CMV infection markers are not detected in healthy tissue; they are found only in inflammatory tissue [44,74,80]. Different authors recommend analyzing several biopsies because (i) the inflammation is distributed heterogeneously in tissue, (ii) the analysis is carried out on a tiny sample of mucosa and, (iii) it is not easy to assess the inflammatory nature of the mucosa during endoscopic observation [45,74,81,90,91]. The observation of ulcers that represent particularly inflammatory areas of the digestive mucosa is correlated with CMV tissue infection [74,92]. These sites when present must be preferred to detect markers of CMV colitis [11,74,46,93,36].

Other assays for CMV colitis diagnosis

In the future, non-invasive approaches should be evaluated. Among them, the measurement of CMV peripheral T-cell response needs assessment in UC patients [63,94,95]. To date, QuantiFERON-CMV assay or ELISPOT assay that measures IFN- γ level produced *in vitro* by circulating T cells in response to the stimulation with CMV antigens have been used to evaluate the risk of CMV reactivation in stem cells and organ transplant patients [96,97]. These assays could help to classify UC patients in low or high risk of viral reactivation.

Inflammation and immunosuppressive therapies contribute to colonic reactivation of CMV infection during UC

In UC, the mucosa is fragile, with erosions, bleeding and even superficial or deep ulcers of inflammatory areas. Disease activity is assessed by a Mayo clinical score [98], associated with a mucosa inflammatory state estimation during endoscopy by an endoscopic Mayo sub-score [99]. These scores are also used to monitor the efficacy of drug treatment. CMV reactivation in the intestinal mucosa, highly related to the degree of mucosal inflammation, is observed primarily in inflammatory or ulcerated areas. UC patients have an alteration of their digestive mucosa with significant inflammation and even ulcerations. In addition, they receive immunosuppressive treatments. Therefore, they combine two major risk factors promoting CMV reactivation.

Impact of inflammation

UC affects the digestive mucosa, with an alteration of the intestinal barrier and microbiota, an exacerbated reaction against digestive tract antigens, including non-pathogenic commensal bacteria, and an alteration of innate and adaptive immune responses resulting in the local production of many inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-23 (**Figure 2B**). TNF- α is capable of recruiting reservoir cells harboring latent virus such as monocytes that differentiate into macrophages and produce viral infectious particles [36,100]. The binding of TNF- α to its receptor activates protein kinase C and NF- κ B pathway which in-turn stimulates the transcription of the IE genes and thus viral replication [10,16]. Other mediators such as pro-inflammatory prostaglandins, stress catecholamines, epinephrine and norepinephrine also activate the expression of IE genes by increasing cyclic AMP [16]. In UC patients, CMV replication is thus particularly favored by chronic inflammation [21].

Anti-inflammatory and immunosuppressive drugs

Table 2 summarizes the recommendations of UC treatment according to recent national guidelines [68].

Table 2: Medical treatments used in ulcerative colitis according to 2019 consensus British Society of Gastroenterology guidelines [68].

Treatment	Route of administration	Mechanism of action	Recommendations
Salicylates			
5-ASA (5-aminosalicylic acid)	Oral	Decrease inflammation by blocking cyclooxygenase and inhibiting the production of prostaglandins. Inhibition of the NF κ B pathway (decrease in the production of pro-inflammatory cytokines).	Initial treatment of mild to moderate UC should be treated with oral 5-ASA. Oral 5-ASA should be the standard maintenance medical therapy in ulcerative colitis.
Corticosteroid therapy			
	oral IV	Decrease of chemotaxis towards inflammatory sites. Inhibition of microbicidal and phagocytosis functions. Inhibition of T lymphocyte functions	Moderate to severe ulcerative colitis should be treated with oral corticosteroids such as prednisolone weaning over 6–8 weeks. Patients with acute severe UC should be treated with high-dose IV corticosteroids such as methylprednisolone or hydrocortisone.
Thiopurines			

Azathioprine	oral	Inhibition of proliferation of T and B lymphocytes. Decreased antibody production. Myelosuppression	Ulcerative colitis patients on maintenance therapy with high-dose 5-ASA, who required two or more courses of corticosteroids in the past year, or who become corticosteroid-dependent or refractory, require treatment with thiopurine.
Monoclonal antibodies			
Monoclonal antibodies anti-TNF-α		Inhibition of T lymphocytes differentiation. Induction of Treg lymphocytes. Decrease of macrophages activation. Diminution of NF- κ B pathways. Barrier improvement	Ulcerative colitis patients on maintenance therapy with high-dose 5-ASA, who required two or more courses of corticosteroids in the past year, or who become corticosteroid-dependent or refractory, require treatment with anti-TNF- α .
- Infliximab	IV		Patients with acute severe UC failing to respond by day 3, as judged by a suitable scoring system, should be treated with rescue therapy in the form of intravenous infliximab for patients who have not previously failed thiopurine therapy
- Adalimumab	SC		
- Golimumab	SC		
anti-integrin Monoclonal antibody			
- Vedolizumab Human anti- α 4 β 7 monoclonal antibody (anti-integrin)	IV	Inhibition of the adhesion of the T lymphocytes expressing the α 4 β 7 to the molecule-1 of cellular adhesion of mucosal addressin (MAdCAM-1) mainly expressed on the intestinal endothelial cells. Decrease intestinal recruitment of T lymphocytes.	Ulcerative colitis patients on maintenance therapy with high-dose 5-ASA, who required two or more courses of corticosteroids in the past year, or who become corticosteroid-dependent or refractory, require treatment with Vedolizumab.
Other treatments			
Cyclosporin	IV	Inhibitory effects on Th lymphocyte production of IL-2, and IFN- γ . Diminution of cytokines production (IL-3, 4 and 5, TNF- α). Diminution of T lymphocytes and B lymphocytes activation.	Patients with acute severe UC failing to respond by day 3, as judged by a suitable scoring system, should be treated with rescue therapy in the form of cyclosporin for patients who have not previously failed thiopurine therapy
Tofacitinib Janus kinase (JAK) inhibitor	Oral	Diminution of immune and inflammatory responses of JAK/STAT pathway.	Induction and maintenance of remission of ulcerative colitis in patients where anti-TNF treatment has failed. Ulcerative colitis patients on maintenance therapy with high-dose 5-ASA, who required two or more courses of corticosteroids in the past year, or who become corticosteroid-dependent or refractory, require treatment with tofacitinib.

TNF: tumor necrosis factor

The reactivation of CMV is promoted by the administration of drugs with immunosuppressive properties by systemic route [101,102]. Corticosteroids are the first line of treatment for moderate to severe IBD flare-ups but they promote CMV reactivation [23,43,46,55,101,102]. In a recent meta-analysis of 16 observational studies, corticosteroid exposure doubled the risk of CMV tissue reactivation (OR = 2.10; 95% CI = 1.31-3.37) [102]. Corticosteroids generally promote infections by down-regulating monocytes and T lymphocytes activities. In addition, corticosteroids facilitate IE genes transcription [103] and reactivation of latent virus in infected cells [104]. In turn, it has also been proposed that CMV alters the expression of glucocorticoid receptors (GR), with an increased ratio of GR β/α and phosphorylation of the α isoform leading to refractory response to these immunomodulator drugs during lytic infection [105].

The risk of CMV infection in patients with UC treated with thiopurines is also increased (OR = 1.76; 95% CI = 1.21-2.57) [102]. Cyclosporin A administration was also shown to promote CMV reactivation, although these two series included a limited number of included patients [55,106].

Conversely, monoclonal antibodies against TNF- α such as infliximab or adalimumab do not increase the risk of CMV reactivation [44,62,66,67] and tissue CMV infection is not associated with clinical resistance to these biotherapies [107]. These beneficial results of anti-TNF- α on CMV infection are probably related to a reduction of TNF- α pro-inflammatory effect and a decrease in viral replication promoted by this cytokine [109]. Consequently, we have proposed to favor these biotherapies in the treatment of moderate to severe flare-up associated to CMV colonic infection [46].

Concerning vedolizumab, a new immunosuppressive drug that targets the homing of $\alpha 4\beta 7$ lymphocytes, a risk of severe CMV infection has been suggested in the context of either primary infection [110] or reactivation [111,112]. Other studies are needed to confirm these preliminary observations. When this drug is used, it may be prudent to add antiviral effective against CMV, at least in patients at risk of CMV colitis.

Tofacitinib is a recent oral Janus kinase inhibitor approved for the treatment of patients with UC in several countries. Few information regarding CMV reactivation induced by this treatment is available. A review focused on the safety of tofacitinib for treatment of UC reported only one case of CMV colitis [113]. The *in vitro* incubation of peripheral blood mononuclear cells from healthy CMV-seropositive donors with tofacitinib and CMV antigens was less inhibitory against CMV-specific cytokines compared to tacrolimus [114]. The number of CMV-specific IFN- γ -producing cells was also modestly decreased by day 15 in CMV seropositive healthy volunteers received oral tofacitinib [115]. These data suggest that tofacitinib is a safe treatment regarding the risk of CMV infection.

Ustekinumab, a human monoclonal antibody directed to both anti-IL-12 and anti-IL-23, does not have to date approval for UC patients [68]. However, in a cohort of highly refractory UC patients with multiple prior drug failures, ustekinumab provided steroid-free clinical remission in one-third of cases at weeks 12-16 [116]. CMV infection was not recorded in this study.

Active pejorative role of CMV reactivations in UC flare-ups

Once the various confounding factors have been eliminated, a consensus is emerging in the gastroenterology community that CMV colonic reactivation constitute a factor of poor prognostic for moderate to severe flare-up of UC [46]. **Table 3** summarizes the arguments that underline the pejorative impact of CMV colonic reactivation on UC evolution.

Table 3: Evidences for the pathogenic role of CMV in ulcerative colitis (UC) patients.

Criteria and publication	Methods used	Number of patients analyzed	Criteria observed in case of CMV colitis when compared to CMV negative
Severe disease			
Wada et al, Dis Colon Rectum. 2003 [117]	pp65 antigenemia, IHC	47 UC	Higher endoscopic score
Kim et al., Dig Dis Sci 2010 [118]	IHC	122 UC	Hospitalization
Suzuki et al., World J Gastroenterol 2010 [119]	pp65 antigenemia	73 UC	Ulcers
Inokuchi et al. World J Gastroenterol. 2014 [120]	CMV-pp65 antigenemia assay	118 UC	Delay to clinical remission
Kim et al. Gut Liver. 2014 [121]	Heterogeneous (serology, histology, IHC, PCR)	72 UC	Higher disease flare-ups rate
Matsumoto et al. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2014 [122]	Antigenemia, histology	222 UC	Hospitalization
Gauss et al. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2015 [101]	Histology, pp65 antigenemia, IHC, PCR (in tissue or blood)	166 UC and 131 CD	Longer hospital stay
McCurdy et al. Clin Gastroenterol Hepatol. 2015 [108]	Histology, ISH, IHC	45 UC and 21 CD	Endoscopic ulcers
Lee et al., IBD 2016 [91]	Histology, IHC	149 UC	Higher Mayo score and need for rescue therapy
Cohen et al., Pediatr Infect Dis J. 2018 [50]	Histology, IHC	56 UC	Longer hospital stay
Oh et al. Scand J Gastroenterol. 2019 [70]	Histology, IHC	257 UC	Deep ulcerations and higher disease activity, global poor outcome
Okahara et al., PLoS One. 2017 [123]	qPCR in tissue	46 UC	Higher endoscopic score
Henmi et al., J Clin Biochem Nutr 2018 [80]	qPCR in tissue	86 UC	Higher endoscopic score
Nowacki et al. J Clin Virol 2018 [63]	PCR, IHC	239 UC	More severe disease
Increased mortality			
Kishore et al, J Med Microbiol. 2004 [124]	PCR, Serology (IgM), Histology	61 UC and 2 CD	Surgery, fatal outcome
Zagórowicz et al., J Crohns Colitis.2016 [86]	IHC	95 UC	Lower hemoglobin and albumin levels, more intense histological inflammation
Hendler et al., Int J Colorectal Dis 2020 [1]	Not described	406,118 UC patients	Mortality, longer hospital stay, hospital charges
Surgery			
Kishore et al, J Med Microbiol. 2004 [124]	PCR, Serology (IgM), Histology	61 UC and 2 CD	Colectomy
Maconi et al, Dig Liver Dis. 2005 [125]	Histology, IHC	77 UC	CMV found in surgical specimens of colectomy
Kojima et al, Scand J Gastroenterol. 2006 [126]	Histology, IHC	126 UC	Colectomy
Kuwabara et al, J Gastroenterol. 2007[127]	IHC	34 UC and 16 CD	Colectomy
Minami et al World J Gastroenterol. 2007 [128]	Heterogeneous (serology, histology, IHC,	23 UC	Colectomy

	PCR)		
Nguyen et al. Ulcers 2011 [73]	Histology, IHC	26 UC and 17 CD	Colectomy
Al-Zafiri et al. Gastroenterol Hepatol (NY). 2012 [84]	IHC	13 CD and 18 UC	Colectomy
Yoshino et al. Aliment Pharmacol Ther. 2012 [129]	qPCR in tissue	17 UC	Colectomy
Kopylov et al., World J Gastrointest Pathophysiol 2013 [130]	IHC	13 UC	Colectomy
Kim et al. Gut Liver. 2014 [121]	Heterogeneous (serology, histology, IHC, PCR)	72 UC	Colectomy
Kim et al., JCC 2014 [131]	IHC, pp65 antigenemia	229 UC	Colectomy
Olaisen et al. Scand J Gastroenterol. 2014 [132]	IHC	77 UC	Surgical complications
Minami et al. BMJ Open Gastroenterol. 2015 [133]	Histology, IHC, qPCR in tissue	29 UC	Colectomy
Zagórowicz et al., J Crohns Colitis. 2016 [86]	IHC	95 UC	Colectomy
Schenk et al. Int J Colorectal Dis. 2019 [134]	qPCR in tissue	108 UC	Proctocolectomy
Lee et al., IBD 2016 [91]	Histology, IHC	149 UC	Colectomy
Cohen et al., Pediatr Infect Dis J. 2018 [50]	Histology, IHC	56 UC	Colectomy
Schenk Int J Colorectal Dis 2018 [134]	Tissue PCR	108 UC	Proctocolectomy
Clos-Parals et al., J Crohns Colitis 2019 [87]	IHC	46 UC	Colectomy
Hendler et al., Int J Colorectal Dis 2020 [1]	Not described	406,118 UC patients	Colectomy
Resistance to immunosuppressive therapy			
Wada et al, Dis Colon Rectum. 2003 [117]	pp65 antigenemia, IHC	47 UC	Steroid resistance
Kambham et al. Am J Surg Pathol. 2004 [82]	IHC	80 UC	Steroid resistance
Maconi et al, Dig Liver Dis. 2005 [125]	Histology, IHC	77 UC	Steroid resistance
Kojima et al, Scand J Gastroenterol. 2006 [126]	Histology, IHC	126 UC	Refractory disease
Kuwabara et al, J Gastroenterol. 2007 [127]	IHC	34 UC and 16 CD	Steroid resistance
Maher et al. Dig Dis Sci. 2009 [135]	Histology, IHC	49 UC and 23 CD	Steroid resistance
Roblin et al. Am J Gastroenterol. 2011 [44]	qPCR in tissue	42 UC	Steroid resistance Resistance to successive therapeutic lines
Kim et al. J Clin Gastroenterol. 2012 [136]	Histology, IHC, PCR	72 UC	Steroid resistance
Iida et al., IBD 2013 [137]	pp65 antigenemia	187 UC	Steroid resistance
Chun et al. Intest Res. 2015 [138]	pp65 antigenemia	43 UC	Steroid resistance

Ciccocioppo et al. World J Gastroenterol. 2015 [80]	qPCR in tissue	24 UC and 16 CD	Refractory disease
McCurdy et al. Clin Gastroenterol Hepatol. 2015[108]	Histology, ISH, IHC	45 UC and 21 CD	Refractory disease
Ormecci et al., Eur Rev Med Pharmacol Sci 2016 [139]	qPCR	35 UC	Steroid resistance and resistance to immunosuppressive treatment
Pillet et al., Am J Gastroenterol 2016 [81]	qPCR	149 UC	Steroid resistance Resistance to successive therapeutic lines
Cohen et al., Pediatr Infect Dis J. 2018 [50]	Histology and IHC	56 UC	Steroid resistance
Okahara et al., PLoS One. 2017 [123]	qPCR in tissue	46 UC	Higher corticosteroid doses
Hissong et al. Mod Pathol 2019 [140]	Histology and IHC	99 CD and 169 UC	Steroid dependence
Tun et al., Annals of Gastroenterol 2019[43]	Tissue PCR	52 UC patients	Steroid resistance
Jung et al., Open Forum Infect Dis 2019 [94]	IHC or qPCR	80 UC patients	Steroid resistance

CD : Crohn's disease; IHC: immunohistochemistry; ISH : in situ hybridization; qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction ; UC : ulcerative colitis

Consequently, international recommendations mention for several years the need for detection of CMV markers in case of resistance to different lines of treatment and, in case of positivity, the introduction of antiviral drug without interrupting the immunosuppressive therapy [67,68].

Association of CMV infection with a pejorative evolution of UC

CMV infection in UC flare-ups is a major factor of non-response to immunosuppressive therapy, particularly to corticosteroids [73]. It is also associated with a higher rate of colectomy [55,79,86] and a risk of superinfection with *Clostridium difficile* [141–143], in addition, these risks increase the length of patient hospitalization [1,91,143,144].

Association with steroid resistance and resistance to immunosuppressive treatments

The use of steroids is considered as a major risk factor [46,102] (**Table 3**): CMV colitis is reported in about 30% of steroid-resistant UC flare-ups [43–45]. By using qPCR, we have established a viral load threshold associated with steroid resistance of 10 copies/mg of tissue [44] or 5 international units (IU) per 100,000 cells [81] (**Table 1**).

We have also shown that tissue CMV viral load predicts the response to several lines of immunosuppressive treatment: a viral load greater than 250 copies/mg of tissue or 370 IU/100,000 cells (sensitivity 95.2% [95% CI: 88.1-100%] and specificity 97.2% [95% CI: 93.5-100%]) is associated with resistance to more than 2 successive lines of treatment [44,81]. In contrast, as mentioned above, tissue CMV infection does not alter the efficacy of anti-TNF agents, even if the viral load is high [107].

Indications of viral load measurement during UC flare-ups

Several authors propose measuring viral load by IHC or qPCR to adjust anti-inflammatory treatment and to consider antiviral therapy [11,46,145–147]. Currently, the heterogeneity of methods and thresholds that are used for identifying CMV reactivation does not make possible the establishment of consensual values for therapeutic adjustment (**Table 1**). In addition, the importance of multiple biopsies has been emphasized to avoid false negative results, especially when the estimation of the mucosa inflammatory state is difficult during endoscopy [81]. Despite

these technical difficulties, it is now clear that patients exhibiting CMV markers at the gut level should receive antiviral therapy.

As it seems difficult to perform rectosigmoidoscopy with inflammatory tissue sampling to all patients with a flare-up of UC, current studies are focusing on defining predictive factors able to target patients for whom CMV research in inflammatory tissue would have the best cost/benefit ratio (**Table 4**).

Table 4: Predictive factors for CMV colitis in UC patients

Publication	Country	Method for CMV detection	Population studied	Predictive factors identified	OR in multivariate analysis
Henmi et al., J Clin Biochem Nutr 2018 [148]	Japan	qPCR	86 patients with UC exacerbation	Age Endoscopic score Combined immunosuppressants	1.083 [1.025-1.143] 2.8 [0.653-11.996] 7.439 [1.001-55.304]
Nowacki et al., J Clin Virol 2018 [63]	Germany	PCR in blood or PCR in tissue or IHC in tissue	239 UC patients	Disease activity (partial Mayo score) Use of steroids	1.37 [1.09-1.72] 2.43 [1.44-4.03]
Levin et al., Digestion 2017[149]	Israel	qPCR in tissue	28 UC patients	Use of steroids Fever > 38°C	14.5 [1.07-198] 20 [1.2-330]
Lee et al., IBD 2016 [91]	Korea	H&E and IHC	149 patients	Use of steroids High Mayo score	3.30 [1.33-8.19] 1.58 [1.05-2.38]
Hirayama et al., WJGE 2016 [92]	Japan	Agpp65 or H&E or IHC	149 UC	Use of systemic steroid dose at dose > 400 mg for 4 weeks before admission Punched-out ulcer	26.697 [5.848-121.868] 12.672 [4.210-38.143]
Gauss et al., Eur J Gastroenterol Hepatol [101]	Germany	IHC or tissue PCR	297 IBD patients	Age > 30 years Disease duration > 60 months Blood leucocytes < 11/nl Immunosuppressive therapy at admission	14.29 [2.89-118.57] 7.69 [1.80-45.41] 4.49 [1.15-21.79] 6.73 [1.67-35.63]
McCurdy et al., Clin Gastroenterol Hepatol 2015 [108]	United States	H&E and IHC or in situ hybridation	68 IBD patients	Age > 30 years Use of immunomodulators Refractory disease	2.26 [1.02-5.03] 1.95 [1.05-3.62] 4.24 [2.21-8.11]
Mavropoulou et al., BMJ Open Gastro 2019 [42]	Germany	qPCR	47 IBD patients	Use of steroid Use of calcineurin inhibitors Use of 2 concurrent lines of immunosuppressive therapy	7.1 [1.7-29.9] 21.3 [2.4-188.7] 13.4 [3.2-56.1]

One of the first and easy analysis is to screen UC patients with CMV serology in order to propose CMV detection only in IgG positive ones [12,150]. Several other criteria have been proposed but there is currently no consensus on any of them, except the presence of ulcers on endoscopy should encourage analysis of viral markers in inflammatory tissue.

Place of antiviral treatment

In the literature, several publications report isolated cases or small series of patients exhibiting UC relapses associated with CMV colitis, who have been treated with ganciclovir (or valganciclovir). Antiviral therapy is the most appropriate one for moderate to severe, steroid-refractory relapses with a high viral load [79]. A meta-analysis confirmed a decreased risk of colectomy (OR 0.20; 95% CI 0.08-0.49) when antiviral therapy is introduced in the case of steroid refractory flare-ups associated to CMV colitis [145]. We have shown that ganciclovir treatment of few UC patients resistant to several therapeutic lines resulted in negativation of the DNA viral load in the inflamed tissue and restored the response to immunosuppressive therapies [44]. This success has been confirmed in other case reports or analysis of limited cohorts of patients (**Table 3**). The duration of antiviral treatment should be at least of 2

weeks, and if possible by intravenous route [151], as the inflammation of the gut may compromise the drug absorption.

For the management of such patients, we proposed an algorithm that considers the CMV viral load in inflammatory tissue (**Figure 3**).

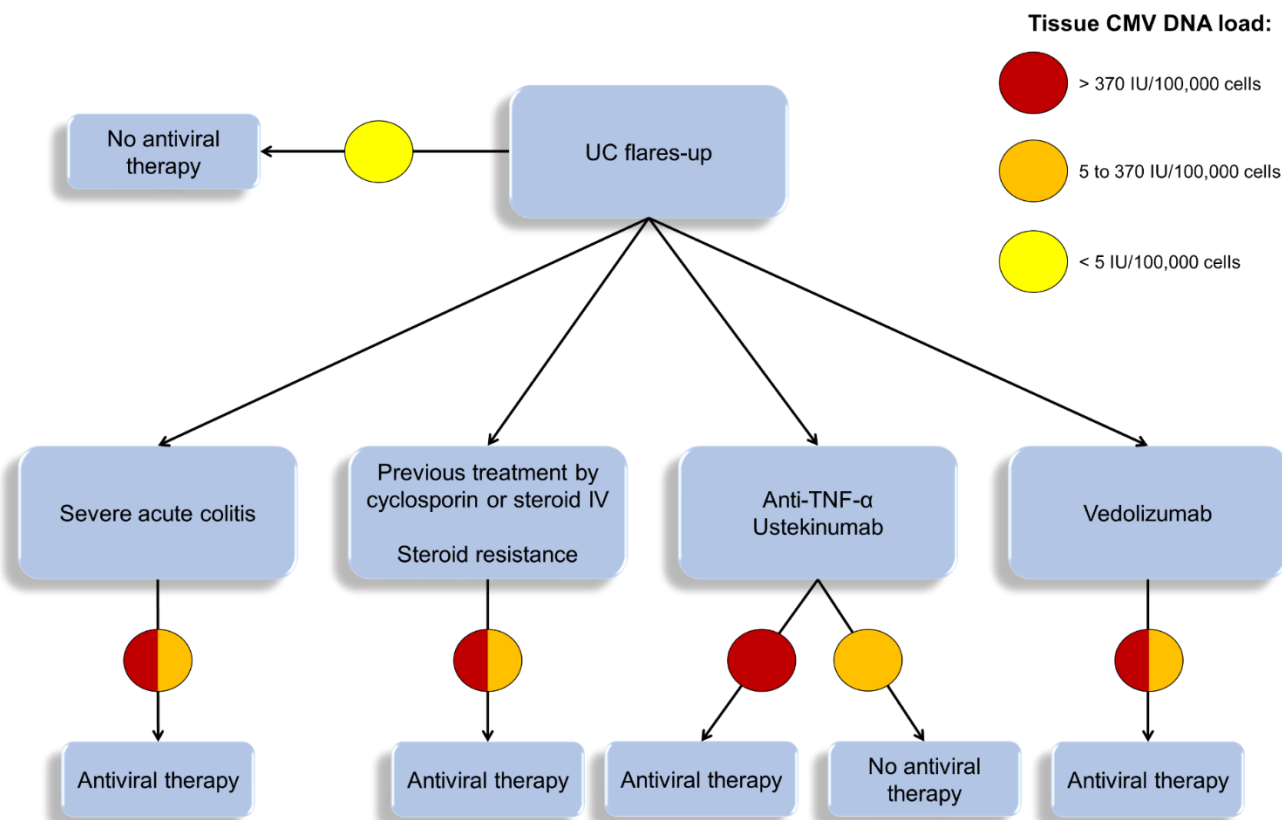


Figure 3: Therapeutic algorithm for the intake of flare-ups of ulcerative colitis (UC) flare-ups according to the quantification of cytomegalovirus DNA load in colonic tissue. The DNA load thresholds are those determined in our previous study [81]. The algorithm is drawn according to the last recommendations [8,68,152] and publications [46,81,107,111,153–156]. CMV: Cytomegalovirus; IV: intravenous; TNF: Tumor necrosis factor.

For most authors, antiviral treatment should not suspend immunosuppressive therapy in order to obtain a synergistic effect on inflammation and viral replication [109,153], especially when anti-TNF- α therapy is used [107,109]. The European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) recommends to continue the immunosuppressive therapy in case of CMV colitis and to stop it in case of systemic infection [67]. The British Society of Gastroenterology recently published that “CMV reactivation in the colonic mucosa of patients hospitalized with an exacerbation of UC may be treated by intravenous ganciclovir 5 mg/kg twice daily while continuing conventional therapy with corticosteroids or rescue medication with infliximab or ciclosporin” [68]. A repeat endoscopic procedure may be useful to control the negativation of colon viral load.

Other therapeutic options

Some authors propose to use granulocyte/monocyte adsorptive apheresis [157–159], especially in Japan. Tacrolimus has also been proposed as an alternative solution to care UC patients with CMV colitis [54,88] [148].

Conclusion and perspectives

UC therapeutic management is complex and depends on disease activity, location, progression, extraintestinal manifestations and side effects of the immunosuppressive drugs. Algorithms have recently been published to better rationalize this management [7,12,46,150,160,161]. In addition to these recommendations, we suggest that anti-TNF biotherapy, combined with a ganciclovir-type antiviral agent, should be preferred in the case of a moderate or high viral load. This management strategy should be confirmed by a randomized trial including patients with UC flare-ups of steroid-refractory UC associated with CMV colitis.

Most studies have focused on CMV infection. Other viruses, particularly of the *Herpesviridae* family, may also play a role in UC flare-ups, notably in association with CMV. For example, co-infection of CMV with EBV or HHV-6 was shown to be an independent risk factor for colectomy [162]. In addition, high viral loads for EBV have been found in inflammatory tissue [80]; it cannot be excluded that its presence may be associated to negative evolutionary factors, particularly that of digestive lymphoma. The enteric virome has also been shown to be altered in IBD [163] which could enhance the dysbiosis and the inflammation.

Back to CMV, a better understanding of the complex interactions between the local immune system and the colonic viral infections would make it possible to envisage better targeted therapeutic strategies, including therapeutic vaccination to "cure" the intestinal viral reservoir.

References

1. Hendler, S.A.; Barber, G.E.; Okafor, P.N.; Chang, M.S.; Limsui, D.; Limketkai, B.N. Cytomegalovirus infection is associated with worse outcomes in inflammatory bowel disease hospitalizations nationwide. *Int. J. Colorectal Dis.* **2020**, *35*, 897–903, doi:10.1007/s00384-020-03536-8.
2. Ng, S.C.; Shi, H.Y.; Hamidi, N.; Underwood, F.E.; Tang, W.; Benchimol, E.I.; Panaccione, R.; Ghosh, S.; Wu, J.C.Y.; Chan, F.K.L.; et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet Lond. Engl.* **2018**, *390*, 2769–2778, doi:10.1016/S0140-6736(17)32448-0.
3. Ghione, S.; Sarter, H.; Fumery, M.; Armengol-Debeir, L.; Savoye, G.; Ley, D.; Spyckerelle, C.; Pariente, B.; Peyrin-Biroulet, L.; Turck, D.; et al. Dramatic Increase in Incidence of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease (1988-2011): A Population-Based Study of French Adolescents. *Am. J. Gastroenterol.* **2018**, *113*, 265–272, doi:10.1038/ajg.2017.228.
4. Ramos, G.P.; Papadakis, K.A. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clin. Proc.* **2019**, *94*, 155–165, doi:10.1016/j.mayocp.2018.09.013.
5. Ungaro, R.; Mehandru, S.; Allen, P.B.; Peyrin-Biroulet, L.; Colombel, J.-F. Ulcerative colitis. *Lancet Lond. Engl.* **2017**, *389*, 1756–1770, doi:10.1016/S0140-6736(16)32126-2.
6. Ordás, I.; Eckmann, L.; Talamini, M.; Baumgart, D.C.; Sandborn, W.J. Ulcerative colitis. *Lancet* **2012**, *380*, 1606–1619, doi:10.1016/S0140-6736(12)60150-0.
7. Gajendran, M.; Loganathan, P.; Jimenez, G.; Catinella, A.P.; Ng, N.; Umapathy, C.; Ziade, N.; Hashash, J.G. A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Dis.--Mon. DM* **2019**, *65*, 100851, doi:10.1016/j.disamonth.2019.02.004.
8. Magro, F.; Gionchetti, P.; Eliakim, R.; Ardizzone, S.; Armuzzi, A.; Barreiro-de Acosta, M.; Burisch, J.; Gecse, K.B.; Hart, A.L.; Hindryckx, P.; et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J. Crohns Colitis* **2017**, *11*, 649–670, doi:10.1093/ecco-jcc/jjx008.
9. Tripathi, K.; Feuerstein, J.D. New developments in ulcerative colitis: latest evidence on management, treatment, and maintenance. *Drugs Context* **2019**, *8*, 212572, doi:10.7573/dic.212572.
10. Varani, S.; Landini, M.P. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae* **2011**, *2*, 6, doi:10.1186/2042-4280-2-6.
11. Park, S.C.; Jeon, Y.M.; Jeon, Y.T. Approach to cytomegalovirus infections in patients with ulcerative colitis. *Korean J. Intern. Med.* **2017**, *32*, 383–392, doi:10.3904/kjim.2017.087.
12. Fakhreddine, A.Y.; Frenette, C.T.; Konijeti, G.G. A Practical Review of Cytomegalovirus in Gastroenterology and Hepatology. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2019**, *2019*, 6156581, doi:10.1155/2019/6156581.
13. Berry, R.; Watson, G.M.; Jonjic, S.; Degli-Esposti, M.A.; Rossjohn, J. Modulation of innate and adaptive immunity by cytomegaloviruses. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 113–127, doi:10.1038/s41577-019-0225-5.
14. Picarda, G.; Benedict, C.A. Cytomegalovirus: Shape-Shifting the Immune System. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2018**, *200*, 3881–3889, doi:10.4049/jimmunol.1800171.
15. Leruez-Ville, M.; Foulon, I.; Pass, R.; Ville, Y. Cytomegalovirus infection during pregnancy: State of the science. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2020**, doi:10.1016/j.ajog.2020.02.018.
16. Crough, T.; Khanna, R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 76–98, Table of Contents, doi:10.1128/CMR.00034-08.
17. Collins-McMillen, D.; Buehler, J.; Peppenelli, M.; Goodrum, F. Molecular Determinants and the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. *Viruses* **2018**, *10*, doi:10.3390/v10080444.

18. Ljungman, P.; Boeckh, M.; Hirsch, H.H.; Josephson, F.; Lundgren, J.; Nichols, G.; Pikis, A.; Razonable, R.R.; Miller, V.; Griffiths, P.D.; et al. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2017**, *64*, 87–91, doi:10.1093/cid/ciw668.
19. Boeckh, M.; Geballe, A.P. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 1673–1680, doi:10.1172/JCI45449.
20. Rossini, G.; Cerboni, C.; Santoni, A.; Landini, M.P.; Landolfo, S.; Gatti, D.; Gribaudo, G.; Varani, S. Interplay between human cytomegalovirus and intrinsic/innate host responses: a complex bidirectional relationship. *Mediators Inflamm.* **2012**, *2012*, 607276, doi:10.1155/2012/607276.
21. Söderberg-Nauclér, C. Treatment of cytomegalovirus infections beyond acute disease to improve human health. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2014**, *12*, 211–222, doi:10.1586/14787210.2014.870472.
22. Couzi, L.; Pitard, V.; Moreau, J.-F.; Merville, P.; Déchanet-Merville, J. Direct and Indirect Effects of Cytomegalovirus-Induced $\gamma\delta$ T Cells after Kidney Transplantation. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, doi:10.3389/fimmu.2015.00003.
23. Xue, M.; Chen, S.J.; Wang, L.J.; Du, Y.; Si, J.M. Cytomegalovirus: a probable cause of steroid-refractory ulcerative colitis. *J. Dig. Dis.* **2013**, *14*, 160–165, doi:10.1111/1751-2980.12037.
24. Goodman, A.L.; Murray, C.D.; Watkins, J.; Griffiths, P.D.; Webster, D.P. CMV in the gut: a critical review of CMV detection in the immunocompetent host with colitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **2015**, *34*, 13–18, doi:10.1007/s10096-014-2212-x.
25. Sezgin, E.; An, P.; Winkler, C.A. Host Genetics of Cytomegalovirus Pathogenesis. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 616, doi:10.3389/fgene.2019.00616.
26. Britt, W.J.; Prichard, M.N. New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res.* **2018**, *159*, 153–174, doi:10.1016/j.antiviral.2018.09.003.
27. Ligat, G.; Cazal, R.; Hantz, S.; Alain, S. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *42*, 137–145, doi:10.1093/femsre/fuy004.
28. Marty, F.M.; Ljungman, P.; Chemaly, R.F.; Maertens, J.; Dadwal, S.S.; Duarte, R.F.; Haider, S.; Ullmann, A.J.; Katayama, Y.; Brown, J.; et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2433–2444, doi:10.1056/NEJMoa1706640.
29. Diamond, D.J.; La Rosa, C.; Chiappesi, F.; Contreras, H.; Dadwal, S.; Wussow, F.; Bautista, S.; Nakamura, R.; Zaia, J.A. A fifty-year odyssey: prospects for a cytomegalovirus vaccine in transplant and congenital infection. *Expert Rev. Vaccines* **2018**, *17*, 889–911, doi:10.1080/14760584.2018.1526085.
30. Zuhair, M.; Smit, G.S.A.; Wallis, G.; Jabbar, F.; Smith, C.; Devleeschauwer, B.; Griffiths, P. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* **2019**, *29*, e2034, doi:10.1002/rmv.2034.
31. Sinzger, C.; Grefte, A.; Plachter, B.; Gouw, A.S.; The, T.H.; Jahn, G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76* (Pt 4), 741–750, doi:10.1099/0022-1317-76-4-741.
32. You, D.M.; Johnson, M.D. Cytomegalovirus infection and the gastrointestinal tract. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2012**, *14*, 334–342, doi:10.1007/s11894-012-0266-4.
33. Hasegawa, T.; Aomatsu, K.; Nakamura, M.; Aomatsu, N.; Aomatsu, K. Cytomegalovirus colitis followed by ischemic colitis in a non-immunocompromised adult: a case report. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 3750–3754, doi:10.3748/wjg.v21.i12.3750.
34. D’cruz, R.T.; Lau, C.C.-L.; Thamboo, T.P. Severe ischemic cytomegalovirus proctocolitis with multiple perforation. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 1927–1931, doi:10.1007/s00705-018-3792-z.
35. Dennis, E.A.; Smythies, L.E.; Grabski, R.; Li, M.; Ballestas, M.E.; Shimamura, M.; Sun, J.J.; Grams, J.; Stahl, R.; Niederweis, M.E.; et al. Cytomegalovirus promotes intestinal macrophage-mediated mucosal inflammation through induction of Smad7. *Mucosal Immunol.* **2018**, *11*, 1694–1704, doi:10.1038/s41385-018-0041-4.
36. Yokoyama, Y.; Yamakawa, T.; Hirano, T.; Kazama, T.; Hirayama, D.; Wagatsuma, K.; Nakase, H. Current Diagnostic and Therapeutic Approaches to Cytomegalovirus Infections in Ulcerative Colitis Patients Based on Clinical and Basic Research Data. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21072438.
37. Maidji, E.; Somsouk, M.; Rivera, J.M.; Hunt, P.W.; Stoddart, C.A. Replication of CMV in the gut of HIV-infected individuals and epithelial barrier dysfunction. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006202, doi:10.1371/journal.ppat.1006202.
38. Bernard, S.; Germi, R.; Lupo, J.; Laverrière, M.-H.; Masse, V.; Morand, P.; Gavazzi, G. Symptomatic cytomegalovirus gastrointestinal infection with positive quantitative real-time PCR findings in apparently immunocompetent patients: a case series. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1121.e1–7, doi:10.1016/j.cmi.2015.05.016.
39. Inayat, F.; Hussain, Q.; Shafique, K.; Tasleem, S.H.; Hurairah, A. Cytomegalovirus Colitis in Immunocompetent Patients. *Cureus* **2016**, *8*, e869, doi:10.7759/cureus.869.
40. Goelz, R.; Hamprecht, K.; Klingel, K.; Poets, C.F. Intestinal manifestations of postnatal and congenital cytomegalovirus infection in term and preterm infants. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **2016**, *83*, 29–36, doi:10.1016/j.jcv.2016.08.289.
41. Dioverti, M.V.; Razonable, R.R. Cytomegalovirus. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0022-2015.
42. Mavropoulou, E.; Ternes, K.; Mechie, N.-C.; Bremer, S.C.B.; Kunsch, S.; Ellenrieder, V.; Neesse, A.; Amanzada, A. Cytomegalovirus colitis in inflammatory bowel disease and after haematopoietic stem cell transplantation: diagnostic accuracy, predictors, risk factors and disease outcome. *BMJ Open Gastroenterol.* **2019**, *6*, e000258, doi:10.1136/bmjgast-2018-000258.
43. Tun, G.S.Z.; Raza, M.; Hale, M.F.; Lobo, A.J. Polymerase chain reaction for detection of mucosal cytomegalovirus infection in patients with acute ulcerative colitis. *Ann. Gastroenterol.* **2019**, *32*, 81–87, doi:10.20524/aog.2018.0318.
44. Roblin, X.; Pillet, S.; Oussalah, A.; Berthelot, P.; Del Tedesco, E.; Phelip, J.-M.; Chambonnière, M.-L.; Garraud, O.; Peyrin-Biroulet, L.; Pozzetto, B. Cytomegalovirus load in inflamed intestinal tissue is predictive of resistance to immunosuppressive therapy in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2011**, *106*, 2001–2008, doi:10.1038/ajg.2011.202.

45. Wethkamp, N.; Nordlohne, E.-M.; Meister, V.; Helwig, U.; Respondek, M. Identification of clinically relevant cytomegalovirus infections in patients with inflammatory bowel disease. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **2018**, *31*, 527–538, doi:10.1038/modpathol.2017.149.
46. Pillet, S.; Pozzetto, B.; Roblin, X. Cytomegalovirus and ulcerative colitis: Place of antiviral therapy. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 2030–2045, doi:10.3748/wjg.v22.i6.2030.
47. El-Matary, W.; Stefanovici, C.; Van Caesele, P.; Deora, V.; McCurdy, J. Detection of Cytomegalovirus in Colonic Mucosa of Children With Inflammatory Bowel Disease: Inflammatory Bowel Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2018**, *67*, 221–224, doi:10.1097/MPG.0000000000001976.
48. deBruyn, J.C.C.; Soon, I.S.; Fonseca, K.; Feng, S.; Purtzki, M.; Goedhart, C.; Kuhn, S.; Vanderkooi, O.G.; Wrobel, I. Serologic Status of Routine Childhood Vaccines, Cytomegalovirus, and Epstein-Barr Virus in Children With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2019**, *25*, 1218–1226, doi:10.1093/ibd/izy366.
49. Yerushalmy-Feler, A.; Kern-Isaacs, S.; Cohen, S. CMV Infection in Pediatric IBD. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2018**, *20*, 13, doi:10.1007/s11894-018-0617-x.
50. Cohen, S.; Martinez-Vinson, C.; Aloï, M.; Turner, D.; Assa, A.; de Ridder, L.; Wolters, V.M.; de Meij, T.; Alvisi, P.; Bronsky, J.; et al. Cytomegalovirus Infection in Pediatric Severe Ulcerative Colitis-A Multicenter Study from the Pediatric Inflammatory Bowel Disease Porto Group of the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2018**, *37*, 197–201, doi:10.1097/INF.0000000000001724.
51. Chiba, M.; Abe, T.; Tsuda, S.; Ono, I. Cytomegalovirus infection associated with onset of ulcerative colitis. *BMC Res. Notes* **2013**, *6*, 40, doi:10.1186/1756-0500-6-40.
52. Lawlor, G.; Moss, A.C. Cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: pathogen or innocent bystander? *Inflamm. Bowel Dis.* **2010**, *16*, 1620–1627, doi:10.1002/ibd.21275.
53. Criscuolo, V.; Rizzuto, M.-R.; Cottone, M. Cytomegalovirus and inflammatory bowel disease: is there a link? *World J. Gastroenterol. WJG* **2006**, *12*, 4813–4818.
54. Matsuoka, K.; Iwao, Y.; Mori, T.; Sakuraba, A.; Yajima, T.; Hisamatsu, T.; Okamoto, S.; Morohoshi, Y.; Izumiya, M.; Ichikawa, H.; et al. Cytomegalovirus is frequently reactivated and disappears without antiviral agents in ulcerative colitis patients. *Am. J. Gastroenterol.* **2007**, *102*, 331–337, doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00989.x.
55. Domènech, E.; Vega, R.; Ojanguren, I.; Hernández, A.; Garcia-Planella, E.; Bernal, I.; Rosinach, M.; Boix, J.; Cabré, E.; Gassull, M.A. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis: a prospective, comparative study on prevalence and diagnostic strategy. *Inflamm. Bowel Dis.* **2008**, *14*, 1373–1379, doi:10.1002/ibd.20498.
56. Rowan, C.; Judge, C.; Cannon, M.D.; Cullen, G.; Mulcahy, H.E.; Ryan, E.; De Gascun, C.F.; Doherty, G.A. Severe Symptomatic Primary CMV Infection in Inflammatory Bowel Disease Patients with Low Population Seroprevalence. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2018**, *2018*, 1029401, doi:10.1155/2018/1029401.
57. Strober, W.; Fuss, I.J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 1756–1767, doi:10.1053/j.gastro.2011.02.016.
58. Roblin, X.; Pillet, S.; Berthelot, P.; Del Tedesco, E.; Phelip, J.-M.; Chambonnière, M.-L.; Peyrin-Biroulet, L.; Pozzetto, B. Prevalence of cytomegalovirus infection in steroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2012**, *18*, E1396-1397, doi:10.1002/ibd.21907.
59. Römkens, T.E.H.; Bulte, G.J.; Nissen, L.H.C.; Drenth, J.P.H. Cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: A systematic review. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 1321–1330, doi:10.3748/wjg.v22.i3.1321.
60. de Souza, H.S.P.; Fiocchi, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *13*, 13–27, doi:10.1038/nrgastro.2015.186.
61. Neurath, M.F. Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 970–979, doi:10.1038/s41590-019-0415-0.
62. Yerushalmy-Feler, A.; Padlipsky, J.; Cohen, S. Diagnosis and Management of CMV Colitis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2019**, *21*, 5, doi:10.1007/s11908-019-0664-y.
63. Nowacki, T.M.; Bettenworth, D.; Meister, T.; Heidemann, J.; Lenze, F.; Schmidt, H.H.; Heinzow, H.S. Novel score predicts risk for cytomegalovirus infection in ulcerative colitis. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **2018**, *105*, 103–108, doi:10.1016/j.jcv.2018.06.002.
64. Paul, M.; Gupta, E.; Jain, P.; Rastogi, A.; Bhatia, V. Diagnostic utility of quantitative cytomegalovirus DNA polymerase chain reaction in intestinal biopsies from patients with inflammatory bowel disease. *J. Lab. Physicians* **2018**, *10*, 38–43, doi:10.4103/JLP.JLP_94_17.
65. Pillet, S.; Roblin, X.; Cornillon, J.; Mariat, C.; Pozzetto, B. Quantification of cytomegalovirus viral load. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2014**, *12*, 193–210, doi:10.1586/14787210.2014.870887.
66. Tandon, P.; James, P.; Cordeiro, E.; Mallick, R.; Shukla, T.; McCurdy, J.D. Diagnostic Accuracy of Blood-Based Tests and Histopathology for Cytomegalovirus Reactivation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2017**, *23*, 551–560, doi:10.1097/MIB.0000000000001073.
67. Rahier, J.F.; Magro, F.; Abreu, C.; Armuzzi, A.; Ben-Horin, S.; Chowers, Y.; Cottone, M.; de Ridder, L.; Doherty, G.; Ehehalt, R.; et al. Second European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis* **2014**, *8*, 443–468, doi:10.1016/j.crohns.2013.12.013.
68. Lamb, C.A.; Kennedy, N.A.; Raine, T.; Hendy, P.A.; Smith, P.J.; Limdi, J.K.; Hayee, B.; Lomer, M.C.E.; Parkes, G.C.; Selinger, C.; et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* **2019**, *68*, s1–s106, doi:10.1136/gutjnl-2019-318484.
69. Johnson, J.; Affolter, K.; Boynton, K.; Chen, X.; Valentine, J.; Peterson, K. CMV Disease in IBD: Comparison of Diagnostic Tests and Correlation with Disease Outcome. *Inflamm. Bowel Dis.* **2018**, *24*, 1539–1546, doi:10.1093/ibd/izy045.
70. Oh, S.J.; Lee, C.K.; Kim, Y.-W.; Jeong, S.J.; Park, Y.M.; Oh, C.H.; Kim, J.-W.; Kim, H.J. True cytomegalovirus colitis is a poor prognostic indicator in patients with ulcerative colitis flares: the 10-year experience of an academic referral inflammatory bowel disease center. *Scand. J. Gastroenterol.* **2019**, *54*, 976–983, doi:10.1080/00365521.2019.1646798.

71. Tandon, P.; James, P.; Cordeiro, E.; Mallick, R.; Shukla, T.; McCurdy, J.D. Diagnostic Accuracy of Blood-Based Tests and Histopathology for Cytomegalovirus Reactivation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2017**, *23*, 551–560, doi:10.1097/MIB.0000000000001073.
72. Tandon, P.; McCurdy, J.D.; Smyrk, T.C. Is Standard Histology Sufficient to Detect Cytomegalovirus Reactivation in Inflammatory Bowel Disease? *Am. J. Clin. Pathol.* **2017**, *148*, 459–460, doi:10.1093/ajcp/aqx045.
73. Nguyen, M.; Bradford, K.; Zhang, X.; Shih, D.Q. Cytomegalovirus Reactivation in Ulcerative Colitis Patients. *Ulcers* **2011**, *2011*, doi:10.1155/2011/282507.
74. Zidar, N.; Ferkolj, I.; Tepeš, K.; Štabuc, B.; Kojc, N.; Uršič, T.; Petrovec, M. Diagnosing cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease—by immunohistochemistry or polymerase chain reaction? *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **2015**, *466*, 533–539, doi:10.1007/s00428-015-1741-8.
75. McCoy, M.H.; Post, K.; Sen, J.D.; Chang, H.Y.; Zhao, Z.; Fan, R.; Chen, S.; Leland, D.; Cheng, L.; Lin, J. qPCR increases sensitivity to detect cytomegalovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of gastrointestinal biopsies. *Hum. Pathol.* **2014**, *45*, 48–53, doi:10.1016/j.humpath.2013.07.040.
76. Burston, J.; van Hal, S.; Dubedat, S.; Lee, A. Inclusions or bystanders? CMV PCR sensitivity and specificity in tissue samples. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **2017**, *90*, 38–39, doi:10.1016/j.jcv.2017.03.008.
77. Suárez-Lledó, M.; Marcos, M.Á.; Cuatrecasas, M.; Bombi, J.A.; Fernández-Avilés, F.; Magnano, L.; Martínez-Cibrián, N.; Llobet, N.; Rosiñol, L.; Gutiérrez-García, G.; et al. Quantitative PCR Is Faster, More Objective, and More Reliable Than Immunohistochemistry for the Diagnosis of Cytomegalovirus Gastrointestinal Disease in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **2019**, *25*, 2281–2286, doi:10.1016/j.bbmt.2019.07.016.
78. Nakase, H.; Yoshino, T.; Matumura, K.; Honzawa, Y.; Yamamoto, S.; Matsuura, M.; Chiba, T. Positive finding of colonic polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA is not false positive but a warning for treating patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm. Bowel Dis.* **2011**, *17*, E13–14, doi:10.1002/ibd.21401.
79. Jones, A.; McCurdy, J.D.; Loftus, E.V.; Bruining, D.H.; Enders, F.T.; Killian, J.M.; Smyrk, T.C. Effects of antiviral therapy for patients with inflammatory bowel disease and a positive intestinal biopsy for cytomegalovirus. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2015**, *13*, 949–955, doi:10.1016/j.cgh.2014.09.042.
80. Ciccocioppo, R.; Racca, F.; Paolucci, S.; Campanini, G.; Pozzi, L.; Betti, E.; Riboni, R.; Vanoli, A.; Baldanti, F.; Corazza, G.R. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in inflammatory bowel disease: need for mucosal viral load measurement. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 1915–1926, doi:10.3748/wjg.v21.i6.1915.
81. Pillet, S.; Williet, N.; Pouvaret, A.; Del Tedesco, E.; Saint-Sardos, P.; Pozzetto, B.; Roblin, X. Distribution of Cytomegalovirus DNA Load in the Inflamed Colon of Ulcerative Colitis Patients. *Am. J. Gastroenterol.* **2016**, *111*, 439–441, doi:10.1038/ajg.2016.27.
82. Kambham, N.; Vij, R.; Cartwright, C.A.; Longacre, T. Cytomegalovirus infection in steroid-refractory ulcerative colitis: a case-control study. *Am. J. Surg. Pathol.* **2004**, *28*, 365–373.
83. Domènech, E.; Vega, R.; Ojanguren, I.; Hernández, A.; Garcia-Planella, E.; Bernal, I.; Rosinach, M.; Boix, J.; Cabré, E.; Gassull, M.A. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis: a prospective, comparative study on prevalence and diagnostic strategy. *Inflamm. Bowel Dis.* **2008**, *14*, 1373–1379, doi:10.1002/ibd.20498.
84. Al-Zafiri, R.; Gologan, A.; Galiatsatos, P.; Szilagyi, A. Cytomegalovirus complicating inflammatory bowel disease: a 10-year experience in a community-based, university-affiliated hospital. *Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *8*, 230–239.
85. Maconi, G.; Lombardini, M.; Furfaro, F.; Bezzio, C.; Zerbi, P.; Ardizzone, S. Long-term outcome of inflammatory bowel diseases with cytomegalovirus colitis: effect of antiviral treatment. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *26*, 1146–1151, doi:10.1097/MEG.000000000000175.
86. Zagórowicz, E.; Bugajski, M.; Wieszczy, P.; Pietrzak, A.; Magdziak, A.; Mróz, A. Cytomegalovirus Infection in Ulcerative Colitis is Related to Severe Inflammation and a High Count of Cytomegalovirus-positive Cells in Biopsy Is a Risk Factor for Colectomy. *J. Crohns Colitis* **2016**, *10*, 1205–1211, doi:10.1093/ecco-jcc/jjw071.
87. Clos-Parals, A.; Rodríguez-Martínez, P.; Cañete, F.; Mañosa, M.; Ruiz-Cerulla, A.; Paúles, M.J.; Llaó, J.; Gordillo, J.; Fumagalli, C.; Garcia-Planella, E.; et al. Prognostic value of the burden of cytomegalovirus colonic reactivation evaluated by immunohistochemical staining in patients with active ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis* **2018**, doi:10.1093/ecco-jcc/jjy173.
88. Yoshino, T.; Nakase, H.; Ueno, S.; Uza, N.; Inoue, S.; Mikami, S.; Matsuura, M.; Ohmori, K.; Sakurai, T.; Nagayama, S.; et al. Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm. Bowel Dis.* **2007**, *13*, 1516–1521, doi:10.1002/ibd.20253.
89. Tsuchido, Y.; Nagao, M.; Matsuura, M.; Nakano, S.; Yamamoto, M.; Matsumura, Y.; Seno, H.; Ichiyama, S. Real-time quantitative PCR analysis of endoscopic biopsies for diagnosing CMV gastrointestinal disease in non-HIV immunocompromised patients: a diagnostic accuracy study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **2018**, *37*, 2389–2396, doi:10.1007/s10096-018-3387-3.
90. McCurdy, J.D.; Enders, F.T.; Jones, A.; Killian, J.M.; Loftus, E.V.; Bruining, D.H.; Smyrk, T.C. Detection of Cytomegalovirus in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Where to Biopsy and How Many Biopsies? *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 2833–2838, doi:10.1097/MIB.0000000000000556.
91. Lee, H.-S.; Park, S.H.; Kim, S.-H.; Kim, J.; Choi, J.; Lee, H.J.; Kim, W.S.; Lee, J.-M.; Kwak, M.S.; Hwang, S.W.; et al. Risk Factors and Clinical Outcomes Associated with Cytomegalovirus Colitis in Patients with Acute Severe Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2016**, *22*, 912–918, doi:10.1097/MIB.0000000000000675.
92. Hirayama, Y.; Ando, T.; Hirooka, Y.; Watanabe, O.; Miyahara, R.; Nakamura, M.; Yamamura, T.; Goto, H. Characteristic endoscopic findings and risk factors for cytomegalovirus-associated colitis in patients with active ulcerative colitis. *World J. Gastrointest. Endosc.* **2016**, *8*, 301–309, doi:10.4253/wjge.v8.i6.301.
93. Yang, H.; Zhou, W.; Lv, H.; Wu, D.; Feng, Y.; Shu, H.; Jin, M.; Hu, L.; Wang, Q.; Wu, D.; et al. The Association Between CMV Viremia or Endoscopic Features and Histopathological Characteristics of CMV Colitis in Patients with Underlying Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2017**, *23*, 814–821, doi:10.1097/MIB.0000000000001095.

94. Jung, K.H.; Kim, J.; Lee, H.-S.; Choi, J.; Jang, S.J.; Jung, J.; Kim, M.J.; Chong, Y.P.; Lee, S.-O.; Choi, S.-H.; et al. Clinical Implications of the CMV-Specific T-Cell Response and Local or Systemic CMV Viral Replication in Patients With Moderate to Severe Ulcerative Colitis. *Open Forum Infect. Dis.* **2019**, *6*, ofz526, doi:10.1093/ofid/ofz526.
95. Kim, S.-H.; Lee, H.-S.; Lee, H.-J.; Kim, S.-M.; Shin, S.; Park, S.-H.; Kim, K.-J.; Kim, Y.-H.; Sung, H.; Lee, S.-O.; et al. Clinical applications of interferon- γ releasing assays for cytomegalovirus to differentiate cytomegalovirus disease from bystander activation: a pilot proof-of-concept study. *Korean J. Intern. Med.* **2017**, *32*, 900–909, doi:10.3904/kjim.2015.354.
96. Tarasewicz, A.; Dębska-Ślizień, A.; Rutkowski, B. Clinical Utility of QuantiFERON-Cytomegalovirus Test in Management of Kidney Transplant Recipients. *Transplant. Proc.* **2016**, *48*, 1650–1653, doi:10.1016/j.transproceed.2016.01.046.
97. Yong, M.K.; Cameron, P.U.; Slavin, M.; Morrissey, C.O.; Bergin, K.; Spencer, A.; Ritchie, D.; Cheng, A.C.; Samri, A.; Carcelain, G.; et al. Identifying Cytomegalovirus Complications Using the Quantiferon-CMV Assay After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 1684–1694, doi:10.1093/infdis/jix192.
98. Schroeder, K.W.; Tremaine, W.J.; Ilstrup, D.M. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *317*, 1625–1629, doi:10.1056/NEJM198712243172603.
99. Mohammed Vashist, N.; Samaan, M.; Mosli, M.H.; Parker, C.E.; MacDonald, J.K.; Nelson, S.A.; Zou, G.Y.; Feagan, B.G.; Khanna, R.; Jairath, V. Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *1*, CD011450, doi:10.1002/14651858.CD011450.pub2.
100. Nakase, H.; Honzawa, Y.; Toyonaga, T.; Yamada, S.; Minami, N.; Yoshino, T.; Matsuura, M. Diagnosis and treatment of ulcerative colitis with cytomegalovirus infection: importance of controlling mucosal inflammation to prevent cytomegalovirus reactivation. *Intest. Res.* **2014**, *12*, 5–11, doi:10.5217/ir.2014.12.1.5.
101. Gauss, A.; Rosenstiel, S.; Schnitzler, P.; Hinz, U.; Rehlen, T.; Kadmon, M.; Ehehalt, R.; Stremmel, W.; Zawierucha, A. Intestinal cytomegalovirus infection in patients hospitalized for exacerbation of inflammatory bowel disease: a 10-year tertiary referral center experience. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *27*, 712–720, doi:10.1097/MEG.0000000000000361.
102. Shukla, T.; Singh, S.; Tandon, P.; McCurdy, J.D. Corticosteroids and Thiopurines, But Not Tumor Necrosis Factor Antagonists, are Associated With Cytomegalovirus Reactivation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Gastroenterol.* **2016**, doi:10.1097/MCG.0000000000000758.
103. Inoue-Toyoda, M.; Kato, K.; Nagata, K.; Yoshikawa, H. Glucocorticoids facilitate the transcription from the human cytomegalovirus major immediate early promoter in glucocorticoid receptor- and nuclear factor- κ B-like protein-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *458*, 180–185, doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.091.
104. Van Damme, E.; Sauviller, S.; Lau, B.; Kesteleyn, B.; Griffiths, P.; Burroughs, A.; Emery, V.; Sinclair, J.; Van Loock, M. Glucocorticosteroids trigger reactivation of human cytomegalovirus from latently infected myeloid cells and increase the risk for HCMV infection in D+R+ liver transplant patients. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 131–143, doi:10.1099/vir.0.069872-0.
105. Wang, S.; Dou, Y.; Yang, H.; Ni, A.; Zhang, R.; Qian, J. Alteration of glucocorticoid receptors and exacerbation of inflammation during lytic cytomegalovirus infection in THP-1 cells. *FEBS Open Bio* **2017**, *7*, 1924–1931, doi:10.1002/2211-5463.12334.
106. Minami, M.; Ohta, M.; Ohkura, T.; Ando, T.; Ohmiya, N.; Niwa, Y.; Goto, H. Cytomegalovirus infection in severe ulcerative colitis patients undergoing continuous intravenous cyclosporine treatment in Japan. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 754–760.
107. Pillet, S.; Jarlot, C.; Courault, M.; Del Tedesco, E.; Chardon, R.; Saint-Sardos, P.; Presles, E.; Phelip, J.-M.; Berthelot, P.; Pozzetto, B.; et al. Infliximab Does Not Worsen Outcomes During Flare-ups Associated with Cytomegalovirus Infection in Patients with Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 1580–1586, doi:10.1097/MIB.0000000000000412.
108. McCurdy, J.D.; Jones, A.; Enders, F.T.; Killian, J.M.; Loftus, E.V.; Smyrk, T.C.; Bruining, D.H. A model for identifying cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2015**, *13*, 131–137; quiz e7, doi:10.1016/j.cgh.2014.05.026.
109. Nakase, H.; Honzawa, Y.; Toyonaga, T.; Yamada, S.; Minami, N.; Yoshino, T.; Matsuura, M. Diagnosis and treatment of ulcerative colitis with cytomegalovirus infection: importance of controlling mucosal inflammation to prevent cytomegalovirus reactivation. *Intest. Res.* **2014**, *12*, 5–11, doi:10.5217/ir.2014.12.1.5.
110. Bonfanti, E.; Bracco, C.; Biancheri, P.; Falcetta, A.; Martini, M.B.; Melchio, R.; Fenoglio, L. Fever During Anti-integrin Therapy: New Immunodeficiency. *Eur. J. Case Rep. Intern. Med.* **2020**, *7*, 001288, doi:10.12890/2020_001288.
111. Hommel, C.; Pillet, S.; Rahier, J.-F. Comment on: “Resolution of CMV Infection in the Bowel on Vedolizumab Therapy.” *J. Crohns Colitis* **2019**, doi:10.1093/ecco-jcc/jjz108.
112. Rawa-Gołębiewska, A.; Lenarcik, M.; Zagórowicz, E. Resolution of CMV Infection in the Bowel on Vedolizumab Therapy. *J. Crohns Colitis* **2019**, *13*, 1234–1235, doi:10.1093/ecco-jcc/jjz033.
113. Sandborn, W.J.; Panés, J.; D’Haens, G.R.; Sands, B.E.; Su, C.; Moscariello, M.; Jones, T.; Pedersen, R.; Friedman, G.S.; Lawendy, N.; et al. Safety of Tofacitinib for Treatment of Ulcerative Colitis, Based on 4.4 Years of Data From Global Clinical Trials. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **2019**, *17*, 1541–1550, doi:10.1016/j.cgh.2018.11.035.
114. Egli, A.; Kumar, D.; Broscheit, C.; O’Shea, D.; Humar, A. Comparison of the Effect of Standard and Novel Immunosuppressive Drugs on CMV-Specific T-Cell Cytokine Profiling. *Transplantation* **2013**, *95*, 448–455, doi:10.1097/TP.0b013e318276a19f.
115. Weinhold, K.J.; Bukowski, J.F.; Brennan, T.V.; Noveck, R.J.; Staats, J.S.; Lin, L.; Stempora, L.; Hammond, C.; Wouters, A.; Mojcik, C.F.; et al. Reversibility of peripheral blood leukocyte phenotypic and functional changes after exposure to and withdrawal from tofacitinib, a Janus kinase inhibitor, in healthy volunteers. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **2018**, *191*, 10–20, doi:10.1016/j.clim.2018.03.002.
116. Amiot, A.; Grimaud, J.-C.; Peyrin-Biroulet, L.; Filippi, J.; Pariente, B.; Roblin, X.; Buisson, A.; Stefanescu, C.; Trang-Poisson, C.; Altwegg, R.; et al. Effectiveness and Safety of Vedolizumab Induction Therapy for Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, doi:10.1016/j.cgh.2016.02.016.
117. Wada, Y.; Matsui, T.; Mataka, H.; Sakurai, T.; Yamamoto, J.; Kikuchi, Y.; Yorioka, M.; Tsuda, S.; Yao, T.; Yao, S.; et al. Intractable ulcerative colitis caused by cytomegalovirus infection: a prospective study on prevalence, diagnosis, and treatment. *Dis. Colon Rectum* **2003**, *46*, S59–65, doi:10.1097/01.DCR.0000087486.21981.C6.

118. Kim, J.J.; Simpson, N.; Klipfel, N.; Debose, R.; Barr, N.; Laine, L. Cytomegalovirus infection in patients with active inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **2010**, *55*, 1059–1065, doi:10.1007/s10620-010-1126-4.
119. Suzuki, H.; Kato, J.; Kuriyama, M.; Hiraoka, S.; Kuwaki, K.; Yamamoto, K. Specific endoscopic features of ulcerative colitis complicated by cytomegalovirus infection. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 1245–1251.
120. Inokuchi, T.; Kato, J.; Hiraoka, S.; Suzuki, H.; Nakarai, A.; Hirakawa, T.; Akita, M.; Takahashi, S.; Harada, K.; Okada, H.; et al. Long-term follow-up of ulcerative colitis patients treated on the basis of their cytomegalovirus antigen status. *World J. Gastroenterol. WJG* **2014**, *20*, 509–517, doi:10.3748/wjg.v20.i2.509.
121. Kim, Y.S.; Kim, Y.-H.; Kim, J.S.; Jeong, S.Y.; Park, S.J.; Cheon, J.H.; Ye, B.D.; Jung, S.-A.; Park, Y.S.; Choi, C.H.; et al. Long-term outcomes of cytomegalovirus reactivation in patients with moderate to severe ulcerative colitis: a multicenter study. *Gut Liver* **2014**, *8*, 643–647, doi:10.5009/gnl13427.
122. Matsumoto, S.; Yoshida, Y. What are the factors that affect hospitalization and surgery for aggravation of ulcerative colitis? *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *26*, 282–287, doi:10.1097/MEG.0000000000000028.
123. Okahara, K.; Nagata, N.; Shimada, T.; Joya, A.; Hayashida, T.; Gatanaga, H.; Oka, S.; Sakurai, T.; Uemura, N.; Akiyama, J. Colonic cytomegalovirus detection by mucosal PCR and antiviral therapy in ulcerative colitis. *PLoS One* **2017**, *12*, e0183951, doi:10.1371/journal.pone.0183951.
124. Kishore, J.; Ghoshal, U.; Ghoshal, U.C.; Krishnani, N.; Kumar, S.; Singh, M.; Ayyagari, A. Infection with cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease: prevalence, clinical significance and outcome. *J. Med. Microbiol.* **2004**, *53*, 1155–1160.
125. Maconi, G.; Colombo, E.; Zerbi, P.; Sampietro, G.M.; Fociani, P.; Bosani, M.; Cassinotti, A.; Casini, V.; Russo, A.; Ardizzone, S.; et al. Prevalence, detection rate and outcome of cytomegalovirus infection in ulcerative colitis patients requiring colonic resection. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **2005**, *37*, 418–423, doi:10.1016/j.dld.2005.01.011.
126. Kojima, T.; Watanabe, T.; Hata, K.; Shinozaki, M.; Yokoyama, T.; Nagawa, H. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **2006**, *41*, 706–711, doi:10.1080/00365520500408584.
127. Kuwabara, A.; Okamoto, H.; Suda, T.; Ajioka, Y.; Hatakeyama, K. Clinicopathologic characteristics of clinically relevant cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* **2007**, *42*, 823–829, doi:10.1007/s00535-007-2103-3.
128. Minami, M.; Ohta, M.; Ohkura, T.; Ando, T.; Ohmiya, N.; Niwa, Y.; Goto, H. Cytomegalovirus infection in severe ulcerative colitis patients undergoing continuous intravenous cyclosporine treatment in Japan. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 754–760.
129. Yoshino, T.; Nakase, H.; Matsuura, M. Letter: Mucosal PCR for cytomegalovirus in refractory ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *36*, 811–812; author reply 812, doi:10.1111/apt.12009.
130. Kopylov, U.; Sasson, G.; Geysheis, B.; Oikawa, M.T.; Barshack, I.; Eliakim, R.; Ben-Horin, S. Cytomegalovirus positive ulcerative colitis: A single center experience and literature review. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **2013**, *4*, 18–23, doi:10.4291/wjgp.v4.i1.18.
131. Kim, J.W.; Boo, S.-J.; Ye, B.D.; Kim, C.L.; Yang, S.-K.; Kim, J.; Kim, S.A.; Park, S.H.; Park, S.-K.; Yang, D.-H.; et al. Clinical utility of cytomegalovirus antigenemia assay and blood cytomegalovirus DNA PCR for cytomegalovirus infection in ulcerative colitis patients with moderate to severe ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis* **2014**, *8*, 693–701, doi:10.1016/j.crohns.2013.12.014.
132. Olaisen, M.; Rydning, A.; Martinsen, T.C.; Nordrum, I.S.; Mjønes, P.; Fossmark, R. Cytomegalovirus infection and postoperative complications in patients with ulcerative colitis undergoing colectomy. *Scand. J. Gastroenterol.* **2014**, *49*, 845–852, doi:10.3109/00365521.2014.929172.
133. Minami, N.; Yoshino, T.; Matsuura, M.; Koshikawa, Y.; Yamada, S.; Toyonaga, T.; Madian, A.; Honzawa, Y.; Nakase, H. Tacrolimus or infliximab for severe ulcerative colitis: short-term and long-term data from a retrospective observational study. *BMJ Open Gastroenterol.* **2015**, e000021, doi:10.1136/bmjgast-2014-000021.
134. Schenk, W.; Klugmann, T.; Borkenhagen, A.; Klecker, C.; Dietel, P.; Kirschner, R.; Schneider, E.; Bruns, T.; Stallmach, A.; Teich, N. The detection of the cytomegalovirus DNA in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis is associated with increased long-term risk of proctocolectomy: results from an outpatient IBD clinic. *Int. J. Colorectal Dis.* **2019**, *34*, 393–400, doi:10.1007/s00384-018-3210-8.
135. Maher, M.M.; Nassar, M.I. Acute cytomegalovirus infection is a risk factor in refractory and complicated inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **2009**, *54*, 2456–2462, doi:10.1007/s10620-008-0639-6.
136. Kim, Y.S.; Kim, Y.-H.; Kim, J.S.; Cheon, J.H.; Ye, B.D.; Jung, S.-A.; Park, Y.S.; Choi, C.H.; Jang, B.I.; Han, D.S.; et al. The prevalence and efficacy of ganciclovir on steroid-refractory ulcerative colitis with cytomegalovirus infection: a prospective multicenter study. *J. Clin. Gastroenterol.* **2012**, *46*, 51–56, doi:10.1097/MCG.0b013e3182160c9c.
137. Iida, T.; Ikeya, K.; Watanabe, F.; Abe, J.; Maruyama, Y.; Ohata, A.; Teruyuki, S.; Sugimoto, K.; Hanai, H. Looking for endoscopic features of cytomegalovirus colitis: a study of 187 patients with active ulcerative colitis, positive and negative for cytomegalovirus. *Inflamm. Bowel Dis.* **2013**, *19*, 1156–1163, doi:10.1097/MIB.0b013e31828075ce.
138. Chun, J.; Lee, C.; Kwon, J.-E.; Hwang, S.W.; Kim, S.G.; Kim, J.S.; Jung, H.C.; Im, J.P. Usefulness of the cytomegalovirus antigenemia assay in patients with ulcerative colitis. *Intest. Res.* **2015**, *13*, 50–59, doi:10.5217/ir.2015.13.1.50.
139. Ormeci, A.C.; Akyuz, F.; Baran, B.; Soyer, O.M.; Gokturk, S.; Onel, M.; Onel, D.; Agacfidan, A.; Demirci, M.; Yegen, G.; et al. Steroid-refractory inflammatory bowel disease is a risk factor for CMV infection. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2016**, *20*, 858–865.
140. Hissong, E.; Chen, Z.; Yantiss, R.K. Cytomegalovirus reactivation in inflammatory bowel disease: an uncommon occurrence related to corticosteroid dependence. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **2019**, *32*, 1210–1216, doi:10.1038/s41379-019-0258-0.
141. McCurdy, J.D.; Enders, F.T.; Khanna, S.; Bruining, D.H.; Jones, A.; Killian, J.M.; Tariq, R.; Smyrk, T.C.; Loftus, E.V. Increased Rates of Clostridium difficile Infection and Poor Outcomes in Patients with IBD with Cytomegalovirus. *Inflamm. Bowel Dis.* **2016**, *22*, 2688–2693, doi:10.1097/MIB.0000000000000939.
142. Xu, H.; Tang, H.; Xu, T.; Xiao, M.; Li, J.; Tan, B.; Yang, H.; Lv, H.; Li, Y.; Qian, J. Retrospective analysis of Clostridium difficile infection in patients with ulcerative colitis in a tertiary hospital in China. *BMC Gastroenterol.* **2019**, *19*, 3, doi:10.1186/s12876-018-0920-x.
143. Li, Y.; Xu, H.; Xu, T.; Xiao, M.; Tang, H.; Wu, D.; Tan, B.; Li, J.; Yang, H.; Lv, H.; et al. Case-Control Study of Inflammatory Bowel Disease Patients with and without Clostridium difficile Infection and Poor Outcomes in Patients Coinfected with C. difficile and Cytomegalovirus. *Dig. Dis. Sci.* **2018**, *63*, 3074–3083, doi:10.1007/s10620-018-5230-1.

144. Grossberg, L.B.; Ezaz, G.; Grunwald, D.; Cohen, J.; Falchuk, K.R.; Feuerstein, J.D. A National Survey of the Prevalence and Impact of Cytomegalovirus Infection Among Hospitalized Patients With Ulcerative Colitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **2016**, doi:10.1097/MCG.0000000000000736.
145. Shukla, T.; Singh, S.; Loftus, E.V.; Bruining, D.H.; McCurdy, J.D. Antiviral Therapy in Steroid-refractory Ulcerative Colitis with Cytomegalovirus: Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 2718–2725, doi:10.1097/MIB.0000000000000489.
146. Ciccocioppo, R. Letter: cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2015**, *42*, 127–129, doi:10.1111/apt.13234.
147. Nakase, H.; Onodera, K. Targeting cytomegalovirus during ulcerative colitis flare-ups. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, 1–7, doi:10.1080/17474124.2016.1192461.
148. Henmi, Y.; Kakimoto, K.; Inoue, T.; Nakazawa, K.; Kubota, M.; Hara, A.; Mikami, T.; Naka, Y.; Hirata, Y.; Hirata, Y.; et al. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis assessed by quantitative polymerase chain reaction: risk factors and effects of immunosuppressants. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2018**, *63*, 246–251, doi:10.3164/jcfn.18-14.
149. Levin, A.; Yaari, S.; Stoff, R.; Caplan, O.; Wolf, D.G.; Israeli, E. Diagnosis of Cytomegalovirus Infection during Exacerbation of Ulcerative Colitis. *Digestion* **2017**, *96*, 142–148, doi:10.1159/000479865.
150. Beswick, L.; Ye, B.; van Langenberg, D.R. Toward an Algorithm for the Diagnosis and Management of CMV in Patients with Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2016**, *22*, 2966–2976, doi:10.1097/MIB.0000000000000958.
151. Ahmed, I.; Kassem, W.; Salam, Y.; Furnari, M.; Mehta, T. Outcome of Cytomegalovirus Colitis in Inflammatory Bowel Disease with Different Regimes of Ganciclovir. *Middle East J. Dig. Dis.* **2018**, *10*, 220–229, doi:10.15171/mejdd.2018.114.
152. Harbord, M.; Eliakim, R.; Bettenworth, D.; Karmiris, K.; Katsanos, K.; Kopylov, U.; Kucharzik, T.; Molnár, T.; Raine, T.; Sebastian, S.; et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *J. Crohns Colitis* **2017**, *11*, 769–784, doi:10.1093/ecco-jcc/jjx009.
153. Kopylov, U.; Papamichael, K.; Katsanos, K.; Waterman, M.; Bar-Gil Shitrit, A.; Boysen, T.; Portela, F.; Peixoto, A.; Szilagyi, A.; Silva, M.; et al. Impact of Infliximab and Cyclosporine on the Risk of Colectomy in Hospitalized Patients with Ulcerative Colitis Complicated by Cytomegalovirus-A Multicenter Retrospective Study. *Inflamm. Bowel Dis.* **2017**, doi:10.1097/MIB.0000000000001160.
154. Roblin, X.; Pillet, S.; Oussalah, A.; Berthelot, P.; Del Tedesco, E.; Phelip, J.-M.; Chambonnière, M.-L.; Garraud, O.; Peyrin-Biroulet, L.; Pozzetto, B. Cytomegalovirus load in inflamed intestinal tissue is predictive of resistance to immunosuppressive therapy in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2011**, *106*, 2001–2008, doi:10.1038/ajg.2011.202.
155. Hommel, C.; Roblin, X.; Bricchet, L.; Bihin, B.; Pillet, S.; Rahier, J.-F. P579 Risk of CMV reactivation in UC patients with previous history of CMV infection following infliximab or vedolizumab treatments. *J. Crohns Colitis* **2018**, *12*, S400–S400, doi:10.1093/ecco-jcc/jjx180.706.
156. Sands, B.E.; Sandborn, W.J.; Panaccione, R.; O'Brien, C.D.; Zhang, H.; Johans, J.; Adedokun, O.J.; Li, K.; Peyrin-Biroulet, L.; Van Assche, G.; et al. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1201–1214, doi:10.1056/NEJMoa1900750.
157. Sands, B.E.; Sandborn, W.J.; Feagan, B.; Löfberg, R.; Hibi, T.; Wang, T.; Gustofson, L.-M.; Wong, C.J.; Vandervoort, M.K.; Hanauer, S.; et al. A randomized, double-blind, sham-controlled study of granulocyte/monocyte apheresis for active ulcerative colitis. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 400–409, doi:10.1053/j.gastro.2008.04.023.
158. Yoshino, T.; Nakase, H.; Matsuura, M.; Matsumura, K.; Honzawa, Y.; Fukuchi, T.; Watanabe, K.; Murano, M.; Tsujikawa, T.; Fukunaga, K.; et al. Effect and safety of granulocyte-monocyte adsorption apheresis for patients with ulcerative colitis positive for cytomegalovirus in comparison with immunosuppressants. *Digestion* **2011**, *84*, 3–9, doi:10.1159/000321911.
159. Fukuchi, T.; Nakase, H.; Matsuura, M.; Yoshino, T.; Toyonaga, T.; Ohmori, K.; Ubukata, S.; Ueda, A.; Eguchi, T.; Yamashita, H.; et al. Effect of intensive granulocyte and monocyte adsorptive apheresis in patients with ulcerative colitis positive for cytomegalovirus. *J. Crohns Colitis* **2013**, *7*, 803–811, doi:10.1016/j.crohns.2012.12.003.
160. Bonnaud, G.; Haennig, A.; Levy, J.; Sigur, N.; Ledit, A.; Cabarrot, P.; Faure, P.; Auzimour, C.; El Atmani, A.; Hebuterne, X.; et al. Implementation of the French national consensus for the management of ulcerative colitis into clinical practice. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **2016**, *48*, 1405–1409, doi:10.1016/j.dld.2016.08.127.
161. Whaley, K.G.; Rosen, M.J. Contemporary Medical Management of Acute Severe Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2019**, *25*, 56–66, doi:10.1093/ibd/izy208.
162. Hosomi, S.; Watanabe, K.; Nishida, Y.; Yamagami, H.; Yukawa, T.; Otani, K.; Nagami, Y.; Tanaka, F.; Taira, K.; Kamata, N.; et al. Combined Infection of Human Herpes Viruses: A Risk Factor for Subsequent Colectomy in Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2018**, *24*, 1307–1315, doi:10.1093/ibd/izy005.
163. Norman, J.M.; Handley, S.A.; Baldrige, M.T.; Droit, L.; Liu, C.Y.; Keller, B.C.; Kambal, A.; Monaco, C.L.; Zhao, G.; Fleshner, P.; et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* **2015**, *160*, 447–460, doi:10.1016/j.cell.2015.01.002.

Author contributions:

A.J. and S.Pi. designed the review, generated the figures, drafted the text and wrote the manuscript. B.P. designed the review and wrote the manuscript. P.V., X.R. and S.Pa. reviewed the manuscript and contributed to the final version of the manuscript. All authors listed have made direct and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest

TRAVAUX PERSONNELS

L'ensemble des résultats se compose de 3 parties correspondant aux 3 axes de recherche comprenant « la modélisation *in vitro* de l'infection à HCMV dans le tissu intestinal », « la modélisation *in vivo* de l'infection à CMV dans la RCH : modèle murin de la colite induite par le DSS » et « l'étude des facteurs prédictifs de la réactivation colique de HCMV chez les patients atteints de RCH en poussée ». Ces parties sont composées chacune d'une structure identique avec des sous parties détaillées : « Rationnel et objectifs », « Matériels et Méthodes », « Résultats » et « Discussion ».

Modélisation *in vitro* de l'infection du tissu intestinal par le HCMV

I. Rationnel et objectifs

L'objectif des expérimentations *in vitro* était de produire des virions de HCMV à partir d'une souche virale permettant d'infecter une lignée cellulaire épithéliale intestinale « Caco-2 » afin de modaliser l'infection de HCMV au niveau de l'épithélium intestinal.

Plusieurs souches virales de HCMV ont été isolées et séquencées parmi lesquelles les souches Toledo, AD169 et Towne qui ont subi des mutations suite à leurs passages répétés *in vitro* (Gugliesi et al. 2020). Les mutations des souches de laboratoire largement utilisées comme les souches AD169, Towne et Toledo sont localisées dans la région *UL/b'* du génome, codant pour des protéines virales ayant des fonctions immunomodulatrices ou participant à l'évasion immunologique. Par exemple, les souches AD169 et Towne ont acquis de grandes délétions (respectivement 15 kb et 13 kb) dans la région *UL/b'* en plus d'autres mutations ce qui les rend incapables de réplication virale dans les cellules épithéliales (Bradley et al. 2009, 169; Prichard et al. 2001; Ryckman et al. 2008). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la région *UL/b'* code pour une chimiokine virale CXCL (*UL146*) (Lüttichau 2010), une protéine régulant les voies de mort cellulaire (*UL141*) (W. Smith et al. 2013), une protéine d'évasion des cellules NK (*UL142*) (Ashiru et al. 2009), une protéine régulatrice de la latence virale (*UL138*) (Goodrum et al. 2007). Ainsi, ces gènes jouent un rôle crucial dans la réplication virale *in vivo* (Cha et al. 1996). Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, 351 souches de HCMV ont été publiées dans la littérature avec un séquençage hautement polymorphe et une variabilité intra-individuelle élevée (Gugliesi et al. 2020). Ainsi, ces mutations peuvent influencer le

tropisme cellulaire de HCMV, l'évasion immunitaire et avoir des conséquences sur la pathogenèse de HCMV. Notre projet étant de modéliser l'infection des cellules épithéliales intestinales Caco-2, des mutations dans les régions UL128,130 et131 qui permettent l'entrée de HCMV dans les leucocytes, les cellules endothéliales et épithéliales (Hahn et al. 2004; D. Wang et Shenk 2005) compromettraient les expérimentations. Le choix de la souche s'est donc porté sur la souche Merlin, une souche de HCMV obtenue à partir des urines d'un nourrisson après une infection congénitale et qui a été séquencée à partir de seulement 3 passages *in vitro* dans des fibroblastes (Dolan et al. 2004). Ainsi cette souche ne souffre pas de grande délétion ni de mutations acquises lors de nombreux passages *in vitro*. Les travaux du Dr Richard Stanton ont permis la construction d'un *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) contenant le génome complet de la souche Merlin de HCMV, dans lequel des mutations dans les régions *UL128* et *RL13* ont été identifiées et réparées. Son équipe a montré que l'expression de *RL13* altère la réplication du HCMV dans les cultures de fibroblastes et de cellules épithéliales. Ainsi, lorsque des virus générés à partir de BAC contenant le gène *WT RL13* ont été passés *in vitro*, d'autres mutants ont émergé rapidement. *RL13* code une protéine hautement glycosylée située sur l'enveloppe du virion ; l'équipe du Dr Stanton a modulé l'expression de *RL13* afin d'éviter de nouvelles dérives génétiques (Stanton et al. 2010). Ce BAC contenant le génome de HCMV modifié pouvant être utilisé pour la production *in vitro* et l'infection des cellules fibroblastiques et épithéliales nous a été donné par le Dr Richard Stanton (Université de Cardiff, Royaume-Uni).

Les travaux du Dr Esclatine ont déjà montré que les cellules épithéliales intestinales, les cellules fibroblastiques et endothéliales peuvent être infectées par HCMV chez des patients atteints de MICI (Al-Zafiri et al. 2012). Quelques études ont montré que HCMV est capable d'infecter les cellules intestinales Caco-2 par voie basolatérale avec des souches de laboratoires à niveaux de *Multiplicity of infection* (MOI) élevées (Jarvis et al. 1999; Esclatine et al. 2000; 2001). Ces modèles utilisent les souches de HCMV Towne (Jarvis et al. 1999) avec une MOI = 25 ou la souche AD169 avec une MOI = 1 (Esclatine et al. 2000). De plus, la propagation virale de cellule en cellule semble impossible dans ce modèle du fait de la production de nucléocapsides virales mais de l'absence de production de virions infectants (Esclatine et al. 2000).

Dans ce contexte, nous avons choisi d'utiliser le BAC-HCMV de Richard Stanton pour produire des particules de HCMV au tropisme préservé afin d'infecter un modèle de cellules Caco-2 cultivées sur insert pour mimer un modèle simple de monocouche intestinale (Rochereau et al. 2013). Ce modèle pourrait servir à étudier la production de cytokines inflammatoires induites par le virus et le développement thérapeutique de nouveaux

antiviraux potentiellement administrables aux patients atteints de RCH déclarant une colite à HCMV.

II. Matériels et Méthodes

II.1. Lignée cellulaire HFFF

Les cellules *human fetal foreskin fibroblasts* (HFFF) (Figure 25) sont issues d'une lignée fibroblastique humaine immortalisée par l'introduction du *human telomerase reverse transcriptase gene* (hTERT) restaurant l'activité de la télomérase, induisant l'extension des télomères et permettant aux cellules d'éviter la sénescence et de proliférer indéfiniment (McSharry et al. 2001; Stanton et al. 2010). Cette lignée est permissive au HCMV et permet sa titration ainsi que son amplification *in vitro* (Stanton et al. 2010). Les cellules HFFF nous ont été fournies par le Dr Richard Stanton de l'Université de Cardiff. Cette lignée cellulaire adhérente a été cultivée dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose (Sigma-Aldrich) auquel sont ajoutés 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (CVFSVF00-01 Eurobio) et 1% d'une solution d'antibiotique (A5955-100mL Sigma-Aldrich à 10 000 U/mL de pénicilline et à 10 mg/mL de streptomycine) dans une étuve à 37°C à 5% de CO₂. L'entretien des HFFF se fait par trypsination (trypsine T39-24-100ml Sigma-Aldrich) une fois par semaine avec remise en culture au 8^{ième} en flasque Falcon® (353136 BD) avant une centrifugation à 200 g afin d'éliminer la trypsine. Un changement de milieu est effectué tous les 2-3 jours.



Figure 25 : Cellules HFFF

Photographie observée en microscope optique des cellules HFFF avec un microscope Nikon, elipse Ti-S, intensilight C-HGfi, camera DS-Ri2 au grossissement x10)

II.2. Bacterial artificial Chromosome (BAC) HCMV

La construction d'un clone BAC contenant le génome complet de HCMV dérivé de la souche Merlin nous a également été fournie par le Dr Richard Stanton de l'université de Cardiff

(plasmide 1498) (Stanton et al. 2010). Son équipe a réparé les modifications des régions *RL13* et *UL128* dues aux dérives génétiques obtenues par de multiples passages dans les laboratoires afin de produire un BAC contenant le génome sauvage de HCMV. Ce plasmide comporte une séquence de résistance au chloramphénicol permettant l'expansion sélective des *Escherichia coli* transformées.

II.3. Production, extraction et purification du BAC-HCMV

Nous avons reçu des *Escherichia coli* transformés par le BAC-HCMV par l'équipe du Dr Richard Stanton. Les colonies des bactéries transformées sont multipliées en milieu LB (Luria-Bertani) avec 5 µg/mL de chloramphénicol à 32°C. Dans un premier temps, les bactéries sont déposées sur gélose puis en bouillon de culture 10 mL de LB contenant du chloramphénicol pendant 8h sous agitation jusqu'à obtenir une densité optique (DO) d'environ 0,5 ~ 0,6 McFarland. Cinq mL de ce bouillon sont transférés dans 500 mL de bouillon LB contenant du chloramphénicol et incubés durant la nuit jusqu'à obtenir une DO d'environ 0,5 ~ 0,6 McFarland.

L'extraction par lyse alcaline est effectuée à l'aide du Kit NucleoBond BAC100 MaxiPrep MACHEREY NAGEL (740579) en suivant la notice « BAC 100 NucléoBond extraction purification ». Le bouillon de culture est centrifugé à 6 000 g, à 4°C pendant 15 minutes afin de récupérer le culot bactérien. Les BAC-HCMV sont libérés des bactéries après une première lyse de celles-ci par l'ajout de 24 mL de tampon S1 contenant de la RNase A incubés à 37°C pendant 30 min. La lyse alcaline est effectuée en ajoutant 24 mL de tampon S2 puis neutralisée par 24mL de tampon S3 permettant la dénaturation de l'ADN bactérien mais la conservation du plasmide. Par la suite la colonne est équilibrée avec 6 mL de tampon N2 et les débris, ADN et ARN sont éliminés grâce à 2 passages de 18 mL de tampon N3. Finalement, le BAC-HCMV est élué avec 15 mL de tampon N5 pré-incubé à 50°C. L'ajout de 11 mL d'isopropanol et la centrifugation à 5 000 G pendant 30 minutes à 4°C permet l'isolation du BAC-HCMV dans le culot. Une 2^{ième} centrifugation pendant 10 min à 4°C dans 5 mL d'éthanol à 70% termine la purification des sels avant d'ajouter 100 µL de tampon Tris EDTA (TE) stérile à pH=8 après séchage doux du culot.

Le BAC-HCMV purifié est conservé à 4°C environ 1 mois (sans congélation délétère pour ce plasmide)

II.4. Transfection des cellules HFFF par le BAC-HCMV et purification

II.4.a. Transfection par LyoVec™

LyoVec™ (Invivogen) est une combinaison de lipide cationique composé de Di-tetradecylphosphoryl-N,N,N-trimethylmethanaminium chloride (DTCPTA) et de 1,2-

Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (DiPPE) utilisée comme un réactif de transfection. La charge positive permet de lier l'ADN, et la structure phospholipidique favorise la fusion avec les membranes cellulaires pour délivrer l'ADN à transfecter.

Les cellules HFFF sont trypsinées et incubées à 37°C avec 5% de CO₂ avec 5.10⁵ cellules dans une flasque T25. La transfection est effectuée lorsque les cellules sont entre 50% et 80% de confluence en suivant les recommandations du fournisseur. Pour 1 µg de BAC-HCMV, 100 µL de LyoVec™ sont ajoutés et mélangés. Une incubation de 15 min permet la formation des complexes phospholipides-ADN. Pendant la durée d'incubation de 5 à 10 min les cellules HFFF doivent être lavées au PBS. La préparation contenant l'agent transfectant et le BAC-HCMV est ajoutée aux cellules dans 2 mL de milieu. Après une incubation de 24h, les cellules doivent être rincées au PBS afin de minimiser la toxicité cellulaire de l'agent transfectant. Un changement de milieu de culture est nécessaire tous les 2 à 3 jours et une trypsination lorsque plusieurs plages de lyses apparaissent peut aider à disséminer le virus dans la flasque T25. Après 14 jours environ, les virions peuvent être purifiés par ultracentrifugation.

II.4.b. Transfection par Effectene® Transfection Reagent

Le réactif de transfection Effectene® (Qiagen) est une formulation lipidique formant des micelles utilisé comme réactif de transfection.

Les cellules HFFF sont trypsinées et incubées à 37°C avec 5% de CO₂ avec 5.10⁵ cellules dans une T25. La transfection est effectuée lorsque les cellules sont entre 50% et 80% de confluence en suivant les recommandations de Qiagen. Pour 1 µg de BAC-HCMV, 145 µL de Tampon EC sont ajoutés. Puis 8 µL de Enhancer sont ajoutés et incubés à température ambiante pendant 2 à 5 min ce qui permet de condenser l'ADN avant d'ajouter 25 µL d'Effectene et de vortexer 10 secondes. L'Effectene® crée des structures en micelle permettant la transfection des cellules HFFF. Pendant une durée d'incubation de 5 à 10 min, les cellules HFFF doivent être lavées au PBS. La préparation contenant l'agent transfectant et le BAC-HCMV est ajoutée aux cellules dans 2,5 mL de milieu. Après une incubation *overnight* à 37°C, les cellules doivent être rincées au PBS afin de minimiser la toxicité cellulaire de l'agent transfectant. Un changement de milieu de culture est nécessaire tous les 2 à 3 jours et une trypsination lorsque plusieurs plages de lyses apparaissent peut aider à disséminer le virus dans la flasque T25. Après 14 jours environ, les virions peuvent être purifiés par ultracentrifugation.

II.4.c. Transfection par Electroporation

L'électroporation a été effectuée grâce à l'électroporateur *Gene Pulser Xcell Electroporation Systems* (Biorad) en s'appuyant sur les guides d'utilisation et la littérature (White et al. 2004). Le milieu de culture de transfection utilisé lors de l'électroporation est du *Minimum Essential Medium* (MEM) (Sigma-Aldrich) auquel 100 mM d'Hepes sont ajoutés. Les cellules HFFF sont trypsinées, centrifugées et reprises dans 10 mL de milieu afin de les laver. Après une 2^{ème} centrifugation, 1.10^6 cellules HFFF sont mises dans des cuvettes stériles de 2 mm (*Gene Pulser/MicroPulser Electroporation Cuvettes*, 0.2 cm gap #1652082, Biorad). Le BAC-HCMV est ajouté avec des quantités allant de 1 µg à 20 µg dans 400 µL de milieu de transfection. Par la suite l'électroporation est effectuée avec un voltage de 160 volt (V) en variant la capacité électrique (C) exprimée en farads (F) ($M^{-1}.L^{-2}.T^4.I^2$). Ainsi selon l'équation, $C=Q/U$ avec Q la charge électrique en Coulomb (C) et U la différence de potentiel exprimée en volt (V). Pour un voltage stable de 160 V, la variation de la capacité électrique (C) permet de moduler la charge électrique (Q) afin de désorganiser les membranes plasmiques et de permettre la transfection du BAC-HCMV dans les cellules HCMV par électroporation. Une fois l'électroporation accomplie les cellules sont rapidement remises en culture en flasque T25 dans leur milieu de culture classique à base de DMEM. Après 14 jours environ, les virions peuvent être purifiés par ultracentrifugation.

II.4.d. Purification de HCMV par ultracentrifugation

Lorsque la lyse des cellules HFFF est complète ou lors d'un nombre suffisant de plages de lyse les cellules sont décollées par méthode mécanique puis congelées avec le surnageant. L'ensemble des surnageants qui ont été récoltés sont décongelés puis centrifugés à 1200 g pendant 5 min afin d'éliminer les débris cellulaires, puis les virions de HCMV sont ultracentrifugés à 30000 g pendant 2h avant d'être remis en suspension dans du milieu de culture complet DMEM.

II.5. Quantification du génome de HCMV par qPCR

L'amplification du génome de HCMV par qPCR a été effectuée après la purification par ultracentrifugation.

Le kit utilisé est ARGENE® CMV R-GENE® (Biomérieux) composé d'un contrôle d'extraction et d'inhibition, ainsi qu'un contrôle négatif. Les amorces utilisées permettent une amplification du gène *UL83* de HCMV sur l'automate Applied Biosystems® 7500 selon un programme constitué d'une activation de la Taq polymérase de 15 min à 95°C, et de 45 cycles composé d'une dénaturation de 10s à 95°C et d'une hybridation, élongation de 40 s à 60°C.

II.6. Séquençage des régions *RL13* et *UL128-131* des virions produits

Le séquençage des gènes d'intérêt *RL13* et *UL128-131* des virions produits permet la vérification d'absence de mutations induites lors de la production *in vitro* afin de s'assurer de l'intégrité de HCMV.

Tout d'abord les régions *RL13* et *UL128-131* ont été amplifiés grâce aux amorces spécifiques de *RL13*: ATC-CTG-AAC-ATG-AAG-ACT-GAC-GTT (amorces sens) et GAA-TAA-ACA-CAC-CCA-AAC-ATT-AAT-GAC (amorce anti-sens) (5'→ 3'); et de *UL128-131*: CAG-AAA-CTC-ACA-TCG-GCG-ACA (amorces sens) et CCA-TCA-CCT-CGC-CTA-TAC-TAT-GTG (amorce anti-sens) (5'→ 3'). Le kit utilisé selon les recommandations du fournisseur pour une amplification spécifique est la *Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™). La PCR est effectuée sur thermocycleur avec une phase d'activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 2 min, suivie d'une phase d'amplification de 35 cycles, chaque cycle comprenant une dénaturation à 94°C pendant 30 s, une hybridation à 45°C pendant 30 s, puis une phase d'élongation à 72°C de 3 min. Les fragments amplifiés ont été séparés sur gel d'agarose 0,8% *UltraPure Agarose and Reagents* (Invitrogen) en cuve de migration Mupid-ex (ADVANCE) à 50 V avec un marqueur de poids moléculaire : 100bp DNA Ladder (Invitrogen), du bleu de Bromophénol et du GelRed à 10X (Interchim). Après l'électrophorèse, une révélation par fluorescence sous UV permet de visualiser les bandes d'ADN grâce au GelDoc 2000 (Biorad). Puis les amplicons sont purifiés sur colonne en utilisant le kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Enfin le séquençage des régions d'intérêt *RL13* et *UL128-131* est effectué par méthode de Sanger avec un CEQ™ 8000 Beckman Coulter en utilisant un kit de séquençage *GenomeLab DTCS-Quick Start Kit* (Beckman Coulter). Les séquences obtenues sont comparées aux séquences de références de *Human herpesvirus 5 strain Merlin* sur *GenBank* grâce au logiciel d'alignement « MUSCLE » (Multiple Sequence Alignment).

II.7. Titration de HCMV des virions de HCMV

Un modèle de titration a été mis en place sur plaque de culture cellulaire 48 puits. A J0, le tapis cellulaire est préparé à raison de 1.10^5 /puits de cellules HFFF avec 1 mL de milieu/puits. A J1, les cellules sont à 100% de confluence et sont infectées par le HCMV. La souche de laboratoire AD169 est utilisée comme contrôle positif. Une gamme de dilution virale de 10^{-6} à 10^{-1} est effectuée. La plaque est incubée *overnight* à 37°C sous 5% de CO₂ puis le milieu est remplacé par 1 mL/puits de milieu de culture à 5% de SVF à raison de 2 à

3 fois par semaine pendant 10 jours environ. Après incubation, les plages de lyse associées à l'effet cytopathogène du virus sont dénombrées et le titre viral est déterminé par lecture en microscope optique. Les puits de titration virale sont réalisés en triplicat.

III. Résultats

III.1. Production, extraction et purification du BAC-HCMV

La production du BAC-HCMV par les *E. coli* transformées a nécessité une adaptation des recommandations des fournisseurs comme la pré-lyse permise par le tampon S1 préférentiellement incubé à 37°C plutôt qu'à température ambiante. La multiplication des bactéries doit être régulièrement surveillée afin de rester en croissance exponentielle avec une DO comprise en 0,5 et 0,6 McFarland dans un milieu sélectif et en croissance lente à 32°C afin d'éviter de sélectionner des clones non transformés et afin d'éviter des mutations génétiques du BAC-HCMV lors d'une croissance trop rapide.

Le rendement théorique est compris entre 100-300 ng/μl, ce qui a été obtenu à plusieurs reprises avec des concentrations entre 200 ng/μl et 250 ng/μl. La production du BAC-HCMV ne semblait ni contaminée par les protéines (260/280 > 1,8) ni par les solvants (260/230 compris entre 1,8 et 2,2).

III.2. Production de virions HCMV par les HFFF

Nous avons essayé différentes méthodes de production de virions de HCMV à partir du BAC-HCMV par transfection des cellules HFFF : la transfection par phospholipide cationique (LyoVec™), par une formulation lipidique micellaire (Effectene®) et par électroporation.

La méthode par LyoVec a rapidement été abandonnée ne permettant pas le développement de l'ECP du HCMV et donc ne permettant pas la production de virions probablement due à la taille importante du BAC-HCMV (environ 250 kpb).

L'équipe du Dr Stanton a utilisé l'Effectene® puis l'électroporation [en utilisant un électroporateur Nucleofector II (Amxa) sans précision sur les paramètres utilisés] comme méthodes de transfection (Stanton et al. 2010; Murrell et al. 2016). Nous nous sommes donc orientés vers ces méthodes.

Nous avons expérimenté plusieurs quantités de BAC-HCMV pour la transfection par l'Effectene® : 1μg, 2μg, 5 μg, 10 μg et 15μg. Ainsi, pour une quantité de 2μg, nous avons obtenu 1.10³ virions infectants (PFU) de HCMV lors de la titration sur HFFF. Il a également

été réalisé pour les quantités 1 µg, 2 µg, 5 µg de BAC-HCMV des transfections en trypsinant les cellules HFFF afin de mettre 1.10^6 cellules en suspension pendant 30 min sous agitation douce afin d'essayer de maximiser la chance de rencontre entre le BAC-HCMV et les cellules HFFF. Ces derniers essais n'ont pas permis le développement d'ECP. Il est à noter que la mortalité cellulaire lors de la transfection par l'Effectene® était négligeable (<10%) lorsque les cellules étaient bien lavées au PBS.

Concernant l'électroporation, comme détaillé dans la méthode, nous avons fait varier la capacité électrique et la quantité de BAC-HCMV. La variation de la capacité électrique s'est basée sur le guide d'utilisation de l'électroporateur (pour les cellules type 3T3 ou HeLa) qui recommande 500 F et une publication ayant utilisée l'électroporation afin de transférer des HFFF par un autre Bac-HCMV qui recommande 2500 F (White et al. 2004). Nous avons ainsi testé 15 conditions de transfection en faisant varier la quantité de BAC-HCMV (1, 2, 5, 10 et 20 µg) et la capacité électrique (500, 1500 et 2500 F). Aucune condition de transfection n'a permis la production de virions de HCMV. La mortalité cellulaire était importante (environ 60%) lors de l'utilisation d'une capacité électrique de 2500 F utilisée par l'équipe du Dr E. White jouant certainement un rôle négatif dans la production virale.

Au final, le BAC-HCMV a permis une production maximale de 1.10^3 virions infectants (PFU) de HCMV en utilisant l'Effectene® avec une qPCR HCMV à 13.10^9 cp/mL

III.3. Séquençage des régions RL13 et UL128-131 des virions HCMV produits

Les régions *RL13* et *UL128-131* des virions de HCMV produits en faible quantité ont été séquencées par méthode de Sanger afin de vérifier l'absence de mutations dues à la multiplication des *E. coli* ou à la réplication *in vitro* des virions. Les gènes *RL13* et *UL128-131* ne présentaient aucune modification génétique en comparaison à la souche WT Merlin, démontrant l'intégrité des virions obtenus au niveau de ces gènes sensibles.

IV. Discussion

Cette partie *in vitro* avait pour objectif la production de virions HCMV à partir d'une lignée fibroblastique et d'un BAC-HCMV (Stanton et al. 2010; Murrell et al. 2016) ayant une capacité d'infection cellulaire *in vitro* respectée et permettant par la suite l'infection d'une lignée cellulaire épithéliale intestinale Caco-2, utilisable comme modèle d'évaluation de nouvelles molécules antivirales. Ce modèle aurait également permis d'améliorer la

compréhension du rôle des cellules épithéliales dans l'inflammation ou dans la propagation virale chez les patients atteints de RCH séropositif pour HCMV grâce à l'étude de cytokines sécrétées post-infection.

Malheureusement, si la partie de production du BAC-HCMV a été réussie, la production d'une quantité suffisante de virions HCMV après avoir transfecté les cellules HFFF quant à elle s'est soldée par un échec. Malgré les 3 différentes méthodes utilisées, aucune n'a donné satisfaction. La quantité de virions de 1.10^3 PFU/mL obtenus par transfection en utilisant l'Effectene était insuffisante pour les expérimentations avec les Caco-2 (Esclatine et al. 2000).

La méthode par électroporation semble la plus intéressante pour réussir la transfection de grosses molécules comme le BAC-HCMV (Murrell et al. 2016). La capacité électrique probablement la plus intéressante pour l'électroporation serait 2500 F comme cela a été utilisé par le Dr White pour la transfection de cellules HFFF avec un BAC-HCMV mais la mortalité cellulaire était trop importante dans nos expérimentations *in vitro*. Le voltage de 160 V a été systématiquement conservé puisque dans le guide d'utilisation de l'électroporateur de Biorad aucun voltage n'est supérieur à 160 V pour des cellules de mammifères. Un facteur qui aurait pu être modifié afin d'améliorer la survie cellulaire et l'électroporation aurait été la modification de la conductivité du milieu de culture. En effet, une conductivité élevée du milieu de culture diminue la quantité de molécules électroporées dans la cellule pour des petites molécules comme la bléomycine ou l'iodure de propidium mais augmente la survie cellulaire *in vitro* (Ruzgys et al. 2019). Dans cet article, les variations de conductivité du milieu de culture afin de maximiser la réussite de l'électroporation pour de grosses molécules de la taille de BAC-HCMV n'ont néanmoins pas été testées. Ainsi, une augmentation de la conductivité du milieu utilisé avec une capacité électrique de 2500 F aurait probablement permis une meilleure transfection par électroporation en évitant une mortalité cellulaire trop importante.

Finalement, en plus de développer des expérimentations *in vitro* ce virus aurait également pu servir à des expérimentations *in vivo* notamment avec des souris humanisées permissives à HCMV (Crawford et al. 2017).

Modélisation *in vivo* de l'infection à CMV dans la RCH : modèle murin de la colite induite par le DSS

I. Rationnel et objectifs

Les objectifs de l'expérimentation *in vivo* sont la mise en place et l'étude d'un modèle murin de réactivation de CMV dans le cadre d'une poussée de colite d'une RCH-like.

La mise en place de ce modèle serait un moyen d'étude pré-clinique pour les médicaments antiviraux anti-CMV et le développement de nouvelles stratégies vaccinales anti-CMV.

Dans cette partie, le modèle de colite induite par le dextran sodium sulfate (DSS), la latence et réactivation du cytomégalovirus murin (MCMV) et le modèle d'étude MCMV/DSS seront détaillés.

I.1. Latence du cytomégalovirus murin (MCMV)

Les herpesvirus ont co-évolué avec leurs hôtes depuis des millions d'années (Davison 2011) et partagent un même schéma d'expression des gènes, détaillé dans la partie concernant le cycle viral de HCMV, avec une expression séquentielle des gènes très précoces, précoces et tardifs.

Les rongeurs sont des modèles d'expérimentation animale souvent utilisés pour étudier la physiopathologie et la réponse immunitaire de CMV. Les souris peuvent être infectées par le MCMV, elles offrent une simplicité d'étude par rapport aux grands mammifères et des avantages pratiques quant aux possibilités d'étude de la latence, du réservoir, et de la réactivation virale (Forte et al. 2020). En effet, il existe de nombreuses similitudes génétiques entre HCMV et MCMV avec de nombreux gènes homologues responsables de la structure du virus et de l'évasion immunitaire. Cependant, il existe des différences importantes dans l'organisation de l'information génétique avec pour HCMV une région longue et courte unique avec des séquences répétées terminales et internes et pour le MCMV une séquence unique avec des répétitions terminales courtes et internes courtes (W. D. Rawlinson, Farrell, et Barrell 1996).

De manière équivalente à HCMV, la résolution de l'infection par le MCMV chez la souris nécessite des LT CD4+ et CD8+ fonctionnels et les anticorps anti-MCMV permettent d'éviter la dissémination sanguine du virus (Krpmotić et al. 2019). Ainsi des souris immunocompétentes contiennent l'infection à MCMV efficacement alors que l'infection des souris immunodéficientes conduit à une atteinte de plusieurs organes (Krpmotić et al. 2019). Ainsi la réactivation de MCMV chez des souris infectées de manière latente a été démontrée

lors de plusieurs types d'immunosuppression comme le sérum anti-lymphocytaire et les corticostéroïdes (Jordan, Shanley, et Stevens 1977), le cyclophosphamide (Mayo, Armstrong, et Ho 1977), l'irradiation gamma (S. K. Kurz et Reddehase 1999) et la septicémie (Forster et al. 2010).

L'infection aiguë par le MCMV est rapidement résolue au niveau des organes viscéraux. Cependant, le génome viral peut être détecté pendant une période pouvant aller jusqu'à plusieurs mois dans les glandes salivaires (Balthesen, Messerle, et Reddehase 1993). Le génome viral est détecté chez les souris BALB/c, après la résolution de l'épisode infectieux aigu, dans le sang, dans les poumons (Balthesen, Messerle, et Reddehase 1993), dans la rate (Pomeroy, Hilleren, et Jordan 1991) et dans les reins (Klotman et al. 1990). La latence de MCMV dans la rate et le rein est objectivée par l'absence de virus répliquatif (démontrée par une titration virale nulle) et la persistance du génome viral dans les organes. De plus, ces fragments d'explants de rate et de reins avec du MCMV en phase de latence ont été inoculés à des souris immunodéficientes (SCID) induisant une infection aiguë à MCMV chez ces souris (Pollock et Virgin 1995). Cette expérimentation démontre que le MCMV latent peut être réactivé jusqu'à induire une dissémination systémique du virus.

Les analyses de l'expression des gènes de MCMV en phase de latence ont montré que la transcription de la région IE est parfois détectable mais reste le plus souvent très faiblement exprimée. Ainsi la latence virale et sa réactivation ont pu être retrouvées dans les poumons de souris (S. Kurz et al. 1997; S. K. Kurz et Reddehase 1999). Le promoteur MIEP, qui pilote la transcription virale à partir des ARNm IE1-IE3, ne semblerait pas suffisant à l'initiation du cycle productif dans les poumons. La latence ne semble pas être régulée exclusivement par l'activation du promoteur MIEP mais d'autres points de contrôle existent probablement via des épissages alternatifs des transcrits de MCMV (S. K. Kurz et al. 1999). Il semblerait que dans les poumons de souris des transcrits de *IE1* soient présents en faible quantité et que des transcrits de *IE3* soient absents en cas de latence virale (S. K. Kurz et Reddehase 1999). Il semblerait donc que les transcrits de *IE1* soient exprimés en faible quantité en phase de latence sans aboutir à un cycle viral complet ni être strictement nécessaire à la latence et cette expression ne serait pas suffisante pour activer l'expansion des LT CD8+ mémoires nécessaire à l'élimination du réservoir viral (Seckert et al., s. d.; Kutle et al. 2017).

De façon comparable à HCMV, la réactivation de MCMV dans le cadre d'allogreffe rénale chez la souris est un processus complexe encore mal compris, probablement induit par des protéines pro-inflammatoires comme le TNF α via la voie d'activation NF- κ B induisant une expression des transcrits *IE1* (M. Hummel et al. 2001). On peut remarquer également que dans la région du promoteur MIEP les dinucléotides CpG de l'ADN du MCMV ne sont pas

méthylés chez les souris infectées de manière latente suggérant une inactivation « partielle » du génome ou une inactivation non permanente même en phase de latence virale chez la souris (Mary Hummel et al. 2007).

La difficulté du modèle murin résulte notamment du fait de l'absence de protéines régulatrices comme pUL138 essentielles dans la latence et la réactivation de CMV, présentes uniquement chez l'humain ou le chimpanzé (Davison et al. 2009). La latence virale de MCMV semble être délicate à démontrer, et n'a pas encore été évaluée dans les tissus digestifs. De ce fait les modèles de souris humanisées infectées par HCMV sont un modèle d'étude de latence et de réactivation virale plus complexe à mettre en place en pratique mais plus proche de la réalité humaine *in vivo* (Mlera et al. 2020).

I.2. Les souches de MCMV

Les deux souches de MCMV les plus utilisées en laboratoire sont la souche Smith et la souche K181 (L. M. Smith et al. 2008). La souche Smith de MCMV a été isolée par Margaret Smith en 1954 à partir des glandes salivaires de souris de laboratoire infectées (M. G. Smith 1954). La souche K181 de MCMV a également été isolée par June Osborn à partir des glandes salivaires de souris (L. M. Smith et al. 2008).

Du fait de nombreux passages *in vitro* et *in vivo*, les deux souches de MCMV Smith et K181 ont acquis des variations de séquence significative sans réarrangement génomique, insertion ou délétion majeurs (L. M. Smith et al. 2008)

In vitro, il a été rapporté que la souche K181 de MCMV présente de plus petites plaques d'effet cytopathogène que la souche Smith de MCMV et se développe à des titres inférieurs (Hudson, Walker, et Altamirano 1988). *In vivo*, il a été initialement rapporté que la souche K181 de MCMV se réplique à des titres plus élevés dans les glandes salivaires des souris infectées (Misra et Hudson 1980). La sensibilité au MCMV est également dépendante de la souche de souris ; ainsi les souris BALB/c sont plus sensibles que les souris C57BL/6 du fait de l'absence du récepteur de lectine Ly49H des cellules NK. Ce récepteur activateur présent chez les souris C57BL/6 permet la reconnaissance de la protéine m157 (une protéine d'échappement viral CMH-like) codée par le MCMV à la surface des cellules infectées entraînant une réponse NK spécifique de MCMV (Bekiaris et al. 2008).

I.3. Modèle murin de colite induite par le DSS

Le DSS est un agent chimique soluble, un dérivé de polysaccharide ramifié synthétique dont la formule brute est $C_9H_{11}NO_2$. Le modèle murin de colite induite par le DSS a été initialement étudié par I. Okayasu et est maintenant l'un des modèles expérimentaux les plus utilisés du fait de sa simplicité de mise en place et de sa reproductibilité (Okayasu et al. 1990). L'efficacité de la colite induite par le DSS dépend de plusieurs facteurs, notamment de la concentration de DSS (habituellement entre 1% et 5% dilué dans l'eau de boisson), de la durée et de la fréquence d'administration par voie orale (5 à 10 jours d'administration pour une administration aiguë ou plusieurs cycles répétés d'administration de DSS avec des intervalles sans DSS pour une administration chronique), du poids moléculaire de DSS fabriqué (allant de 5kDa à 500kDa), du fond génétique de l'animal choisi (les souches C3H/HeJ, C57BL/6 et BALB/c sont les plus sensibles) et de l'environnement stérile ou non choisi au sein de l'animalerie (Eichele et Kharbanda 2017). Concernant le poids moléculaire, pour des souris femelles BALB/c de 6 à 7 semaines d'âge, l'atteinte colique la plus importante en histologie après 7 jours d'utilisation de DSS est retrouvée après administration de DSS à 40 kDa comparé à ceux de 5 kDa ou de 500 kDa (Kitajima, Takuma, et Morimoto 2000). Il est à noter qu'une administration de DSS à 40 kDa à 5% par voie orale à des souris femelles BALB/c de 6 à 7 semaines entraîne une distribution du DSS dès le premier jour dans le colon distal avec une présence de DSS dans la totalité du colon au troisième jour ainsi qu'une présence dans l'iléum et le jéjunum au septième jour (Kitajima, Takuma, et Morimoto 1999). Ces publications orientent le choix du DSS à un poids moléculaire à 40 kDa afin d'induire une colite efficacement et rapidement dans l'ensemble des intestins.

Dans le modèle de colite induite par le DSS, l'agent chimique n'induit pas directement une inflammation intestinale, mais agit comme une toxine chimique sur l'épithélium intestinal entraînant une lésion des cellules. Cette altération de la barrière intestinale entraîne une perturbation de l'architecture de l'épithélium conduisant à l'entrée de bactéries endoluminales dans la muqueuse (Eichele et Kharbanda 2017). Dès le premier jour, après administration de DSS à 3% chez des souris BALB/c, une perte des protéines de jonction comme Zonula occludens-1 (ZO-1) suivie d'une augmentation significative de la perméabilité au troisième jour ont été retrouvées dans ce modèle murin (Poritz et al. 2007). Cette modification joue un rôle majeur dans la perméabilité intestinale, les saignements intestinaux et la mortalité induite par l'agent chimique. Le DSS administré de manière aiguë induit des changements histologiques comme la déplétion des cellules à mucine et calciformes, l'érosion épithéliale, des ulcérations et l'infiltration de granulocytes dans la lamina propria et la sous-muqueuse (Eichele et Kharbanda 2017), autant d'atteintes retrouvées dans la

physiopathologie chez les patients atteints de RCH montrant l'intérêt de l'utilisation du modèle murin de colite induite par le DSS pour modéliser les MICI. L'importance de l'atteinte des cellules à mucine dans la colite a été montrée chez la souris ; en effet, les souris déficientes en *Muc2* développent une colite spontanée et l'administration de DSS à ces souris déficientes induit une colite plus importante et plus précoce que les souris sauvages sous DSS (Van der Sluis et al. 2006). Ces cellules à mucine ont été mentionnées en amont et jouent également un rôle important dans la physiopathologie de la RCH chez l'Homme. Concernant le profil inflammatoire induit par le DSS, on retrouve chez des souris C57BL/6 ayant reçu du DSS à 3,5% une augmentation de la production des ARN messagers (ARNm) de TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ et des chimiokines comme la *murine chimiokine* KC (CXCL1) et MIP-2 (*Macrophage-Inflammatory Protein 2*) (CXCL2) dans les parties proximales et distales du côlon. L'ARNm du TNF α augmente dès le premier jour après administration de DSS (Yan et al. 2009) ce qui nous intéresse dans ce travail étant donné le rôle majeur du TNF α dans la réactivation de CMV.

Le DSS administré de manière chronique induit des modifications histologiques supplémentaires à l'administration en aigu comme une atteinte de l'architecture des cryptes accompagnée d'une lymphocytose de la muqueuse profonde (Eichele et Kharbanda 2017). De plus, le schéma d'administration semble impacter fortement le type de réponse immunitaire T. Chez des souris C57BL/6, dont la colite a été induite par du DSS 3% (40 kDa) en administration aiguë pendant 7 jours, les auteurs retrouvent une réponse inflammatoire de type Th1-Th17 (augmentation du TNF α , IL6, IL-17), alors qu'une administration chronique de DSS (4 cycles de 7 jours de DSS puis 10 jours sans DSS) induit une réponse immunitaire de type Th2 (augmentation des IL-4 et IL-10, et une diminution du TNF α , de l'IL6 et de l'IL-17) (Alex et al. 2009).

I.4. Modèle murin de réactivation de MCMV dans la colite induite par le DSS

Dans la littérature peu d'auteurs ont étudié la réactivation intestinale de MCMV chez les souris lors d'une induction de colite. Deux études détaillées ci-dessous se focalisent sur l'induction de colite en utilisant le DSS.

Onyeagocha et ses collaborateurs ont étudié la réactivation de MCMV chez des souris C57BL/6. Ils ont infecté les souris par voie intra-péritonéale (IP) avec 10^5 *plaque-forming units* (PFU) de la souche *Smith* de MCMV. Ils ont vérifié la présence de MCMV au niveau colique par PCR du gène *IE1* à J3, J14 et J28. A J3, la présence de génome viral était

importante et comparable aux niveaux retrouvés dans la rate ou les glandes salivaires. A J14 et J28, la présence de génome était faible mais détectable. Les auteurs ont considéré que le virus était entré en phase non répliquative à partir de J28 et les jours suivants étaient considérés comme la phase de latence. L'infection seule par MCMV des souris C57BL/6 n'a pas induit de colites. A partir de J30, ils ont administré aux souris du DSS à 2,5% dans l'eau de boisson pendant 7 jours. Les souris infectées par MCMV ayant reçu le DSS présentaient une perte de poids plus importante, un colon raccourci, une atteinte des cryptes intestinales et une infiltration cellulaire plus importantes que le groupe MCMV sans DSS. Cependant, les auteurs n'ont pas retrouvé de différence significative de niveau d'expression de *IE1* en PCR quantitative dans les groupes MCMV/DSS vs MCMV au niveau colique (Onyeagocha et al. 2009).

Jerry L. Brunson et ses collaborateurs ont également essayé de modéliser l'impact de MCMV dans le modèle de colite induite par le DSS. Des souris C57BL/6J ont été infectées avec 3×10^4 PFU de la souche *Smith* de MCMV par voie IP et l'induction de colite s'est faite avec 3% de DSS de 40 kDa contenu dans l'eau de boisson pendant 6 jours, 4 jours ou 6 semaines après infection par le MCMV. Les auteurs montrent un développement accéléré de la colite induite par le DSS chez les souris infectées par le MCMV (à 4 jours comme à 6 semaines) avec une apparition précoce de saignements macroscopiques. Néanmoins, ils ne montrent pas de différence significative du score d'activité de la colite au dernier jour de DSS, avec un score moyen à 3,5/10. Les auteurs discutent de la dose de DSS utilisée qui pourrait être trop élevée et induirait une toxicité colique trop importante ne permettant pas de distinguer l'impact de MCMV dans la sévérité de la colite. Ils préconisent alors une dose de DSS réduite à 2,5%, comme détaillé dans l'article précédent. Par contre, cette publication ne contient pas de données sur l'expression du génome ou des transcrits viraux, ne permettant pas l'évaluation spécifique d'une réactivation virale de MCMV dans le groupe ayant reçu le DSS 6 semaines après l'infection (Brunson, Becker, et Stokes 2015).

La mise au point d'un modèle murin de réactivation de MCMV dans la colite reste un défi actuel et présenterait de nombreuses applications au niveau fondamental et dans la recherche pré-clinique. Dans le cadre de mon projet de thèse, en me basant sur les précédentes études, j'ai évalué un modèle murin de colite induite par le DSS sur souris BALB/c infectées par MCMV. J'ai réalisé une cinétique de l'infection afin de déterminer le schéma d'induction de la colite à distance de l'infection aiguë, dans l'objectif de se situer en phase de latence virale et d'évaluer le potentiel de réactivation de MCMV après induction de la colite par le DSS afin de se rapprocher des conditions de la colite associée au CMV lors

de la poussée de la RCH. J'ai également évalué la sévérité de la colite à l'aide de scores clinique, biologique et histologique.

II. Matériels et Méthodes

II.1. Lignées cellulaires 3T3 et M2-10B4

Les cellules 3T3 sont issues d'une lignée fibroblastique issue d'embryon de souris. Cette lignée est permissive au MCMV et permet sa titration *in vitro*. Cette lignée cellulaire adhérente a été cultivée dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) *high glucose* (Sigma-Aldrich) auquel il faut ajouter 10% de sérum de veau foetal (SVF) (CVFSVF00-01 Eurobio) et 1% d'une solution d'antibiotique (A5955-100mL Sigma-Aldrich à 10 000 U/mL de pénicilline et à 10 mg/mL de streptomycine) dans une étuve à 37°C à 5% de CO₂.

Les cellules M2-10B4 (ATCC® CRL-1972™) sont des clones dérivés de cellules stromales de moelle osseuse de souris. Cette lignée est permissive au MCMV et permet sa titration *in vitro*. Cette lignée cellulaire a été cultivée dans du milieu de culture *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI ; R7388-500ML Sigma-Aldrich) auquel il faut ajouter 10% de sérum de veau foetal (SVF) (CVFSVF00-01 Eurobio), 1% d'une solution d'antibiotique (A5955-100mL Sigma-Aldrich à 10 000 U/mL de pénicilline et à 10 mg/mL de streptomycine), 1,5 g/L de bicarbonate de sodium NaHCO₃ (S5761 Sigma-Aldrich), 2,5 g/L de glucose (G8898 Sigma-Aldrich), 0,11 g/L de pyruvate de sodium (S11-003 GE Healthcare) dans une étuve à 37°C à 5% de CO₂.

Les cellules 3T3 et M2-10B4 sont entretenues avec une trypsination (trypsine T39-24-100ml Sigma-Aldrich) par semaine et remis en culture au 8^{ième} en flasque Falcon® (353136 BD) avant centrifugation à 200 g afin d'éliminer la trypsine. Un changement de milieu est effectué tous les 2-3 jours.

II.2. Souche virale MCMV

La souche virale de MCMV utilisée est la souche Smith VR-1399 de l'ATCC® à 2×10⁵ PFU/mL. La souche Smith est couramment utilisée en expérimentation animale, entièrement séquencée, génétiquement proche de HCMV, et stable lors des amplifications *in vivo* (L. M. Smith et al. 2008). Elle sert aux expérimentations *in vivo* et de témoin positif pour la titration virale.

II.3. Souris

Des souris BALB/cByJ femelles de 6 à 8 semaines (Laboratoire Charles Rivers, Larbresle, France) (ou BALB/c) de phénotype sauvage (*wild type*) ont été utilisées. Elles sont élevées en secteur infectieux A2 dès leur infection par le MCMV à l'animalerie de la faculté de médecine de Saint Etienne (Plateforme PLEXAN). Les expérimentations animales ont été approuvées par un comité d'éthique : protocole CEAAL 2971.

II.4. Production *in vivo* de MCMV et titration *in vitro*

Des souris BALB/c de 6 semaines ont été infectées en IP avec 200µL de MCMV à 1.10^4 PFU de la souche de référence Smith VR-1399 diluée dans du PBS. Trois semaines post-infection (p.i.), les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale. Les glandes salivaires (GS) ont été prélevées, rassemblées et broyées dans du milieu de culture. Le broyat aliquoté a été congelé à -80°C avant titration. Un seul cycle de congélation est effectué avant l'utilisation des aliquots. Les aliquots de GSMCMV (MCMV obtenu à partir des glandes salivaires) obtenus ont été utilisés afin de réaliser des infections successives de nouvelles souris à partir de différents lots d'animaux pour réaliser un stock de GSMCMV nécessaire aux futures expérimentations.

Un modèle de titration a été mis en place sur plaque de culture cellulaire 48 puits. A J0, le tapis cellulaire est préparé à raison de 1.10^5 /puits de cellules 3T3 ou M2-10B4 avec 1mL de milieu/puits. A J1, les cellules sont à 100% de confluence et sont infectées alternativement par le GSMCMV, les broyats d'intestins ou de côlons à titrer. Le MCMV de la souche de référence Smith VR-1399 est utilisé comme contrôle positif. Une gamme de dilution virale de 10^{-6} à 10^{-1} est effectuée. La plaque est incubée 4 heures à 37°C puis le milieu est remplacé par 1 mL/puits de carboxyméthylcellulose (CMC). Après incubation à 37°C sous 5% de CO_2 , les plages de lyse associées à l'effet cytopathogène du virus, sont dénombrées à 4 et 5 jours post-infection. Le titre viral est déterminé par lecture en microscope optique des plages de lyses observées sur le tapis cellulaire de 3T3 ou de M2-10B4. Les puits de titration virale sont réalisés en triplicat.

Cette méthode de titration est inspirée des travaux de l'équipe du CNRS UMR 5164 du Dr J. Déchanet-Merville à l'université de Bordeaux sur le MCMV (Khairallah et al. 2015).

La production de MCMV *in vivo* et la méthode de titration virale m'ont été enseignées lors d'une collaboration dans l'équipe du Dr Julie Dechanet-Merville (CNRS UMR 5164 –

University of Bordeaux) avec le Dr Myriam Capone durant un stage de 1 semaine au début de mes travaux de thèse.

II.5. Infection des intestins par le MCMV

La cinétique de l'infection par le MCMV dans les tissus digestifs a été évaluée dans deux expérimentations indépendantes, afin de déterminer l'infectabilité de ces tissus par le MCMV et de suivre la charge virale tissulaire à distance de l'infection. Une charge virale faible permettrait de définir une fenêtre temporelle pour induire une réactivation virale.

Lors d'une première expérimentation animale, les souris BALB/c de 7 semaines (réparties en 4 groupes J3, J14, J28, J39 composés de 3 souris chacun) ont été infectées par voie IP à 3×10^3 PFU dans 200 μ L de GSMCMV. La mise à mort des souris par dislocation cervicale s'est donc faite à J3, J14, J28 ou J39. Un groupe de 3 souris non infectées a servi de contrôle négatif à J39. Les intestins proximaux et les côlons ont été prélevés.

Lors d'une seconde expérimentation animale, les souris BALB/c de 7 semaines (réparties en 3 groupes J7, J17, J27 composés de 3 souris pour les groupes J7 et J17 et de 4 souris pour le groupe J27) ont été infectées par voie IP à 3×10^3 PFU dans 200 μ L de GSMCMV. La mise à mort des souris par dislocation cervicale s'est donc faite à J7, J17 ou J27. Un groupe de 3 souris non infectées a servi de contrôle négatif à J27. Les intestins proximaux et les côlons ont été prélevés.

Les niveaux d'expression du génome de MCMV et de la GAPDH murine ont été quantifiés par qPCR comme détaillé ci-dessous.

II.6. Le modèle MCMV/DSS

Le modèle de réactivation de MCMV par induction d'une colite induite par le DSS a été reproduit dans 2 expérimentations animales indépendantes, selon la même méthodologie (Figure 26).

Quatre groupes de 5 souris BALB/c âgées de 7 semaines ont été constitués : 1 groupe contrôle négatif (N), 1 groupe DSS, 1 groupe MCMV, 1 groupe MCMV/DSS. Le groupe contrôle est injecté en IP avec 200 μ L de PBS à J0. Le groupe DSS est injecté en IP avec 200 μ L de PBS à J0 et le DSS à 2,5% (MP Biomedicals™, 0216011080) de 36-50 KDa est administré dans l'eau de boisson de J30 à J37 et renouvelé quotidiennement. Le groupe MCMV est injecté en IP avec 200 μ L de GSMCMV à 3×10^3 PFU à J0. Le groupe

MCMV/DSS est injecté en IP avec 200 µL de GSMCMV à 3×10^3 PFU à J0 et le DSS à 2,5% (MP Biomedicals™, 0216011080) de 36-50 KDa est administré dans l'eau de boisson de J30 à J37 et renouvelé quotidiennement. Le DSS dilué est filtré (0,22µm) avant l'administration aux souris. Des prélèvements de sang ont été effectués à J0, J7, J14, J21, J30 et J37. Les souris ont été surveillées et scorées quotidiennement après l'administration de DSS, de J30 à J37, sur 10 points pour établir un index d'activité de la maladie (DAI) (Schippers et al. 2016) (Tableau 8). Différents prélèvements sont collectés au moment de la mise à mort à J37 : le sang, les intestins proximaux et les côlons pour déterminer la charge virale MCMV et la titration virale ; des tissus intestinaux et coliques pour l'histologie et l'immunohistochimie selon les protocoles détaillés ci-dessous.

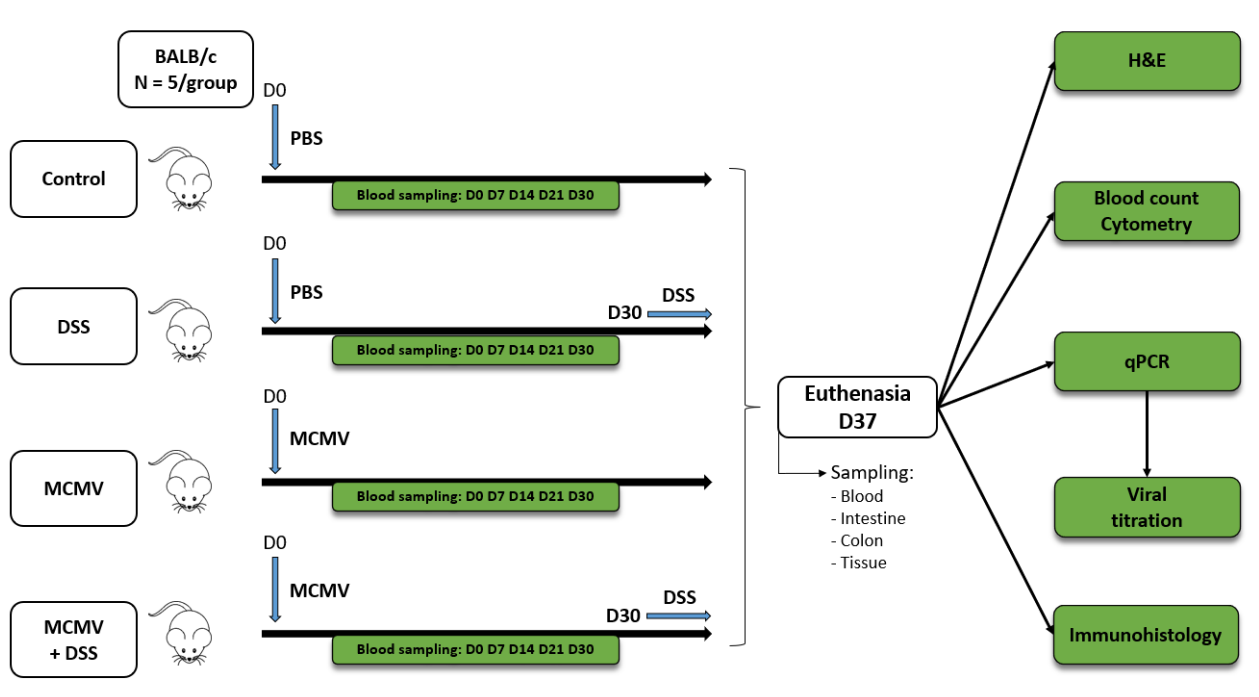


Figure 26 : Schéma de la modélisation MCMV/DSS

Tableau 8 : *Disease activity index (DAI)*

DENOMINATION	VALEUR	OBSERVATION
Poids	0	<2%
	1	[2-5%[
	2	[5-10%[
	3	[10-20%[
	4	>20%
Aspect des selles	0	Normales
	2	Molles
	4	Diarrhée
Rectorragies	0	Absence
	1	Présence
	2	Présence de caillots importants, sang coagulé

Score d'activité de la colite induite par le DSS inspiré de A Schippers et coll. (Schippers et al. 2016)

II.7. Broyats des organes : glandes salivaires, intestins et côlon

Les GS, les intestins et les côlons de souris disséquées sont lavés dans du PBS pour éliminer les fluides potentiellement contaminant (sang, fèces). Les organes sont broyés et passés à travers un filtre de 70 µm à l'aide d'un piston pour obtenir une suspension cellulaire et éliminer les tissus mous non désagrégés (graisse, membranes...). La suspension est obtenue en utilisant du milieu de culture RPMI pour la titration virale (2 mL de milieu par organe), ou du *RNAprotect Tissue Reagent* (Qiagen, 76104) pour la réalisation des qPCR. Les différents prélèvements sont conservés à -80°C.

II.8. Carboxyméthylcellulose (CMC)

La CMC permet de maintenir le tapis cellulaire intact et permet une lecture optimale des plages de lyse induites par le virus. La CMC est préparé à partir de 8,8 g de méthylcellulose auto-clavée à laquelle est ajoutée 400 mL d'eau stérile chauffée à 80°C. Une fois le mélange homogénéisé sous agitation magnétique, et la température redescendue à 37°C, 50 ml de MEM 10X, 50 mL SVF, 5 mL de solution d'antibiotiques (A5955-100mL Sigma-Aldrich) et 24 ml de bicarbonate de sodium à 7,5% sont ajoutés. La CMC se conserve à -20°C.

II.9. Amplification et quantification du génome de MCMV par qPCR

L'amplification du génome de MCMV par qPCR a été effectuée sur différents prélèvements de GSMCMV (purs ou dilués au 10^{ème}), de sang total (dilué au 10^{ème}), et sur les broyats d'intestins et de côlons de souris (purs).

L'extraction de l'ADN du MCMV, après amplification chez la souris, a été effectuée sur l'extracteur d'acides nucléiques NUCLISENS easyMAG® (bioMérieux) à partir de 200 µl d'échantillon.

Le mix utilisé pour la qPCR MCMV est le Platinum® SYBR®Green Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitogen™ Thermo Fisher Scientific). La qPCR MCMV est effectuée selon les recommandations du fournisseur sur l'automate Applied Biosystems® 7500 selon un programme constitué d'une première phase d'élimination des « carry-overs » par l'UNG à 50°C pendant 2 min, d'une phase d'activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 2 min, suivie d'une phase d'amplification de 40 cycles, chaque cycle comprenant une dénaturation à 95°C pendant 15 s et une hybridation/élongation à 60°C pendant 45 s. La température de fusion des amplicons (91°C) est analysée à la fin de la qPCR.

L'amplification d'un fragment du génome de MCMV par qPCR MCMV a été faite sur un volume de 5µl d'extrait. Les amorces utilisées afin d'amplifier un fragment du gène codant la gB de MCMV sont AGG-CCG-GTC-GAG-TAC-TTC-TT (amorces sens) et GCG-CGG-AGT-ATC-AAT-AGA-GC (amorce anti-sens) (5'→ 3') (Khairallah et al. 2015). Les amorces utilisées afin d'amplifier un fragment du gène codant la GAPDH de MCMV GCT-TGC-TGA-TGA-ATG-AGT-TC (amorces sens) et CCT-GGG-AAG-TTT-GTT-CCA (amorce anti-sens) (5'→ 3') (Eurogentec). La révélation est faite par analyse de la fluorescence du SYBR®Green et de la courbe de fusion en fin de qPCR.

Le plasmide MCMV servant à l'élaboration des courbes de calibration de la qPCR et ainsi à la quantification absolue de la charge virale MCMV nous a été fourni par l'équipe de Bordeaux. Une gamme de dilution de 1 copie/µl à 10⁹ copies/µl a été analysée en parallèle des échantillons de souris afin de quantifier la charge virale MCMV. Le fragment de la GAPDH sert de gène de ménage afin de rapporter la quantité de copies de gB à 100 000 cellules.

Nous avons calculé la limite de détection de la qPCR de la gB de MCMV par probabilité de détection du plasmide de référence dilué de 100 cp (copies)/µL à 0,01 cp/µL avec un facteur de dilution 1/3. L'expérience est réalisée avec 5 réplicats. La limite de détection est de 1,42 cp/µL (IC 95% : [1,26-1,61]) et la limite de quantification est estimée à 10 cp/µL. Ainsi pour les expérimentations murines, la charge virale est négative lorsque la valeur du Ct de l'échantillon est inférieure à celle du standard de 1 cp/µL et la charge virale est positive mais non quantifiable lorsque la valeur du Ct de l'échantillon est inférieure à la valeur du Ct du standard de 10 cp/µL.

II.10. Numération Formule sanguine et ratio CD4/CD8

Les paramètres des numérations formules sanguines ont été obtenus à partir du sang total des souris sur un compteur analyseur d'hématologie MS4S (Melet Schloesing Laboratoires).

Le ratio CD4/CD8 a été obtenu à partir du sang total des souris sur le cytomètre BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) avec un marquage lymphocytaire afin de différencier les LT auxiliaires et cytotoxiques. La lyse des globules rouges a été effectuée avec la solution de lyse BD FACS lysing solution (BD Biosciences). Le panel des anticorps (clones) utilisés est : anti-CD3 V500 (500A2) dilué au 100^{ième}, anti-CD4 Pacific Blue (GK1.5) dilué au 100^{ième}, anti-CD8 α APC-Cyanine7 dilué au 100^{ième} (53-6.7) (BD Biosciences). L'analyse en cytométrie a été faite en utilisant le logiciel FlowJo.

II.11. Fixation des tissus et inclusion en *optimal cutting compound* (OCT)

Lors du jour de prélèvement, les organes de souris (1 cm d'intestins et de côlons, ainsi que les glandes salivaires) sont plongés dans du PBS et la partie endoluminale des intestins et des côlons est lavée avec du PBS. Par la suite, les organes sont plongés dans du Paraformaldéhyde (PFA) à 4% et la partie endoluminale des intestins et côlons est injectée de PFA. Les organes sont incubés dans le PFA à 4°C *overnight*. Le lendemain les organes sont rincés dans un bain de PBS et inclus dans de l'OCT (Sigma-Aldrich, P0091). Pour les intestins et le côlons, l'OCT est injecté également en endoluminal. Les organes sont congelés rapidement en azote liquide et conservés à -20°C. Les coupes de blocs d'organes sont réalisées au cryostat à 8 μ m et sont apposées sur des lames thermofrost (Thermo Scientific™ J1830AMNZ). Les lames sont séchées et conservées à 4°C jusqu'à coloration H&E ou jusqu'à leur utilisation pour l'immunohistochimie.

II.12. Coloration H&E

La coloration H&E des coupes d'intestins et de côlons de souris est utilisée pour mesurer l'activité histologique de la colite induite par le DSS par le score de Nancy détaillé dans la partie « diagnostic de la RCH » de l'introduction. Les grades sont notés de 0 à 4. Le grade 0 de l'indice de Nancy correspond à une muqueuse ne présentant pas d'augmentation du nombre de cellules inflammatoires chroniques et une absence d'élément inflammatoire aigu. Le grade 1 correspond à une augmentation modérée à sévère du nombre de cellules inflammatoires chroniques et l'absence d'élément inflammatoire. Le grade 2 correspond à une muqueuse présentant de rares polynucléaires neutrophiles dans la lamina propria et/ou

dans l'épithélium et l'absence d'ulcération. Le grade 3 correspond à une muqueuse présentant une infiltration modérée à sévère par des polynucléaires neutrophiles dans la lamina propria et/ou dans l'épithélium et l'absence d'ulcération. Le grade 4 correspond à la présence d'ulcération dans la muqueuse.

Cette coloration consiste à plonger les lames dans différents bains de xylène (Sigma, 534056-5L), d'éthanol, d'hématoxyline de Mayer (Sigma, MHS16-500ml), de l'acide/alcool 0.3%, d'éosine alcoolique (Sigma, HT110116-500ml). Pour commencer les lames sont plongées dans 2 bains de Xylène pendant 15 min chacun. Puis elles sont plongées dans 2 bains d'éthanol (100%) pendant 10 min, 1 bain d'éthanol 90% pendant 5 min, 1 bain d'éthanol 70% pendant 1 min, 1 bain d'éthanol 50% pendant 1 min, 1 bain d'éthanol 30% pendant 1 min. Un lavage au PBS est alors effectué pendant 5 min. Les lames sont plongées dans le bain d'hématoxyline pendant 5 min avant d'être rincées à l'eau distillée (3 fois) puis lavées au PBS pendant 5 min. Elles sont plongées une dizaine de fois dans l'acide/alcool et rincées à l'eau distillée. Les lames sont ensuite plongées dans le bain d'éosine pendant 1 min puis rincées à l'eau distillée (3 fois) puis au PBS pendant 5 min. Les lames sont finalement plongées dans 2 bains d'éthanol (100%) pendant 1 min puis dans 2 bains de xylène pendant 10 min avant d'être séchées et montées entre lame et lamelle.

II.13. Biotinylation des anticorps primaires

Les anticorps primaires anti-m123/IE1 (MCMV, CAPRI HR-MCMV-12) utilisés pour l'immunohistochimie sont des anticorps de souris. Ainsi, la révélation par anticorps secondaire biotinylés induit un bruit de fond rendant l'analyse des lames impossibles du fait de la présence d'anticorps de souris dans les tissus intestinaux. Afin, d'éviter ce bruit de fond, les anticorps primaires anti-m123/IE1 ont été biotinylés.

Les anticorps primaires anti-actine et anti-IE1 doivent préalablement être dialysés en utilisant le kit Amicon® (Millipore, UFC505096 50K). Cette dialyse est effectuée pour éliminer les amines présentes dans les solvants pouvant venir quencher la biotinylation. Pour 100µL à 1mg/mL d'anticorps, il faut centrifuger 12 min à 14 000 g dans l'amicon puis refaire une étape de centrifugation de 2 min à 1 000 g dans un nouveau tube, amicon retourné et ajouter environ 150 µL de PBS par tube.

Le kit de Biotinylation (RayBio Glycan Array 100) peut alors être utilisé. La solution *labeling Reagent* (3,6µL) est ajoutée et incubée pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. Finalement, 3µL de solution STOP sont ajoutés et une nouvelle étape de dialyse est effectuée.

II.14. Immunohistochimie

Les lames incluses dans l'OCT sont lavées 3 fois dans du PBS pour dissoudre l'OCT. Une perméabilisation de la membrane nucléaire est permise par un bain de Triton™ 100X (Sigma Aldrich, T8787) à 0,2% pendant 10 min à température ambiante, puis les lames sont rincées 3 fois dans du PBS. Afin de bloquer l'activité de la peroxydase endogène, les lames sont incubées dans 3% de H₂O₂ dilué dans du PBS pendant 10 min, puis les lames sont rincées 3 fois dans du PBS. L'anticorps primaire préalablement biotinylé est dilué au 500^{ème} pour l'anticorps primaire monoclonal IgG2a kappa de souris anti-m123/IE1 (MCMV, CAPRI HR-MCMV-12) ou au 200^{ème} pour l'anticorps primaire monoclonal IgG2a kappa de souris *anti-alpha smooth muscle actin antibody* (anti- α SMA) (Abcam, ab7817) dans 1% de BSA. Les lames sont incubées pendant 1h à 37°C dans une chambre humide. Après avoir rincé les lames 3 fois dans du PBS, la streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP) (BD Pharmingen™, 550946) est ajoutée et incubée 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Après avoir rincé les lames 3 fois dans du PBS, le Substrat chromogène Diaminobenzidine (DAB) (BD Pharmingen™, 550880) est ajouté pour une incubation de 5 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Après avoir rincé les lames 3 fois dans du PBS, une coloration à l'hématoxyline pendant 30 secondes est effectuée suivie d'un rinçage dans l'eau puis dans l'acide-alcool puis à nouveau dans l'eau avant de les plonger dans un bain d'eau ammoniacal à 0,08%. Après avoir rincé les lames, elles sont incubées dans des bains d'alcool puis de xylène. Elles sont finalement séchées puis montées.

II.15. Traitement des fèces

Les fèces de souris sont prélevées et pesées. L'inhibiteur de protéase (*Halt™ Protease Inhibitor Cocktail*, Thermo Fisher Scientific, 78438) dilué au 100^{ème} dans du PBS est ajouté. Les fèces sont ensuite agitées 1h pour homogénéiser le prélèvement. Le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 10 min puis le surnageant est décanté et conservé à -20°C.

II.16. Dosage de la lipocaline fécale

Les dosages de la lipocaline fécale a été effectué par *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) avec le kit Mouse Lipocalin-2/NGAL DuoSet ELISA (DY1857 biotechne) selon les recommandations du fournisseur. L'anticorps souris anti-lipocaline est coaté (100 μ L/puits) dans une plaque 96 puits la veille de la manipulation et laissé à température ambiante toute

la nuit. Le lendemain 3 lavages de 400 µL/puits sont effectués avec le tampon de lavage. Afin de bloquer les sites aspécifiques et éviter le bruit de fond, un tampon de blockage (300 µL/puits) est ajouté et incubé pendant 1h à température ambiante. Trois lavages sont effectués avant d'ajouter 100 µL/puits de standards ou d'échantillons à doser (diluer au 10^{ème}, 100^{ème} ou 1000^{ème} dans un tampon de dilution composé de PBS et de 1% de *bovine serum albumin* (BSA)) et de laisser incuber 2h à température ambiante. Après 3 lavages, 100 µL/puits d'anticorps biotinylé sont ajoutés pour une incubation de 2h à température ambiante. Après 3 lavages, 100 µL/puits de streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP) sont ajoutés pendant 20 min au noir. Après 3 lavages, 100 µL/ de solution substrat contenant de l'H₂O₂ et du tétraméthylbenzidine (TMB) sont incubés pendant 20 min au noir. Finalement 50 µL/puits de solution STOP sont ajoutés et la densité optique est lue immédiatement à 450 nm.

II.17. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0. Les tests statistiques utilisés pour les comparaisons de plus de 2 groupes sont les one-way ANOVA ou two-way ANOVA avec corrections de Bonferroni. La significativité des tests est représentée par ns pour non significatif ; * pour p<0,05 ; ** pour p<0,01 ; *** pour p<0,001. Un test est considéré comme statistiquement significatif lorsque p<0,05.

III. Résultats

III.1. Productions et titres de MCMV obtenus

Les premiers aliquots de GSMCMV ont été titrés à 1×10⁴ PFU/mL. Les expérimentations ont été répétées en augmentant le nombre de souris afin d'obtenir plusieurs lots de GSMCMV contenant une quantité de particules virales infectantes plus importantes à 3×10⁵ PFU/mL (10 souris), puis 4×10⁶ PFU/mL (15 souris). Les différents lots ont été titrés préalablement sur cellules 3T3 puis sur cellules M2-10B4. La souche virale Smith VR-1399 de l'ATCC® à 2×10⁵ PFU/mL a été contrôlée en triplicat à 1×10⁵ PFU/mL sur cellules 3T3 et M2-10B4 permettant de noter un facteur d'erreur tout à fait acceptable de -½.

Les cellules M2-10B4 permettent une lecture des plages de lyse aisée en microscopie optique (Figure 27), comparée aux cellules 3T3. Les plages de lyse sont plus nettes, l'ECP du MCMV est plus facilement visualisable. Ce sont donc les cellules M2-10B4 qui ont été utilisées pour les titrations virales : elles sont connues comme plus intéressantes pour

l'évaluation de la titration virale que les cellules dérivées de fibroblastes murins embryonnaires (MEF), cellules de référence mais fastidieuses à produire (Lutarewych et al. 1997).

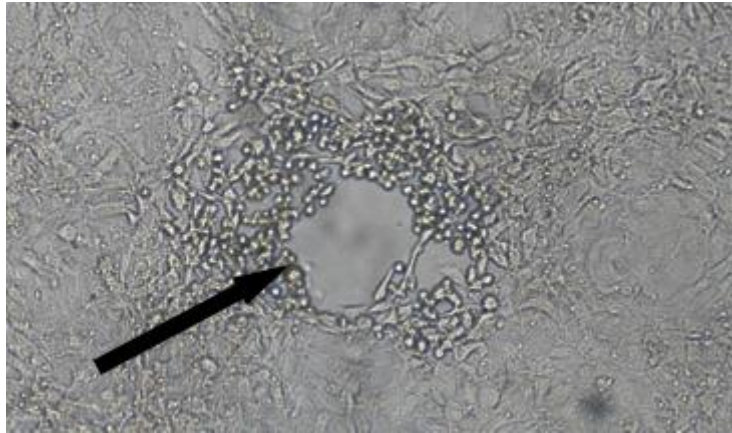


Figure 27 : Plaque de lyse induite par MCMV
Photographie observée en microscope optique (Nikon, ellipse Ti-S, intensilight C-HGfi, camera DS-Ri2 au grossissement x10) lors de la titration du MCMV sur cellules M2-10B4

III.2. Etude des voies d'injection optimales de GSMCMV pour infecter le tractus digestif

Les administrations de GSMCMV par voie IP (3×10^3 PFU), IN (1×10^5 PFU), IR (1×10^5 PFU) ou IG (1×10^6 PFU) ont été testées chez des souris BALB/c de 7 semaines (N=3/gp). La voie IP permet une dissémination du virus par voie systémique avec une charge virale sanguine supérieure à 1000 cp/μL (Figure 28). La charge virale sanguine après administration en IP est significativement plus élevée que dans les autres groupes à J7 ($p < 0.001$) et à J14 ($p < 0.05$) mais non significativement plus élevée à J21. La voie IN est une alternative à la dissémination systémique de MCMV avec néanmoins des charges virales sanguines faibles, inférieures à 100 cp/μL. Les voies IR et IG induisent des charges virales sanguines détectables mais non quantifiables (inférieures à 10 cp/μL).

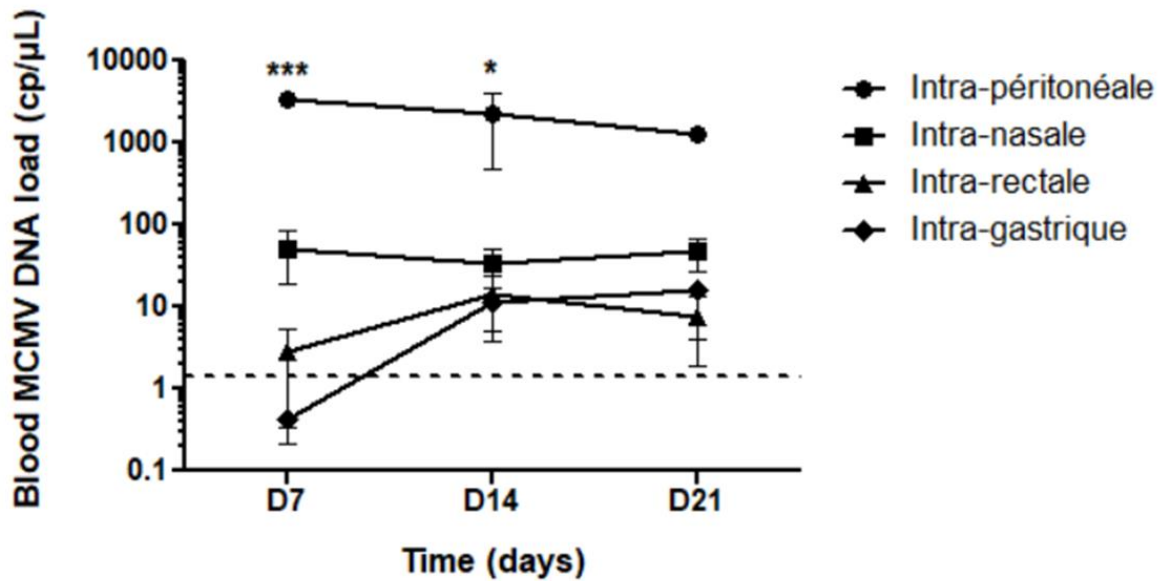


Figure 28 : Charge virale sanguine lors de différentes voies d'injection de GSMCMV
 Le graphique représente la charge virale sanguine de MCMV en fonction du temps chez des souris BLAB/c infectées par GSMCMV (N=3/groupe). La charge virale est exprimée en copies/μL. La ligne en pointillée représente la limite de détection de la méthode (10 copies/μL).
 Le test statistique utilisé est un *two-way ANOVA* : (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) avec correction de Bonferroni. Les moyennes +/- *Standard Error of the Mean* (SEM) sont représentées.
 IP : voie intra-péritonéale, IN voie intra-nasale, IR voie intra-rectale, IG voie intra-gastrique

Lors de la mise à mort des souris à J21, les intestins proximaux et les côlons ont été disséqués et les charges virales tissulaires de MCMV ont été déterminées par qPCR (Figure 29). Le génome de MCMV est positif pour la totalité des intestins proximaux (3/3) et 2/3 des côlons après infection par voie IP. Concernant la voie IN, 2/3 des intestins proximaux et 1/3 des côlons sont positifs. La voie IG a permis seulement l'infection d'un intestin et la voie IR n'a permis aucune infection d'organes du tractus digestif.

L'ensemble de ces résultats suggère que la voie IP est la plus efficace pour obtenir une infection intestinale à MCMV par une meilleure dissémination systémique du virus dans les souris BALB/c. La voie IN induit une infection systémique et intestinale plus modérée. Les voies IR et IG ne permettent pas une infection efficace du tractus digestif, ce qui montre qu'une bonne infection tissulaire est conditionnée par la dissémination systémique de MCMV, comme retrouvé dans la littérature (Christian Sinzger et al., s. d.; Onyeagocha et al. 2009).

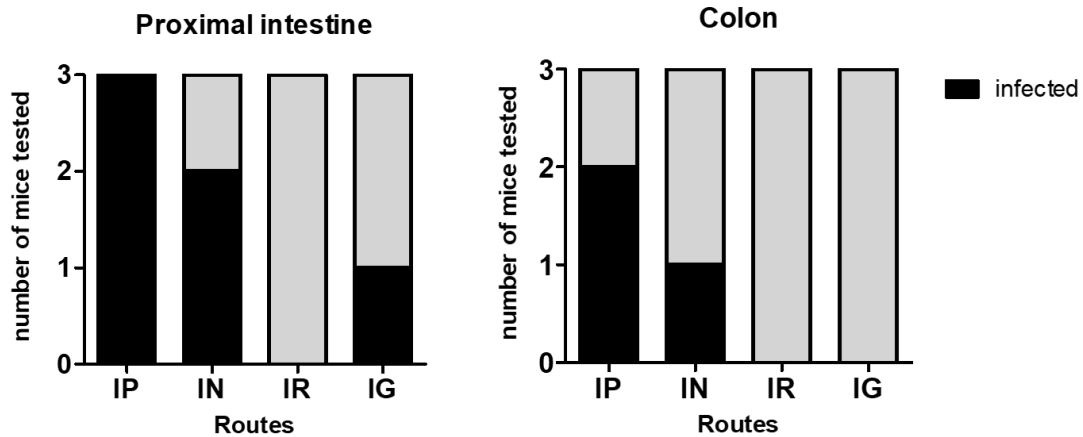


Figure 29 : Nombre d'organes infectés lors de différentes voies d'injection de GSMCMV
 Le graphique représente le nombre d'organes (intestins proximaux ou côlon) ayant une PCR gB de MCMV positive à J21 chez des souris BLAB/c infectées par 4 différentes voies par GSMCMV (N=3/gp).

IP : voie intra-péritonéale, IN voie intra-nasale, IR voie intra-rectale, IG voie intra-gastrique

Devant cette meilleure dissémination sanguine et tissulaire, la voie IP a donc été retenue pour la suite des expérimentations malgré un objectif initial de dissémination par voie muqueuse afin de mimer la primo-infection par le CMV chez l'Homme.

III.3. Cinétique de l'infection intestinale par le MCMV

L'analyse de la charge virale MCMV tissulaire à différents temps de mise à mort p.i. (J3, J14, J28, J39) de BALB/c (N=3/gp) a permis l'étude de l'évolution de la réplication virale au niveau digestif après une injection IP (Figure 30). Le groupe de 3 souris non infectées mises à mort à J39 (contrôle négatif) a présenté des charges virales tissulaires complètement négatives (non représenté dans la Figure 30).

Pour le côlon, à J3 p.i. la charge virale est quantifiable à 10^3 cp/100000 cellules puis devient détectable mais non quantifiable à J14 et J28 p.i.. Finalement, à J39 p.i. la charge virale n'est plus détectable chez 1/3 des souris.

Pour les intestins proximaux, à J3 et à J14 p.i. la charge virale de MCMV est positive et quantifiable à 10^4 cp/100000 cellules. A J28 p.i. la charge virale est au niveau du seuil de quantification. A J39 p.i. la charge n'est plus détectable chez 1/3 des souris.

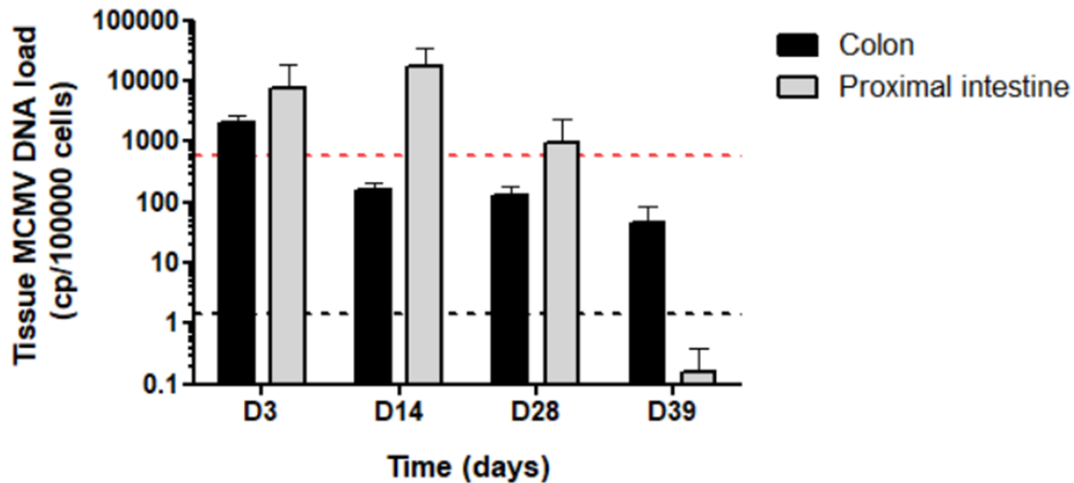


Figure 30 : Evolution de la charge virale tissulaire MCMV en fonction du temps

Le graphique représente la charge virale tissulaire MCMV (côlons en noir et intestins proximaux en gris) mesurée par qPCR chez des souris BALB/c infectées en IP à 3×10^3 PFU GSMCMV. Les mises à mort ont été pratiquées à J3, J14, J28, J39 p.i. (N=3/groupe).

La charge virale tissulaire moyenne (+/- écart types) est exprimée en copies de gène codant pour la gB virale pour 100000 cellules. La limite de quantification (600 cp/100000 cellules) est représentée par la ligne pointillée rouge. La limite de détection est représentée par une ligne noire en pointillée.

Cette expérience a été répétée en modifiant les temps de mise à mort des souris BALB/c (J7, J17 et J27 p.i.). Pour les côlons, à J7 p.i. les charges virales de MCMV sont quantifiables à 10^3 cp/100000 cellules. A J17 p.i. la charge virale est détectable mais non quantifiable et à J27 p.i. elle n'est plus détectable chez 1/3 des souris. Pour les intestins proximaux, la totalité des groupes ont une charge virale de MCMV positive avec une charge virale quantifiable à J7 et J14 p.i. et entre le seuil de quantification et le seuil de détection à J27 p.i..

Finalement, les souris BALB/c infectées par 3×10^3 PFU GSMCMV par voie IP ont une dissémination de MCMV qui permet l'infection des intestins proximaux et des côlons. L'infection virale est plus faible dans le côlon que dans l'intestin proximal tout au long de la cinétique réalisée. La résolution de la répllication virale dans les tissus digestifs se situerait probablement autour de J28 p.i., où la charge virale tissulaire est détectable mais non quantifiable, signant la présence de MCMV à l'état peu ou non répliatif. A J39 la charge virale de MCMV se négative chez 1/3 des souris, que ce soit dans les intestins ou dans le côlon, ce qui suggère une élimination probable du réservoir viral digestif chez la souris. Ces expérimentations suggèrent que le meilleur moment pour réactiver MCMV au niveau tissulaire serait autour de J28 p.i..

III.4. Etude de l'impact de la colite induite par le DSS dans la réactivation de MCMV : description du modèle MCMV/DSS

Dans cette étude, 4 groupes de 5 souris BALB/c âgées de 7 semaines ont été établis selon l'induction d'une infection par voie IP à 3×10^3 PFU de GSMCMV et secondairement d'une induction de colite induite par le DSS : un groupe contrôle négatif, un groupe « DSS » sans infection par MCMV, un groupe « MCMV » sans induction de colite induite par le DSS, et un groupe « MCMV/DSS ». Les groupes MCMV et MCMV/DSS ont été infectés par MCMV à J0. Les groupes DSS et MCMV/DSS ont reçu du DSS à 2,5% dilué dans l'eau de boisson quotidiennement de J30 à J37 p.i.

Le modèle de réactivation de MCMV par induction d'une colite induite par le DSS a été reproduit avec des résultats identiques dans 2 expérimentations animales indépendantes, selon la même méthodologie (Figure 26).

III.4.a. Evolution de la charge virale sanguine MCMV

Les prélèvements de sang total des souris BALB/c ont été effectués à J7, J14, J21, J30, J37 afin de vérifier la bonne infection des souris et de suivre la charge virale sanguine MCMV au cours du temps (Figure 31). Les groupes de souris non infectées avec et sans DSS ont été contrôlés négatifs à J7. Les groupes de souris infectées MCMV et MVMV/DSS ont une charge virale sanguine MCMV positive avec un pic maximum à J14 (2×10^4 cp/ μ L) puis une résolution progressive de l'infection après J21 pour atteindre des taux faibles à J30 (250 cp/ μ L). L'infection par voie IP des souris a donc une bonne dissémination systémique avec une résolution progressive de l'infection. Aucune différence significative n'a été montrée entre les groupes MCMV et MCMV/DSS, avec des cinétiques de charge virale sanguine MCMV superposables jusqu'à J30 (avant induction de la colite induite par le DSS), montrant une infection systémique MCMV comparable dans ces 2 groupes. Cette homogénéité de charge virale sanguine permet d'évaluer l'impact potentiel de la colite induite par le DSS sur une réactivation virale chez des souris infectées par le MCMV. Ainsi, les taux très faibles observés à J37 (150 cp/ μ L) chez les souris infectées sans différence significative observée entre les 2 groupes suggère l'absence de réactivation virale systémique induite par 7 jours consécutifs de DSS chez les souris du groupe MCMV/DSS.

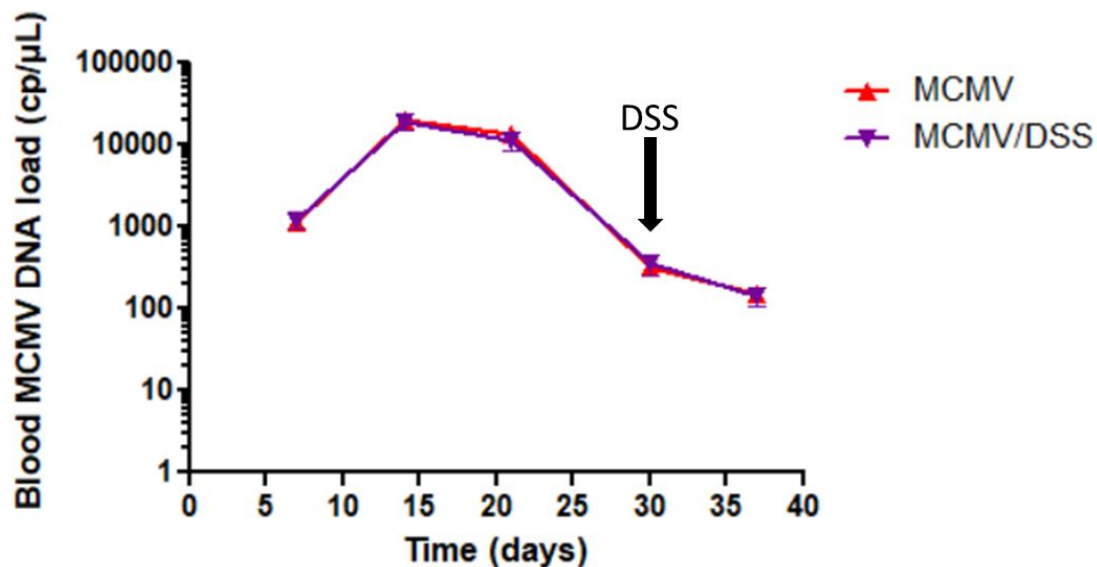


Figure 31 : Evolution de la charge virale sanguine MCMV en fonction du temps

Les groupes de souris infectées par MCMV sont représentés (N=5/groupe) : le groupe MCMV (en rouge) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0, le groupe MCMV/DSS (en violet) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0 et dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30. Le graphique représente l'évolution de la charge virale sanguine de MCMV en fonction du temps.

Le test statistique utilisé est un *two-way ANOVA* avec corrections de Bonferroni. Les moyennes \pm SD sont représentées.

III.4.b. Evolution du poids

Les souris infectées par MCMV à J0 (groupes MCMV et MCMV/DSS) ont un infléchissement de leurs courbes de poids particulièrement entre J3 et J10 p.i., comparé aux deux autres groupes de souris non infectées (groupes N et DSS) qui présentent une montée progressive de leur poids, sans atteindre une différence significative du fait d'une dispersion des mesures entre les groupes (Figure 32A). A partir de J14, le poids des souris des 4 groupes devient plus homogène, avec en particulier une remontée du poids des souris infectées jusqu'au niveau des souris non infectées. Ainsi, les 4 groupes de souris (infectées et non infectées) n'ont aucune différence significative de poids avant l'administration de DSS à J30 (Figure 32A). Lors de l'administration de DSS aux souris (groupes DSS et MCMV/DSS) une perte de poids est observée. Les souris du groupe DSS ont une perte de poids significative comparé au groupe contrôle négatif (N) à J36 ($p < 0,05$) et à J37 ($p < 0,001$) par rapport à J30 (avant l'administration de DSS). Les souris du groupe MCMV/DSS ont une perte de poids significative à J37 ($p < 0,05$) par rapport à J30 (avant l'administration de DSS). Aucune

différence de poids n'est cependant observée entre les groupes DSS et MCMV/DSS (Figure 32B).

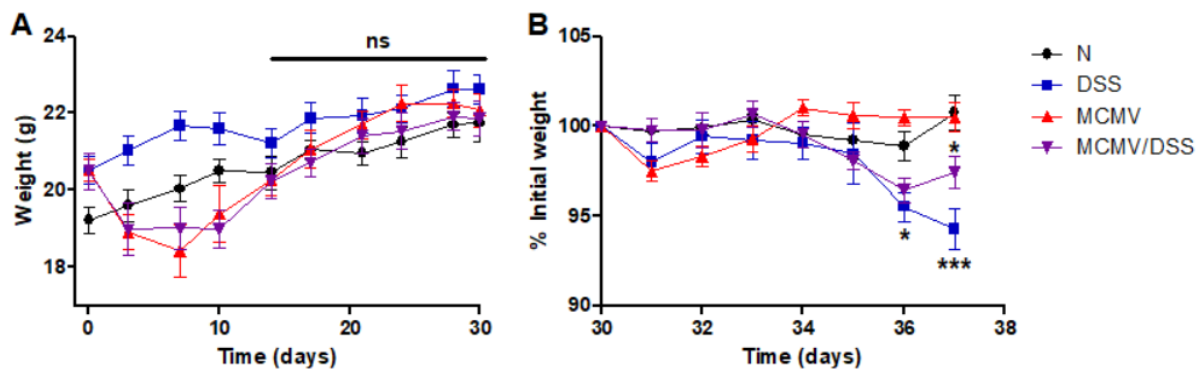


Figure 32 : Evolution du poids des souris BALB/c

Les souris BALB/c sont réparties en 4 groupes et suivies durant 37 jours (N=5/groupe) : un groupe contrôle négatif N (en noir), un groupe DSS (en bleu) dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30, un groupe MCMV (en rouge) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0, un groupe MCMV/DSS (en violet) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0 et dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30. Le graphique (A) représente l'évolution du poids (des souris de J0 à J30). Le graphique (B) représente l'évolution du poids des souris de J30 à J37 avec ou sans DSS (poids exprimé en % par rapport à leur poids basal avant induction de la colite induite par le DSS à J30).

Le test statistique utilisé est un *two-way ANOVA* (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) avec corrections de Bonferroni. Les moyennes +/- SEM sont représentées.

III.4.c. Disease Activity Index (DAI)

L'activité de la colite induite par le DSS chez les souris BALB/c est exprimée avec un score de 10 points prenant en compte la perte de poids, l'aspect des selles et les rectorragies (Tableau 8). A partir de J34, soit 4 jours après la première administration quotidienne de DSS à 2,5% dans l'eau de boisson, les souris des groupes DSS et MCMV/DSS ont un DAI moyen de 2,2 ce qui est significativement plus élevé que les souris non exposées par le DSS ($p < 0,001$) (témoin négatif et souris infectées par le MCMV sans DSS). Cette différence significative est conservée jusqu'au 7^{ème} jour d'administration du DSS (J37) avec une moyenne du DAI augmentée à 5,2. Ce résultat montre que l'atteinte inflammatoire du DSS a une répercussion clinique dès le 4^{ème} jour d'administration du DSS chez la souris avec une perte de poids, la présence de diarrhée et de rectorragies, s'aggravant avec une exposition cumulée par le DSS. Aucune différence de DAI n'est cependant observée entre les groupes DSS et MCMV/DSS suggérant l'absence d'impact clinique du MCMV latent (de J30 à J37 p.i) dans la colite induite par le DSS (Figure 33).

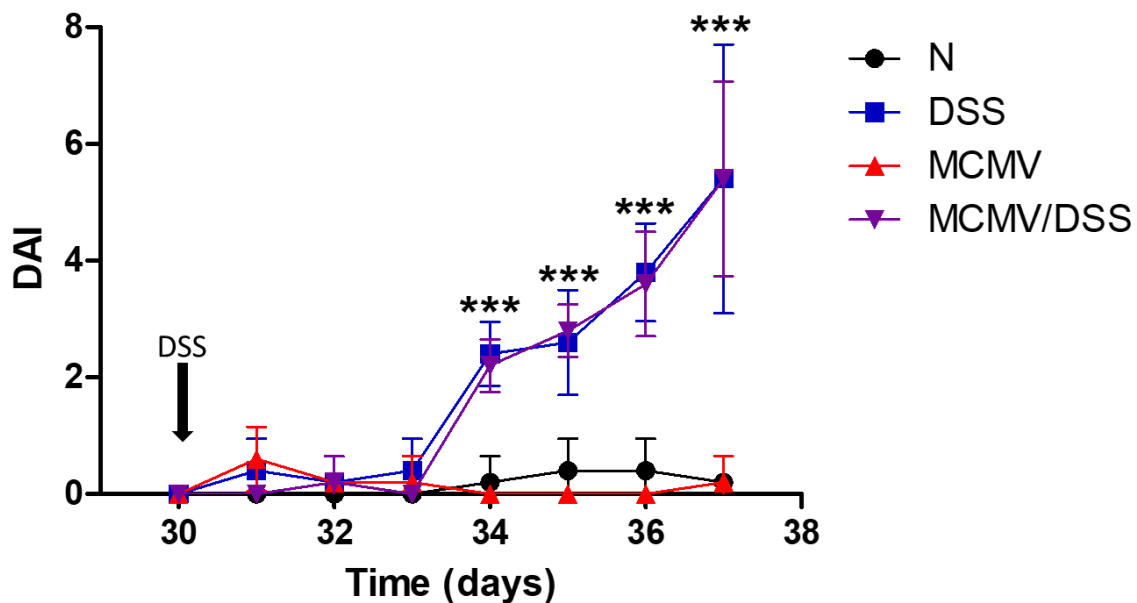


Figure 33 : Evolution de l'activité de la colite induite par le DSS

Les souris BALB/c sont réparties en 4 groupes (N=5/groupe) : un groupe contrôle négatif N (en noir), un groupe DSS (en bleu) dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30, un groupe MCMV (en rouge) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0, un groupe MCMV/DSS (en violet) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0 et dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30. Le graphique représente l'évolution du *Disease Activity Index* (DAI) noté de 0 à 10 en fonction du temps de J30 à J37.

Le test statistique utilisé est un *two-way ANOVA* : (***) $p < 0,001$) avec corrections de Bonferroni. Les moyennes +/- *Standard déviation* (SD) sont représentées.

III.4.d. Raccourcissement du côlon dans la colite induite par le DSS

Afin d'évaluer l'impact macroscopique du DSS sur le côlon des souris, la longueur des côlons est mesurée du cæcum au rectum (Schippers et al. 2016) (Figure 34). Les groupes DSS (moyenne de 7cm +/-1,2cm) et MCMV/DSS (moyenne de 6,9cm +/-0,7cm) ont une diminution significative ($p < 0,01$) de la longueur du colon par rapport au groupe contrôle (N) (moyenne de 9,7cm +/-0,9cm). De la même manière une différence significative ($p < 0,05$) est observée entre les groupes MCMV (moyenne de 9,4cm +/-0,9cm) et MCMV/DSS (moyenne de 6,9cm +/-0,7cm). Par contre, aucune différence n'est observée entre les groupes contrôle (N) et MCMV, ni entre les groupes DSS et MCMV/DSS.

Ces résultats montrent un raccourcissement colique induit par le DSS, en accord avec le modèle de colite induite par le DSS (Schippers et al. 2016). En outre, l'absence d'impact macroscopique de MCMV sur la longueur du côlon lors d'une infection systémique seule (groupe MCMV) suggère une absence de colite à MCMV dans notre modèle. Enfin,

l'infection par le MCMV ne semble pas aggraver la colite induite par le DSS (groupe MCMV/DSS).

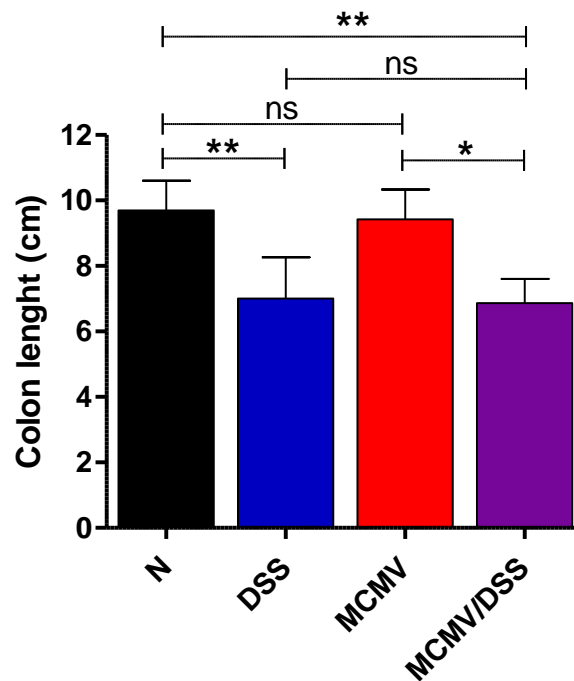


Figure 34 : Représentation des longueurs de côlon

Les souris BALB/c sont réparties en 4 groupes (N=5/groupe) : un groupe contrôle négatif N (en noir), un groupe DSS (en bleu) dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30, un groupe MCMV (en rouge) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0, un groupe MCMV/DSS (en violet) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0 et dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30.

Le graphique représente les longueurs de côlon après mise à mort à J37.

Le test statistique utilisé est un *one-way ANOVA* (ns : non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) avec corrections de Bonferroni. Les moyennes +/- SD sont représentées.

III.4.e. Analyse de la lipocaline fécale dans la colite induite par le DSS

La mesure de la concentration de la lipocaline fécale des souris est réalisé dans les fèces, permettant d'évaluer l'inflammation intestinale induite par le DSS de façon non invasive (Chassaing et al. 2012). Le modèle murin de colite induite par le DSS montre une augmentation à la fois de la lipocaline fécale et de l'expression intestinale de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α induites par de le DSS (Chassaing et al. 2012). Dans notre modèle, l'administration de DSS induit une élévation statistiquement significative de la concentration de lipocaline fécale chez les souris des groupes DSS et MCMV/DSS au 3^{ème} jour d'administration (D3 ; $p < 0,01$) et au 6^{ème} jour d'administration (D6 ; $p < 0,001$) par rapport aux groupes n'ayant pas reçu de DSS (N et MCMV) (Figure 35A). Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe contrôle négatif (N) et le groupe MCMV à D0,

D3 et D6 (Figure 35A). Ces résultats confirment que le DSS a bien induit une inflammation intestinale. Celle-ci est présente dès le 3^{ième} jour dans les groupes ayant reçus du DSS et perdure tant que le DSS est administré dans l'eau de boisson.

En outre, afin d'évaluer le potentiel rôle amplificateur de MCMV dans l'inflammation, les résultats ont été exprimés en *fold change* par rapport à la synthèse basale de la lipocaline fécale chez les souris des groupes DSS et MCMV/DSS (Figure 35B). A D3 et à D6, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre le groupe DSS et le groupe MCMV/DSS suggérant l'absence d'une augmentation de l'inflammation induite par le MCMV dans la colite induite par le DSS (Figure 35B).

Ces résultats vérifient l'inflammation induite par le DSS seul et suggèrent l'absence de rôle péjoratif de MCMV dans l'inflammation dans ce modèle de colite induite par le DSS.

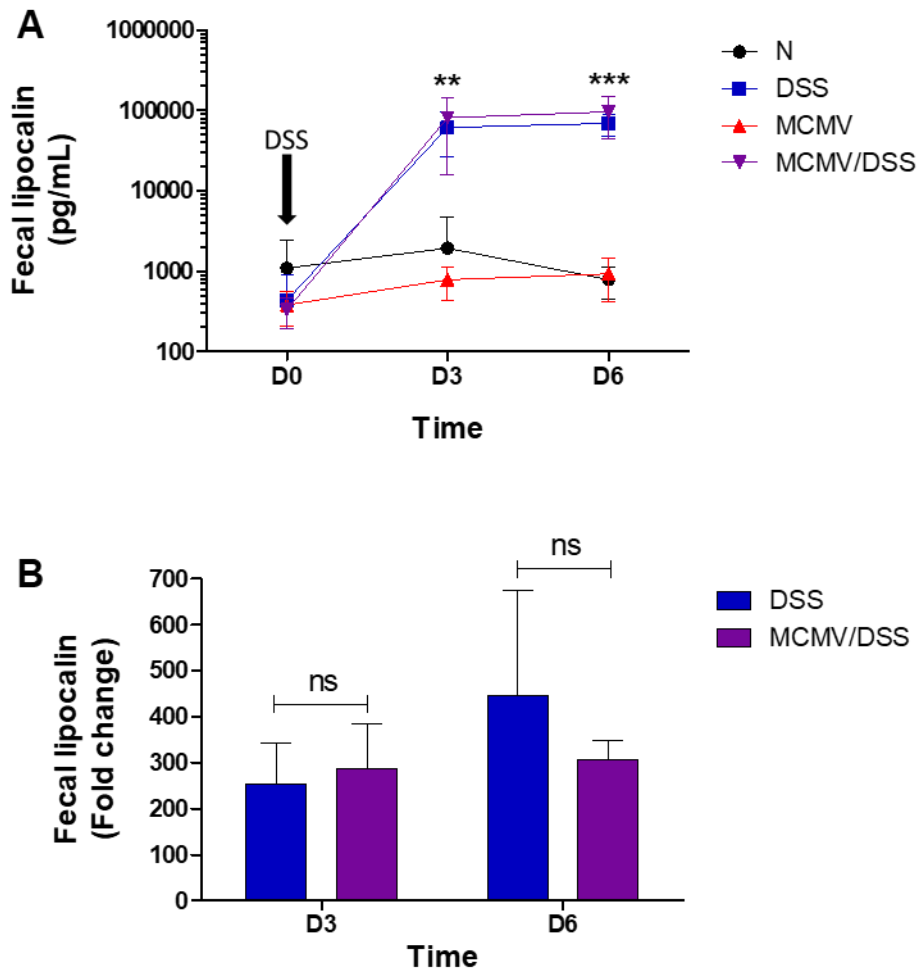


Figure 35 : Représentation de la lipocaline fécale dans le modèle de colite induite par le DSS. Les souris BALB/c sont réparties en 4 groupes (N=5/groupe) : un groupe contrôle négatif (en noir), un groupe DSS (en bleu), un groupe MCMV (en rouge) et MCMV/DSS (en violet). Le DSS a été administré quotidiennement de J30 à J37 aux groupes DSS et MCMV/DSS. Les mesures de la lipocaline fécale ont été analysées à D0, D3 et D6 post-DSS correspondant au J30, J33 et J36 de l'expérimentation. Le graphique (A) représente la concentration de lipocaline fécale (en pg/mL) pour les 4 groupes en fonction du temps. Le graphique (B) représente le dosage de la lipocaline fécale exprimé en *fold change* (par rapport au dosage basal de lipocaline fécale à J30 = D0, avant l'administration de DSS) en fonction du temps. Le test statistique utilisé est un two-way ANOVA (ns : non significatif ; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) avec corrections de Bonferroni. Les moyennes \pm SD (graphique A) et \pm SEM (graphique B) sont représentées.

III.4.f. Analyse histologique du tractus digestif

Le score histologique de Nancy permet de mesurer l'activité histologique de la RCH chez l'Homme et est également utilisable dans les modèles murins de colite (Rochereau et al. 2021). L'absence de maladie histologique correspond au grade 0, un infiltrat inflammatoire chronique sans infiltrat inflammatoire aigu (absence de neutrophiles) correspond au grade 1, une maladie légèrement active avec quelques neutrophiles correspond au grade 2, une maladie modérément active avec de nombreux neutrophiles correspond au grade 3 et une maladie sévère avec la présence d'ulcération de la muqueuse correspond au grade 4 (Marchal-Bressenot et al. 2017).

Le score de Nancy du modèle murin de colite induite par le DSS est représenté par la Figure 36 et est en moyenne supérieur à 3 pour les groupes DSS et MCMV/DSS ce qui correspond à une atteinte sévère de la muqueuse avec des ulcérations. De même manière équivalente, l'atteinte inflammatoire de la muqueuse intestinale proximale est supérieure à 4. L'inflammation de la muqueuse induite par le DSS entraîne un score de Nancy important pour ces 2 groupes sans différence statistiquement significative. Aucune différence due à l'infection tissulaire de MCMV ne peut donc être observée entre les groupes DSS et MCMV/DSS. Les groupes contrôle négatif et MCMV représentés dans la Figure 36 ont un score de Nancy de à 0 pour toutes les souris du fait de l'absence de DSS. Ainsi nous observons une absence d'atteinte de la muqueuse pour le groupe MCMV à J37 post-infection montrant une absence histologique de colite induite par le virus seul.

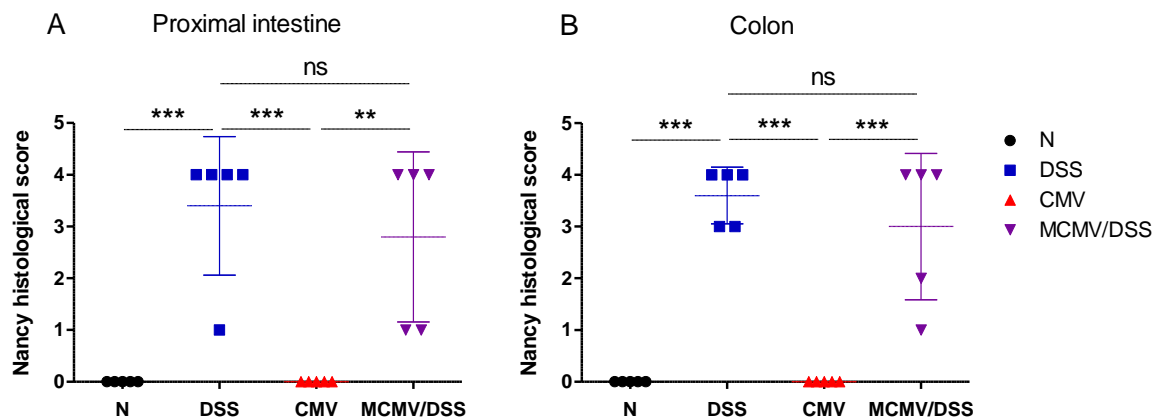


Figure 36 : Score histologique de Nancy dans le modèle de colite induite par le DSS
 Les souris BALB/c sont réparties en 4 groupes (N=5/groupe) : un groupe contrôle négatif (en noir), un groupe DSS (en bleu), un groupe MCMV (en rouge) et MCMV/DSS (en violet). Le score histologique de Nancy (de 0 à 4) a été calculé pour chaque souris après la mise à mort à J37 au niveau des intestins proximaux (A) et du côlon (B).
 Le test statistique utilisé est un *one-way ANOVA* (ns : non significatif, *** $p < 0,001$) avec corrections de Bonferroni. Les moyennes sont représentées +/- SD.

Ces résultats suggèrent que l'inflammation et l'atteinte de la muqueuse digestive sont induites par le DSS seul sans synergie avec MCMV histologiquement observable. Les photographies représentatives des intestins proximaux et des côlons des 4 groupes de souris sont présentées dans la Figure 37.

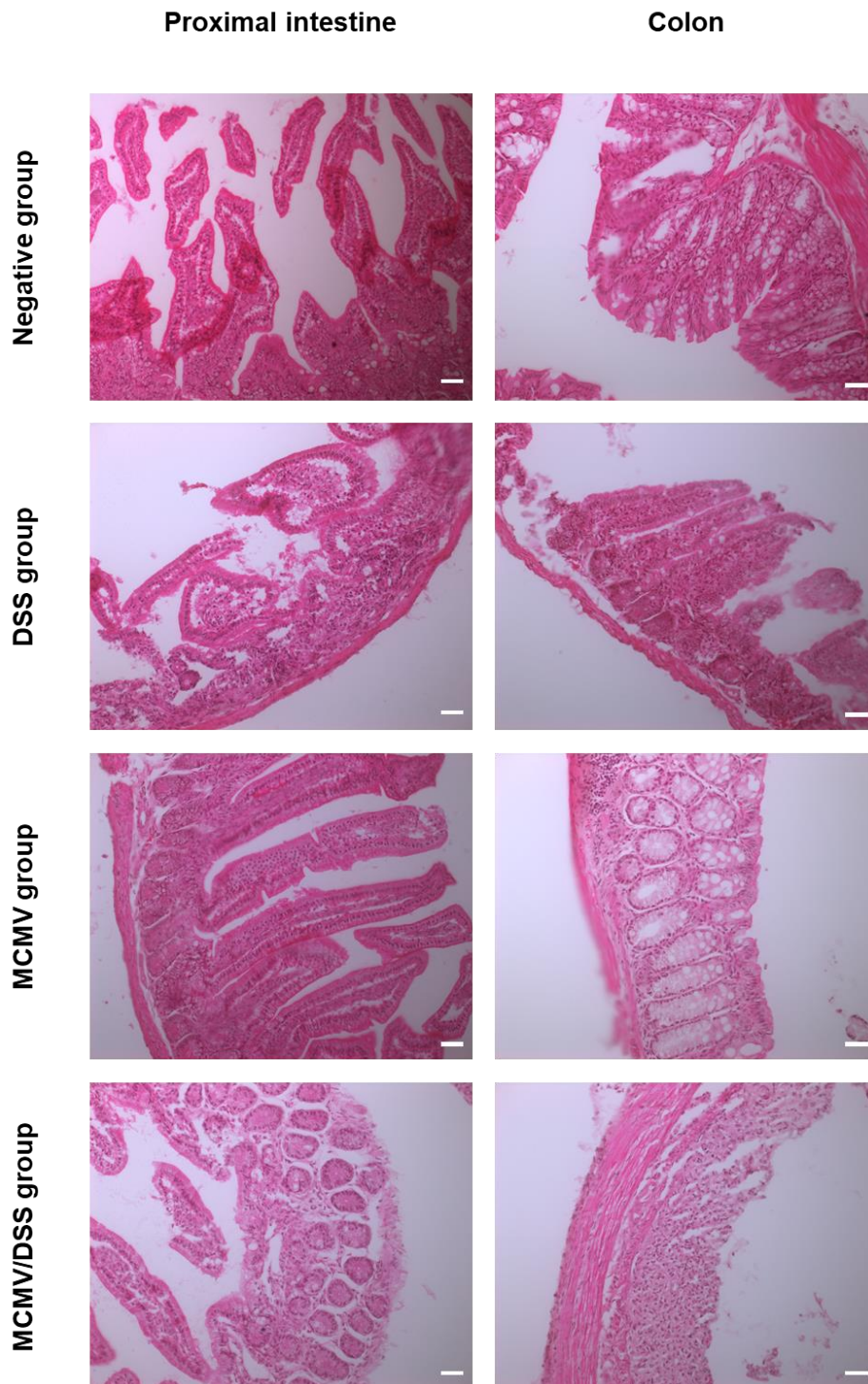


Figure 37 : Photographie des tissus de souris infectées par le MCMV
 La figure représente, les intestins proximaux et les côlons des souris des 4 groupes Négatifs, DSS, MCMV et MCMV/DSS en coloration H&E après la mise à mort à J37. L'échelle sur les photographies représente 50 μ m. Photographie prise à l'objectif x20 en microscope optique Zeiss Axioimager Apotome 3 avec une caméra ZEISS quadriCCD Axioacam.

III.4.g. Analyse de la Numération Formule Sanguine et du ratio CD4/CD8

Les numérations et formules sanguines ont été effectuées à J37 le jour de la mise à mort des souris. Le taux d'hémoglobine, la numération plaquettaire et la formule leucocytaire ont été comparés entre les différents groupes (Figure 38). Aucune différence significative n'est observée concernant les concentrations d'hémoglobine entre les 4 groupes de souris mais une tendance à la baisse de ce paramètre peut être notée pour les groupes DSS et MCMV/DSS reflétant probablement les rectorragies induites par le DSS (Figure 38A). Concernant le dosage des plaquettes, aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes suggérant probablement que la production centrale de plaquettes compense la présence de rectorragies induites par le DSS (Figure 38B). En outre, le MCMV ne semble pas influencer ces deux paramètres chez les souris infectées. Par ailleurs, une augmentation significative des leucocytes sanguins chez les souris du groupe DSS est retrouvée en comparaison des 3 autres groupes (Figure 38C). Cette leucocytose n'est pas retrouvée dans le groupe MCMV/DSS, ce qui suggère que le DSS n'est pas le facteur déclenchant de cette leucocytose. D'autre part, les souris infectées ont des concentrations de leucocytes comparables au groupe contrôle, montrant que l'infection par MCMV ne cause pas de leucopénie. Lors de l'autre expérimentation répétée à l'identique, aucune différence significative n'a été retrouvée sur la concentration leucocytaire. Il ne semble donc pas avoir d'explications expérimentales à cette différence observée.

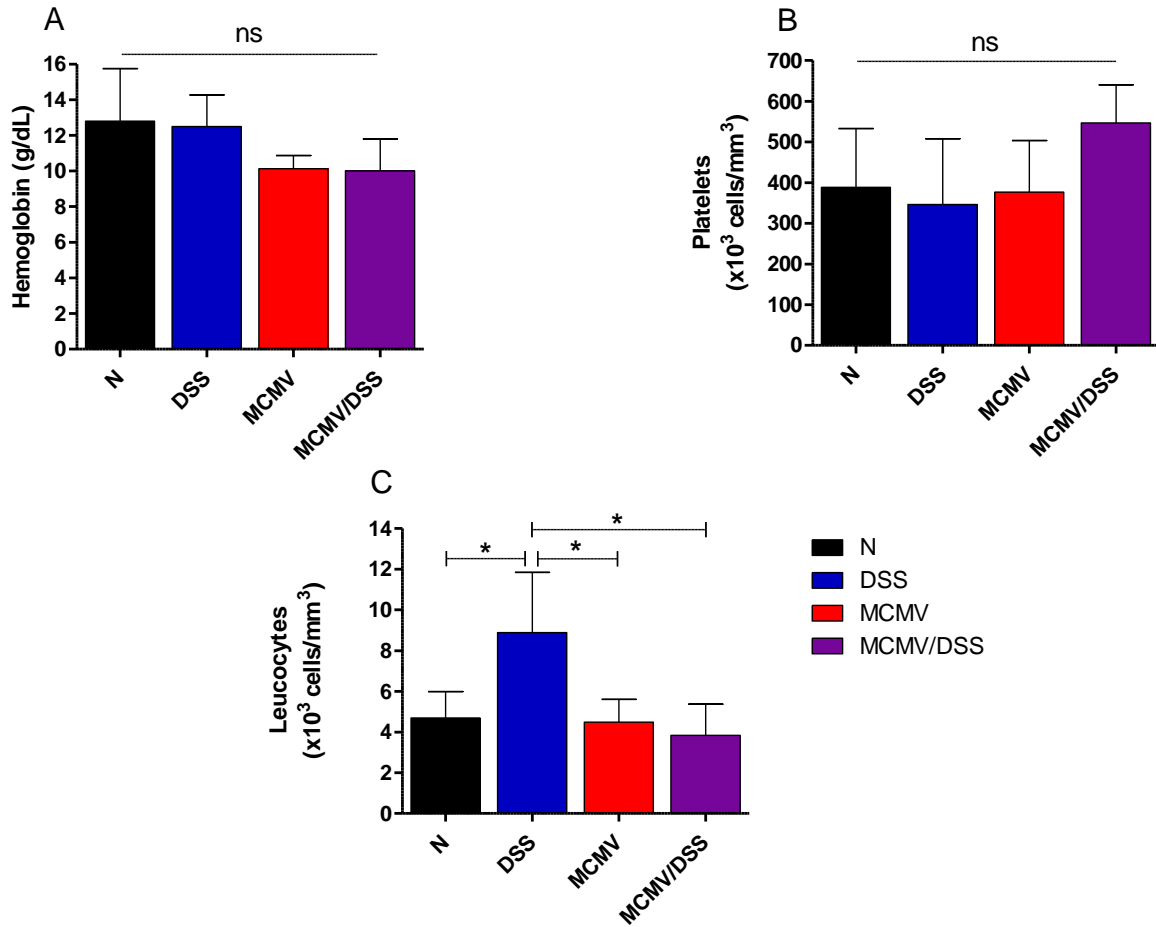


Figure 38 : Représentation des paramètres de la numération sanguine

Les souris BALB/c sont réparties en 4 groupes (N=5/groupe) : un groupe contrôle négatif N (en noir), un groupe DSS (en bleu) dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30, un groupe MCMV (en rouge) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0, un groupe MCMV/DSS (en violet) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0 et dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30. Les graphiques représentent les Numérations Sanguines des 4 groupes de souris. Le graphique (A) représente l'hémoglobine (en g/dL). Le graphique (B) représente la numération des plaquettes (en cellules/mm³). Le graphique (C) représente la numération des leucocytes (en cellules/mm³).

Les tests statistiques utilisés sont un *one-way ANOVA* (ns : non significatif ; * $p < 0,05$) avec corrections de Bonferroni. Les moyennes +/- SD sont représentés.

Concernant la formule leucocytaire (Figure 39A), aucune différence significative n'est retrouvée pour la population monocytaire entre les différents groupes. Les groupes sont homogènes avec une absence de différence concernant les lymphocytes et les neutrophiles entre les groupes négatif et DSS d'une part et entre les groupes MCMV et MCMV/DSS d'autre part. De manière intéressante, on observe une augmentation significative des lymphocytes, concomitante à une diminution des neutrophiles chez les souris infectées, en particulier entre les groupes négatif et MCMV ($p < 0,05$) et entre les groupes DSS et MCMV/DSS ($p < 0,01$), montrant que cette différence de répartition lymphocytes/neutrophiles

est induite par le MCMV. De plus, un gain de significativité statistique est observé entre les groupes DSS et MCMV/DSS. Ainsi le DSS pourrait potentialiser l'effet de MCMV sur la répartition entre lymphocytes et neutrophiles sanguins.

Les populations lymphocytaires T ont été étudiées en cytométrie en flux (Figure 39B) en représentant le ratio CD4/CD8. Le rapport CD4/CD8 est significativement diminué chez les souris infectées (groupes MCMV et MCMV/DSS) comparé au groupe contrôle (N), pouvant refléter une augmentation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques lors d'une infection par le MCMV, lymphocytes nécessaires à la résolution de l'infection virale. Cependant, aucune différence de ce ratio n'a été observée entre les groupes MCMV et MCMV/DSS montrant l'absence d'impact du DSS sur l'évolution de la population lymphocytaire et suggérant une absence d'expansion des lymphocytes T CD8 après administration de DSS. Ces résultats suggèrent que le DSS n'induit pas de réponse T cytotoxique surajoutée pouvant signer une réactivation virale systémique, ce qui est cohérent avec la charge virale sanguine MCMV qui n'est pas augmentée chez les souris sous DSS (Figure 31). Ces résultats sont néanmoins à nuancer devant l'absence de marquage spécifique anti-MCMV permettant d'analyser les populations lymphocytaires spécifiques de MCMV.

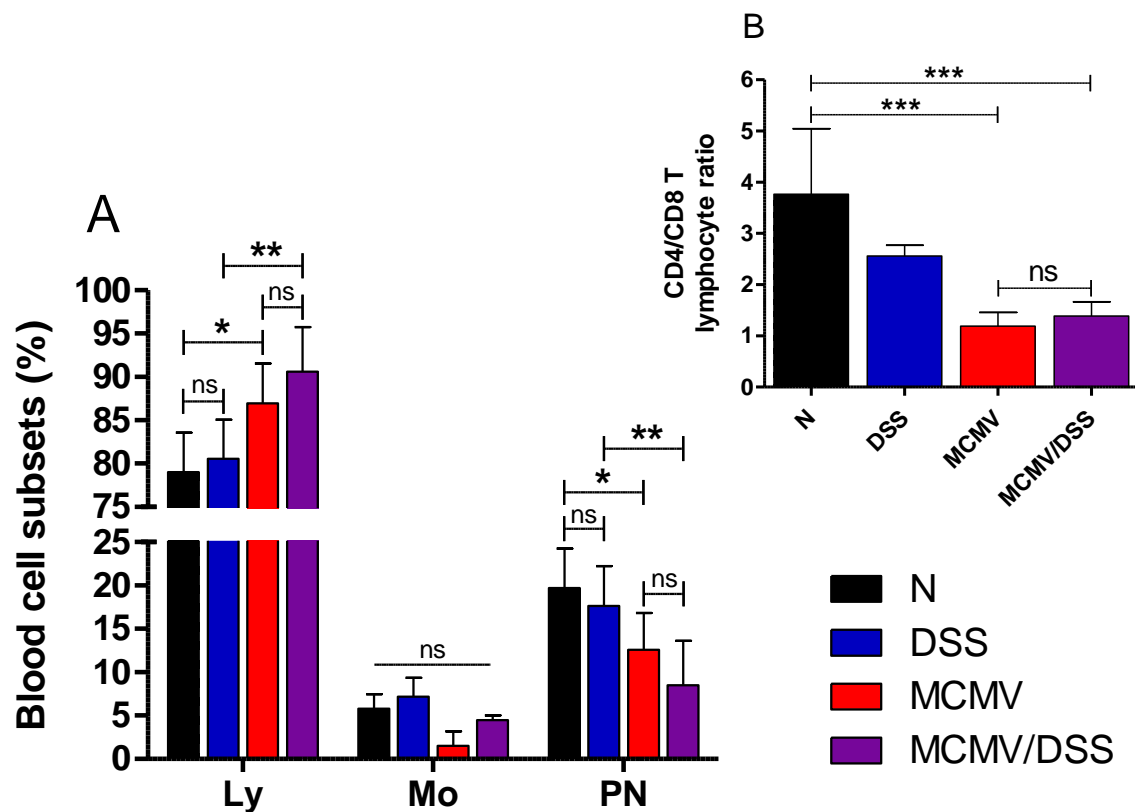


Figure 39 : Représentation de la formule lymphocytaire sanguine et du ratio CD4/CD8 des lymphocytes T

Les souris BALB/c sont réparties en 4 groupes (N=5/gp) : un groupe contrôle négatif N (en noir), un groupe DSS (en bleu) dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30, un groupe MCMV (en rouge) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0, un groupe MCMV/DSS (en violet) infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0 et dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30. Le graphique (A) représente la formule sanguine avec le taux de lymphocytes (Ly), de monocytes (Mo) et de neutrophiles (PN). Le graphique (C) représente le ratio CD4/CD8 des lymphocytes T en cytométrie en flux.

Les tests statistiques utilisés sont un two-way ANOVA pour la formule sanguine et un one-way ANOVA pour la cytométrie (ns : non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) avec corrections de Bonferroni. Les moyennes +/- SD sont représentées.

III.4.h. Analyse de la charge virale tissulaire MCMV

Afin d'évaluer le potentiel rôle de la colite induite par le DSS dans la réactivation virale MCMV, la charge virale tissulaire a été quantifiée dans les intestins proximaux et dans les côlons à J37, soit après 7 jours d'administration de DSS (Figure 40). Les souris non infectées (groupes contrôle et DSS) ont une charge virale tissulaire négative. Les intestins proximaux ont une charge virale détectable chez 5/5 des souris pour le groupe MCMV et 4/5 des souris pour le groupe MCMV/DSS mais celle-ci est sous le seuil de quantification pour les 2 groupes. Les côlons ont une charge virale détectable chez 4/5 des souris de chaque groupe MCMV et MCMV/DSS mais celle-ci est également sous le seuil de quantification pour

les 2 groupes. Lors du sacrifice à J37, les intestins proximaux et le côlon constituent un réservoir viral chez les souris infectées par MCMV, démontré par une charge virale tissulaire positive. Le DSS ajouté quotidiennement dans l'eau de boisson de J30 à J37 aux souris infectées par le MCMV permet une inflammation tissulaire dès le 3^{ième} jour d'administration comme nous l'avons vu ci-dessus cependant cette inflammation n'induit pas d'augmentation de la charge virale tissulaire dans les intestins proximaux ni dans les côlons. La charge virale reste non quantifiable ce qui suggère une absence de production de nouvelles particules virales induite par l'inflammation du DSS.

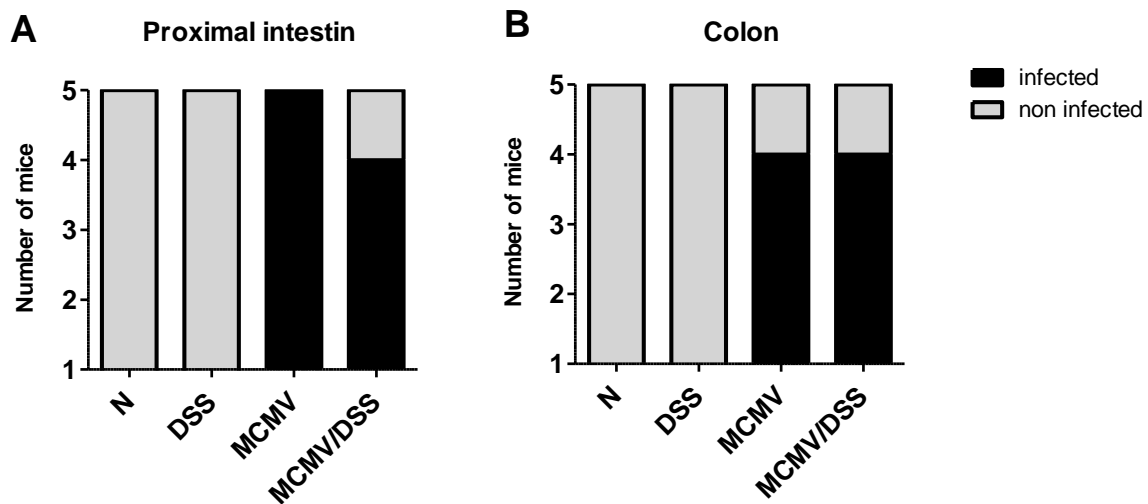


Figure 40 : Tissus digestifs infectés par le MCMV

Les souris BALB/c sont réparties en 4 groupes (N=5/gp) : un groupe contrôle négatif, un groupe DSS dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30, un groupe MCMV infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0, un groupe MCMV/DSS infecté par 3×10^3 PFU par voie IP par le GSMCMV à J0 et dont le DSS à 2,5% est administré quotidiennement à partir de J30. Le graphique représente le nombre de souris avec une charge virale MCMV positive (*infected*) ou négative (*non infected*) dans les intestins proximaux (A) et dans les côlons (B).

III.4.i. Analyse de MCMV par immunohistochimie

Afin d'évaluer la présence de MCMV à l'état répliatif dans les tissus digestifs, un marquage en immunohistochimie de la protéine IE1 de MCMV (protéine exprimée très précocement dans le cycle viral) a été réalisé. Le protocole d'immunomarquage a été validé en utilisant des glandes salivaires (GS) de souris BALB/c infectées par MCMV à 3×10^3 PFU par voie IP et disséquées à J21 (moment pendant lequel le virus est répliatif dans les GS) puis incluses en OCT (Figure 41). Le contrôle négatif de l'expérimentation (sans anticorps primaire) ne présente pas de marquage aspécifique permettant d'écarter les faux positifs. Le marquage avec l'anticorps primaire anti-IE1 est positif pour les GS des souris infectées. Le marquage avec l'anticorps primaire anti- α SMA (dirigé contre l'actine) est faiblement positif dans les GS des souris : ce marquage difficile à discerner dans les GS est extrêmement lisible dans les intestins pourvus d'une importante musculature et sert ainsi de contrôle positif dans les tissus digestifs.

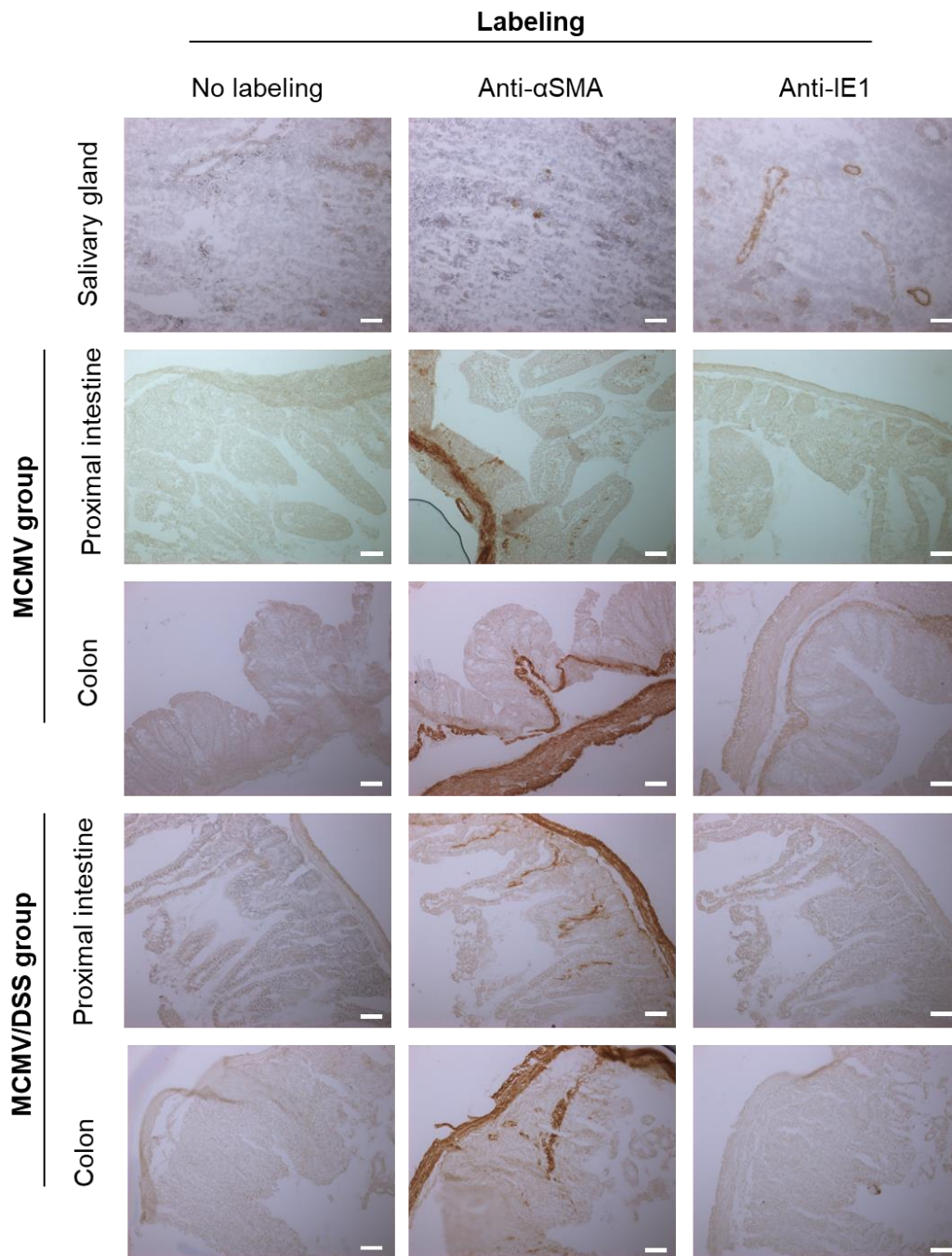


Figure 41 : Photographie des tissus de souris infectées par le MCMV
 La figure représente, les intestins proximaux et les côlons des souris des groupes MCMV et MCMV/DSS marqués en immunohistochimie après la mise à mort à J37. Le marquage de MCMV est représenté par un marquage avec un anticorps primaire anti-IE1 de MCMV. Le contrôle positif expérimental est représenté par un marquage de l'actine avec un anticorps primaire anti- α SMA. Les glandes salivaires de souris infectées par le MCMV prélevées à J21 post infection puis marquées en immunohistochimie ont servi de contrôles positifs. L'échelle sur les photographies représente 50 μ m. Photographie prise à l'objectif x20 en microscope optique Zeiss Axioimager Apotome 3 avec une caméra ZEISS quadriCCD Axioacam.

Les marquages anti- α SMA des 4 groupes de souris sont positifs dans la musculature des intestins proximaux et des côlons confirmant la bonne réalisation de l'immunomarquage.

Concernant le marquage de MCMV, les intestins proximaux et les côlons des souris BALB/c des groupes MCMV et MCMV/DSS ne présentent aucun marquage anti-IE1. Malgré la persistance de MCMV au niveau tissulaire (charge virale positive), ces résultats montrent que le modèle de colite induite par le DSS comme exposé dans ces travaux ne permet pas de réactiver le virus MCMV dans les tissus digestifs.

III.4.j. Synthèse des résultats

Afin de résumer les résultats précédents, l'ensemble de ces données est simplifié dans le Tableau suivant :

Tableau 9 : Résumés des résultats du modèle MCMV/DSS

	Contrôle négatif	DSS*	MCMV	MCMV/DSS*
Charge virale sanguine	-	-	+	+
Poids (J30 à J37)	Stable	↓	Stable	↓
Activité de la colite (DSS)	/	↑	/	↑
Longueur du colon	N	↓	N	↓
Concentration de la lipocaline fécale	N	↑	N	↑
Score de Nancy	0	↑	0	↑
Hémoglobine	N	N	N	N
Plaquettes	N	N	N	N
Leucocytes	N	↑	N	N
Lymphocytes	N	N	↑	↑
Ratio CD4/CD8	N	N	↓	↓
Détection de MCMV				
Intestins proximaux (qPCR)	Négative	Négative	DéTECTABLE	DéTECTABLE
Côlons (qPCR)	Négative	Négative	DéTECTABLE	DéTECTABLE
Intestins proximaux (IHC)	Négative	Négative	Négative	Négative
Côlons (IHC)	Négative	Négative	Négative	Négative

N : valeur normale, la qPCR notée « détectable » correspond à une charge virale non quantifiable

*les résultats sont similaires dans ces 2 groupes

IV. Discussion

Dans cette partie expérimentale murine, l'objectif était de modéliser une colite pouvant réactiver le MCMV comme cela peut se produire avec HCMV chez les patients atteints de poussée inflammatoire de RCH. Les principaux résultats obtenus ont montré que le modèle MCMV/DSS proposé dans cette étude se caractérise par une bonne infection systémique par MCMV permettant une dissémination du virus au niveau des tissus digestifs. Cependant, l'induction de la colite par le DSS à J30 après la primo-infection MCMV n'a pas permis d'observer une réactivation virale dans le tractus digestif. Nous allons dans un premier temps discuter de la méthodologie utilisée dans notre modèle MCMV/DSS. Nous discuterons

ensuite des alternatives par le DSS dans les modèles de colite chez la souris, au regard de la physiopathologie de la RCH.

IV.1. Choix de la voie d'administration et de la dose de GSMCMV

Dans un premier temps, différentes voies d'administration ont été testées afin de déterminer celle qui permettrait la meilleure infection systémique et particulièrement tissulaire ; la voie IP a donc été sélectionnée. De plus, les quantités de virus nécessaires à l'infection des souris BALB/c étaient inférieures aux autres voies d'administration permettant une épargne du stock viral, et dans un souci éthique, une diminution du nombre de souris nécessaires à la constitution de ce stock. Dans la littérature, la voie IP est également bien caractérisée avec une infection cellulaire dès les premières heures par le MCMV exprimant la protéine fluorescente verte (GFP)(Hsu et al. 2009). Le virus MCMV via la cavité péritonéale et les ganglions lymphoïdes médiastinaux a accès à la circulation sanguine puis dissémine dans l'organisme notamment le foie et la rate (Hsu et al. 2009).

Concernant la dose de 3×10^3 PFU, elle a été déterminée selon les critères de létalité, de bien-être animal et d'infectiosité. En effet, la dose létale est de 1×10^5 PFU pour les BALB/c et 1×10^6 PFU pour les C57BL/6. Chukwuma Onyeagocha et coll., dans leur modèle murin de réactivation de MCMV par une colite induite par le DSS, avaient infecté leurs souris C57BL/6 à 1×10^5 PFU soit 10 fois moins que la dose létale (Onyeagocha et al. 2009). De manière équivalente, lors de nos expérimentations d'amplification du virus MCMV, une dose 10 fois inférieure à la dose létale pour les souris BALB/c avait été appliquée, menant à une souffrance animale sévère et des mises à mort précoces. Cette dose a donc été réduite à 3×10^3 PFU avec succès à la fois pour le maintien en vie des souris, pour la bonne amplification du stock viral et par la suite pour la bonne infectiosité tant au niveau systémique que tissulaire. La dose de 3×10^3 PFU a donc été retenue pour la suite des expérimentations animales.

IV.2. Choix du phénotype animal : souris BALB/c sauvage

Le choix du phénotype des souris s'est porté sur le fond BALB/c sauvage. Tout d'abord, un phénotype sauvage, et donc immunocompétent, était souhaitable puisque ce modèle de réactivation de MCMV par une colite induite par le DSS devait ultérieurement servir de modèle de vaccination thérapeutique anti-MCMV et de traitements innovants.

L'immunité induite par la vaccination est plus facile à étudier chez des souris de phénotype sauvage afin de montrer l'activation du système immunitaire cellulaire et/ou humorale. De ce fait, les souris TCR- α déficientes n'ont pas été retenues comme modèle de réactivation colique de MCMV (Matsumura et al. 2013). Il a été montré que les souris déficientes pour le TCR- α développent une colite chronique entre la 16^{ième} et la 20^{ième} semaine avec une hyperplasie marquée des cryptes et une déplétion des cellules caliciformes sans présence de granulome, ce qui correspondrait anatomopathologiquement à la RCH chez l'Homme. Un infiltrat de cellules inflammatoires et notamment des neutrophiles est également présent (Bhan et al. 2000). Ce modèle de colite sévère a été utilisé pour étudier la réactivation colique de MCMV avec des résultats contradictoires : l'immunohistochimie détectait la présence de protéines virales alors que la titration virale tissulaire et la qPCR tissulaire étaient toutes deux négatives (Matsumura et al. 2013).

Le modèle de colite induite par le DSS chez des souris C57BL/6 infectées par MCMV de l'équipe de Chukwuma Onyeagocha a déjà été détaillé précédemment. L'auteur s'est également intéressé aux souris déficientes en IL-10 : ces souris déficientes en IL-10, comme les souris de phénotypes sauvages, n'ont pas réactiver MCMV après l'induction par le DSS (Onyeagocha et al. 2009). Les souris déficientes pour IL-10 sont caractérisées par des lésions discontinues et transmurales proches de la MC avec des infiltrats cellulaires inflammatoires dans la lamina propria et la sous-muqueuse, une hyperplasie épithéliale, une déplétion des mucines, des abcès des cryptes, des ulcères et un épaississement de la paroi intestinale (Keubler et al. 2015). De plus, l'altération du microbiote ressemble également aux altérations retrouvées chez les patients atteints par la MC (Keubler et al. 2015). Ce modèle de souris déficientes n'a donc pas été sélectionné pour nos expérimentations.

Par ailleurs, il a été préféré le fond génétique BALB/c à celui de C57BL/6 car les souris BALB/c présentent une orientation immunologique Th2 alors que l'orientation immunologique des souris C57BL/6 est plutôt de type Th1 (Watanabe et al. 2004). Ce choix est cohérent avec la physiopathologie de la RCH chez l'Homme et a pour objectif de rapprocher le plus possible le modèle murin de l'environnement immunologique humain.

IV.3. Le DSS ne permet pas la réactivation de MCMV

Comme nous l'avons vu dans le rationnel de l'étude, le DSS permet une augmentation du TNF α préférentiellement lors d'une administration aigue pendant 7 jours chez des souris C57BL/6, plutôt que lors d'une administration chronique (Alex et al. 2009). Lors d'une administration de DSS à 3% pendant 7 jours à des souris adultes jeunes BALB/c,

l'inflammation intestinale a été démontrée et le TNF α est également exprimé au niveau colique (Mai et al. 2019). Ceci permet de conforter le choix du DSS comme agent inflammatoire pouvant potentiellement réactiver MCMV via le promoteur MIEP, sensible au signal inflammatoire induit par le TNF α (Nordøy et al. 2000).

Le DSS de 40kDa (Kitajima, Takuma, et Morimoto 1999) administré dans l'eau de boisson à 2,5% (Onyeagocha et al. 2009) chez des souris BALB/c âgées de 6 à 7 semaines pendant 7 jours (Alex et al. 2009) semblait donc être la meilleure stratégie expérimentale pour permettre la réactivation de MCMV.

Lors de la mise en place du modèle murin de colite induite par le DSS, nos expérimentations ont confirmé l'efficacité du DSS administré dans l'eau de boisson à 2,5% à induire une inflammation intestinale. En effet, la perte de poids, le score d'activité de la maladie (DAI) (comprenant la perte de poids, l'aspect des selles et les rectorragies) et la concentration de la lipocaline fécale (reflet de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α (Chassaing et al. 2012)) étaient significativement augmentés dans les groupes ayant reçu du DSS.

Malgré cette inflammation locale confirmée dès le 3^{ième} jour et la présence de MCMV au niveau du tractus digestif, le modèle de colite induite par le DSS n'a pas permis de réactiver MCMV, (d'après les techniques de PCR et d'immunohistochimie utilisées) et ce au niveau sanguin et tissulaire. Devant les résultats négatifs de ces 2 analyses, la titration virale tissulaire initialement prévue n'a pas été réalisée du fait de sa plus faible sensibilité (Matsumura et al. 2013).

L'expérimentation du modèle de colite induite par le DSS a été répétée à l'identique sur une seconde série de souris avec des résultats superposables menant à la conclusion équivalente de l'absence de répllication virale induite par le DSS dans ce modèle murin.

Les principales différences du modèle de colite induite par le DSS développé dans ce travail et ceux de la littérature sont le phénotype, la dose infectante de MCMV et la dose de DSS utilisée. Les choix entre les souris BALB/c et C57BL/6 ainsi que la dose de MCMV ont déjà été discutés. La dose de DSS utilisée par Chukwuma Onyeagocha et coll. est de 2,5% chez des souris C57BL/6 alors que Jerry L. Brunson et col. utilisent 3% mais préconisent de diminuer celle-ci à 2,5% dans leur discussion (Onyeagocha et al. 2009; Brunson, Becker, et Stokes 2015). Chukwuma Onyeagocha et coll. ont démontré une colite plus sévère avec une perte de poids plus importante, un côlon raccourci, une atteinte des cryptes intestinales et une infiltration cellulaire plus importante chez les souris infectées par MCMV et ayant reçu le DSS, contrairement à nos résultats. Cependant les auteurs n'ont pas retrouvé de différence

significative de charge virale tissulaire dans les groupes MCMV/DSS vs MCMV au niveau colique (Onyeagocha et al. 2009). Jerry L. Brunson et coll. n'ont pas étudié l'expression du génome ou des transcrits viraux, ce qui n'a pas permis l'évaluation spécifique d'une réactivation virale de MCMV (Brunson, Becker, et Stokes 2015).

Dans la littérature, la réactivation de MCMV dans les poumons de souris BALB/c immunodéprimées par irradiation gamma commence à J4 post irradiation avec un maximum à J8 mais nécessite des charges virales tissulaires importantes (de 6 000 à 9 000 copies par million de cellules pulmonaires) (S. K. Kurz et Reddehase 1999). Ainsi le nombre de copies du génome viral latent dans les tissus est un paramètre clé qui détermine le risque de réactivation virale. Nous pouvons donc nous poser la question si la charge virale intestinale présente au moment de l'administration de DSS était suffisante pour réactiver MCMV dans notre modèle, et s'il fallait l'administrer à des temps plus précoces lorsque la charge virale tissulaire était plus élevée. Le choix d'une administration précoce de DSS (J14, par exemple) n'a pas été retenu puisque les souris BALB/s sont encore en phase de primo-infection avec des charges virales sanguines fortement positives (10 000 cp/ μ L). Cette option ne satisfaisait pas la modélisation d'une réactivation virale après la mise en latence du virus comme cela est le cas chez les patients atteints de RCH et porteurs de HCMV.

D'autres part, nous pouvons nous poser la question du délai expérimental nécessaire à la réactivation de MCMV, qui doit permettre un cycle viral complet de MCMV, connu pour être égal à une journée (S. K. Kurz et Reddehase 1999). Dans notre modèle, la mise à mort s'est faite 7 jours après la première administration de DSS et l'inflammation intestinale a été prouvée par le dosage de la lipocaline fécale dès le 3^{ème} jour d'administration. Ainsi, MCMV bénéficierait de 4 jours minimum pour se réactiver dans ce contexte d'inflammation digestive. Ce délai semble acceptable et cohérent avec la titration virale *in vitro* de MCMV : en effet, *in vitro*, la visualisation des plages de lyse est stable 4 jours après l'infection des cellules de type fibroblastique (Khairallah et al. 2015).

De plus, lors de la dissection des souris, le DSS a sévèrement fragilisé les côlons qui étaient dans un état pré-perforatif, suggérant qu'un traitement prolongé par le DSS n'aurait pas été éthique. Néanmoins, un arrêt de l'administration de DSS associé à un report de quelques jours de la mise à mort aurait pu être une solution afin d'allonger potentiellement le temps de réactivation en préservant l'intégrité des souris. En effet, l'atteinte colique perdure jusqu'à 7 jours après l'arrêt de l'administration de DSS (Rose, Sakamoto, et Leifer 2012).

Afin de s'affranchir de l'atteinte majeure du DSS à 2,5% chez la souris, une autre proposition de modification expérimentale aurait été une administration longue de DSS à 1,5%

permettant l'augmentation sanguine du TNF α avec un pic à J13 post administration et une atteinte histologique du côlon terminal et ascendant (De Fazio et al. 2014).

IV.4. Les alternatives par le DSS

Les modèles d'inflammation du tractus digestif des souris de phénotype sauvage sont possibles avec d'autres agents chimiques comme l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) ou l'oxazolone (Wirtz et al. 2017).

L'administration en aigu de l'agent chimique TNBS entraîne une colite transmurale (M. Neurath, Fuss, et Strober 2000) principalement provoquée par une réponse immunitaire de type Th1 avec la production d'IFN γ (à la propriété antivirale) et caractérisée par une infiltration de la lamina propria par des lymphocytes T CD4+, des neutrophiles et des macrophages ainsi que le développement d'une diarrhée sévère, d'une perte de poids et d'un prolapsus rectal (Information et al. 1995). Ces caractéristiques ressemblent à ceux des patients atteints de la maladie de Crohn (Kiesler, Fuss, et Strober 2015) ce qui ne correspond pas à ce que nous voulions produire. Quant à l'administration chronique de TNBS chez les BALB/c, elle est utilisée pour étudier la fibrose intestinale médiée par la voie NF- κ B (Lawrance et al. 2003) et ne semble donc pas convenir à un modèle aigu de poussée d'une colite.

L'administration d'oxazolone provoque chez les souris SJL/J une inflammation du côlon proche de la RCH caractérisée par une infiltration de la muqueuse intestinale par des lymphocytes et des neutrophiles, un œdème de la lamina propria, des ulcérations et une médiation immunologique Th2 (Boirivant et al. 1998). L'oxazolone apparaît comme un agent chimique intéressant pour modéliser une colite RCH-*like* mais il semble que cette colite soit essentiellement dépendante des cellules NKT productrices d'IL-13, certes impliquées dans la physiopathologie de la RCH chez l'Homme sans être les seules cellules responsables de cette pathologie (Heller et al. 2002).

IV.5. Conclusion

En conclusion, nous avons essayé d'optimiser notre modèle expérimental murin pour modéliser une réactivation du CMV dans la RCH. Cependant, les principales limites de notre approche résident dans les différences inhérentes au virus spécifique d'espèce (MCMV vs HCMV) et à l'interaction hôte-pathogène, avec un réservoir viral intestinal MCMV potentiellement éliminé chez la souris contrairement au HCMV qui persiste à vie chez l'Homme. Les axes d'amélioration discutés, tels que (1) l'induction d'une colite chronique, et (2) l'induction de la colite à un temps plus précoce, pourraient respectivement permettre la

réactivation ou l'amplification virale, mais en s'éloignant de la physiopathologie de la RCH et du modèle aigu de réactivation virale. D'autres modèles expérimentaux permissifs à l'infection par HCMV pourraient être envisagés, comme la souris humanisée (Crawford et al. 2017) ou les primates non humains (Itell et al. 2017). Le développement d'organoïdes intestinaux (Almeqdadi et al. 2019) pourrait permettre une modélisation *in vitro* de la réactivation virale HCMV en condition inflammatoire dans le tissu digestif, sans atteindre le niveau de complexité de la physiopathologie de la RCH.

La rédaction d'une publication scientifique sur le modèle murin de la colite induite par le DSS est en cours.

Les facteurs prédictifs de réactivation de HCMV chez les patients atteints de RCH

I. Rationnel et objectifs

La relation entre le HCMV et la RCH a fait l'objet d'une publication dans la revue *Microorganisms* en 2020.

Le diagnostic de la colite à HCMV chez les patients atteints de RCH en poussée est donc recommandé par les comités d'experts (Kucharzik et al. 2021). Il est ainsi recommandé de diagnostiquer la colite à HCMV soit par immunohistochimie soit par qPCR tissulaire grâce à la réalisation d'une rectoscopie ou d'une coloscopie (Kucharzik et al. 2021) : les autres techniques comme les tests antigéniques sanguins ou les qPCR sanguines ne permettent pas d'apprécier la réactivation intestinale de HCMV et manquent de sensibilité (Tandon et al. 2017). Actuellement, aucune valeur seuil n'est validée par les comités d'expert mais une charge virale tissulaire supérieure à 5 UI/100000 cellules (soit 10 copies/mg de tissu) et une charge virale tissulaire supérieure à 136 UI/100000 cellules (soit 250 copies/mg de tissu) correspondent respectivement au seuil de significativité clinique de la qPCR et à un seuil de résistance aux thérapeutiques immunosuppressives utilisées dans les poussées de RCH (Roblin et al. 2011; Pillet et al. 2016). Pour faire suite aux recommandations du diagnostic de réactivation de HCMV, les sociétés d'experts préconisent de mettre en place un traitement antiviral (ganciclovir) (Kucharzik et al. 2021).

Ainsi la prise en charge d'une rechute chez un patient séropositif atteint de RCH nécessite une endoscopie basse et la réalisation de biopsies afin de rechercher la présence de HCMV dans la muqueuse inflammatoire. Ce geste est invasif pour le patient et coûteux. Il semble donc intéressant d'identifier des facteurs pronostiques de réactivation virale chez ces patients afin d'éviter des endoscopies et des biopsies en cas de faible risque de réactivation virale.

Plusieurs études ont essayé d'identifier des facteurs pronostiques de réactivation virale mais elles comportent régulièrement des biais méthodologiques comme un recrutement de patients hétérogènes (tous les types de MICI sont confondus) ou l'utilisation d'examen de diagnostic de colite à HCMV différents de l'IHC et de la qPCR.

Parmi les facteurs pronostiques de réactivation virale retrouvés dans la littérature, certains semblent consensuels malgré les réserves énoncées ci-dessus. Une pancolite (Kishore et al. 2004; Hirayama et al. 2016; Yang et al. 2020), un score de Mayo élevé (H.-S. Lee et al.

2016; Yang et al. 2020; Clos-Parals et al. 2019; Nowacki et al. 2018) sont retrouvés dans plusieurs études comme un facteur pronostique de réactivation virale. Les ulcères sont un des paramètres encore débattus mais méritent une attention particulière étant donné l'importance de l'inflammation locale qui pourrait faciliter la réactivation de HCMV (McCurdy et al. 2015).

Concernant les traitements utilisés dans la RCH, une cohorte rétrospective menée par McCurdy de 270 patients dont 68 avaient une colite à HCMV et dont 2/3 étaient atteints de MC et 1/3 étaient atteints de RCH a recherché des facteurs de réactivation de HCMV chez ces patients. Dans cette étude la colite à HCMV a été diagnostiquée par IHC et retrouvée en analyse multivariée comme facteurs prédictifs de réactivation une maladie réfractaire aux corticostéroïdes et aux anti-TNF α , une exposition à des traitements immunomodulateurs et un âge supérieur à 30 ans (McCurdy et al. 2015). Cette étude permet de mettre en lumière l'utilisation des traitements immunosuppresseurs comme potentiels facteurs prédictifs de réactivation virale. Ainsi, la prise de corticostéroïdes semble faire consensus comme facteur pronostic de réactivation virale (Olaisen et al. 2014; Hirayama et al. 2016; H.-S. Lee et al. 2016; Nowacki et al. 2018; McCurdy et al. 2015; Maconi et al. 2005; Kuwabara et al. 2007; Yang et al. 2020).

Une méta-analyse de 2017 conclut à risque plus élevé de réactivation virale en cas de prise de corticoïde ou de thiopurine chez des patients atteints de MICI avec respectivement un odds ratio (OR) de 2,05 (95% IC : 1,40-2,99) et de 1,56 (95% IC : 1,01-2,39) mais une absence de surrisque de réactivation en cas de traitement par anti-TNF α avec un OR de 1,44 (95% IC : 0,93-2,24) (Shukla et al. 2016). Cependant cette méta-analyse compile des études chez des patients atteints de RCH, de MC ou de MICI « indéterminées » avec un diagnostic de colite à HCMV basé sur la sérologie HCMV-IgM, la PCR sanguine, l'antigénémie pp65, l'histologie (H&E), l'IHC ou la PCR tissulaire.

Concernant les facteurs pronostiques biologiques, la baisse de l'hémoglobine est retrouvée en analyse univariée comme un facteur pronostique de réactivation virale (Nowacki et al. 2018; Zagórowicz et al. 2016), tout comme une hypo-albuminémie (Yang et al. 2020). Une publication a montré, en analyse multivariée, qu'une numération sanguine de leucocytes inférieure à $11 \times 10^9/L$ (OR=4.49 : 95% IC 1,15–21,79 : p=0.041) serait un facteur pronostique de réactivation de HCMV (Gauss et al. 2015) tout comme l'hypoéosinophilie (Yang et al. 2020).

Comme nous venons de le détailler, plusieurs études se sont intéressées aux facteurs pronostiques de réactivation de HCMV dans les poussées des MICI mais l'identification de

facteurs clairs, s'ils existent, restent encore à démontrer en menant des études plus robustes sur le plan méthodologique. Les différences immunologiques entre les 2 entités de MICI et la fréquence de réactivation plus importante de HCMV dans la RCH par rapport à la MC nous orientent à étudier spécifiquement une cohorte de patients atteints de RCH. De plus, le diagnostic de colite à HCMV ou de réactivation virale dans la littérature a utilisé plusieurs techniques n'ayant pas le même niveau de sensibilité. Il semblerait que seul l'IHC et la qPCR soient acceptables pour poser ce diagnostic et dicter la prise en charge. Dans ce contexte, une cohorte monocentrique rétrospective au CHU de Saint Etienne a été investiguée afin d'essayer de trouver les facteurs pronostiques de réactivation de HCMV, ou plus précisément, les facteurs de non réactivation virale puisque l'intérêt principal pour le patient serait d'éviter une endoscopie.

II. Recherche de facteurs prédictifs dans la cohorte de patients suivis dans le service de gastro-entérologie du CHU de Saint Etienne

« Predictive factors of cytomegalovirus colonic reactivation in patients with active ulcerative colitis »

Article en préparation : des analyses statistiques supplémentaires sont en cours avant soumission au journal *Inflammatory Bowel Diseases*.

Résumé

La rectocolite hémorragique (RCH) peut entraîner une inflammation qui participe à la réactivation du réservoir latent du cytomégalovirus (CMV). Nous avons précédemment montré que la colite associée au CMV joue un rôle péjoratif dans l'évolution clinique de la RCH. Le diagnostic de la colite à CMV nécessite l'analyse des marqueurs viraux dans les biopsies intestinales prélevées lors d'une endoscopie. Cependant, ces analyses sont invasives, coûteuses et moins de 30 % des poussées aiguës de RCH réfractaires aux corticoïdes sont associées à la colite à CMV. Afin d'éviter une endoscopie aux patients et ses coûts engendrés, nous avons mené une étude rétrospective pour examiner si des facteurs prédictifs d'absence de colite à CMV pouvaient être identifiés dans une cohorte de patients consultant à l'Hôpital Universitaire de Saint-Etienne, France. Les caractéristiques individuelles (sexe, âge au moment du diagnostic de la RCH et au moment de la poussée), l'activité de la maladie, les traitements immunosuppresseurs et la charge virale tissulaire de CMV ont été recueillies au moment de la poussée de la RCH. Les facteurs potentiels

associés à l'absence de colite à CMV ont été analysés à l'aide d'un modèle linéaire généralisé à effets mixtes. Nous avons inclus un total de 171 patients atteints de RCH (l'âge médian était de 32 ans et 56 % des patients étaient des hommes), représentant 323 poussées. Alors que le score endoscopique de Mayo ≥ 2 (OR 0,40, IC à 95 % 0,12-1,13, $p=0,08$) et la présence d'ulcères (OR 0,22, IC à 95 % 0,04-0,97, $p=0,046$) ont été identifiés comme des facteurs prédictifs potentiels de l'absence de réactivation du CMV en analyses univariées, aucun n'a été considéré comme facteur indépendant dans l'analyse multivariée. Sur la base de ces résultats, il semble difficile de prédire une poussée aiguë associée à une colite à CMV sans avoir recours à une endoscopie pour évaluer l'activité de la maladie.

Predictive factors of cytomegalovirus colonic reactivation in patients with active ulcerative colitis

Alexandre Jentzer MD^{1,*}, Céline Chapelle PhD², Edouard Ollier MD PhD², Xavier Roblin MD^{1,3}, Pauline Veyrard MD^{1,3}, Sébastien Fauteux-Daniel PhD⁴, Arnauld Garcin⁵, Thomas Bourlet PharmD, PhD^{1,6}, Silvy Laporte MD PhD², Bruno Pozzetto MD PhD^{1,6}, Sylvie Pillet PharmD PhD^{1,6}

1 CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, GIMAP team, Univ Lyon, Univ St-Etienne, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, UCBL1, St-Etienne, France.

2 Clinical Innovation and Pharmacology Research Unit, CHU Saint-Étienne, Saint-Étienne, France - SAINBIOSE INSERM U1059, Jean Monnet University, Saint Etienne, France

3 Department of Gastroenterology, University-Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 02, France

4 French Blood Establishment Auvergne-Rhône-Alpes, Scientific Department, Saint-Étienne, France.

5 Clinical Research, Innovation and Pharmacology Unit (URCIP), Saint-Etienne University Hospital; SNA/EPIS, Faculty of Medicine Jacques Lisfranc, Saint-Etienne

6 Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University-Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 02, France

*Present address: Laboratory of Immunology, University Hospital of Montpellier

Corresponding author: sylvie.pillet@univ-st-etienne.fr - Tel.: +33-4-77-82-81-22

No conflict of interest is to be declared

Abstract

Background: Cytomegalovirus (CMV)-associated colitis plays a pejorative role in UC. Its diagnosis requires viral markers detection in intestinal biopsies sampled during endoscopy, i.e. invasive and cost-expansive analyses. Moreover, less than 30% of acute flare-ups in steroid-refractory UC are associated with CMV colitis.

Methods: This retrospective study aimed to examine whether predictive factors of absence of CMV colitis could be identified in a cohort of patients consulting at the University Hospital of Saint-Etienne, France. Patient characteristics, disease activity, immunosuppressive treatment and tissue CMV DNA load were collected at the time of UC flare-up. Factors potentially associated with absence of CMV colitis were analyzed using a generalized linear mixed-effects model with a random intercept.

Results: A total of 171 UC patients were included; 25% of them exhibited positive CMV DNA load in at least one inflamed biopsy. Univariate analysis found Mayo endoscopic score (OR 0.40, 95% CI 0.12-1.13, $p=0.08$) and presence of ulcers (OR 0.22, 95% CI 0.04-0.97, $p=0.046$) as putative predictive factors in the whole study population; considering the CMV seropositive subgroup, male gender (0.34, 95% CI 0.09-0.97, $p=0.04$), age at biopsy sampling (0.98, 95% CI 0.94-1.01, $p=0.09$), Mayo endoscopic score ≥ 2 (0.36, 95% CI 0.17-0.65, $p=0.001$) and the presence of ulceration (0.23, 95% CI 0.08-0.54, $p=0.001$) were identified in univariate analysis. However, none was considered as independent factor in the multivariate analysis.

Conclusions: Based on these results, it seems difficult to predict an acute flare-up associated with CMV colitis without requiring endoscopy to assess disease activity.

Keywords: cytomegalovirus-associated colitis, ulcerative colitis, predictive factors, intestinal biopsies, cost reduction, accurate diagnosis

Introduction

Cytomegalovirus (CMV) is a human opportunistic virus of the *Betaherpesviridae* subfamily. It infects monocytes, endothelial cells, hematopoietic progenitors and others cells disseminated in tissues¹ that serve as viral reservoirs, especially at the latent state. Although the infection is most often contained by the immune system of immunocompetent individuals, CMV infection can severely impair the function of targeted organs such as brain, lung and digestive tract. CMV-associated disease is especially common in immunocompromised patients². CMV reactivation in patients suffering of ulcerative colitis (UC) mainly results in CMV-associated colitis, which dramatically worsens the prognosis by “adding fuel to the fire”³. Indeed, CMV tissue reactivation can worsen the clinical course of the intestinal inflammatory disease with an association to more severe disease, resistance to immunotherapy, an increased risk of hospitalization, of colectomy and mortality in UC patients^{4,5}. CMV-associated colitis reflects the particular pejorative role of CMV in UC patients^{4,6–11}.

The diagnostic of CMV-associated colitis is accomplished by the detection of viral markers directly in the sampled biopsies, as indicated in British¹² and European guidelines¹³: immunohistochemistry (IHC) or tissue quantitative PCR are currently recommended, the molecular approach showing a better sensitivity⁴. However, these analyses are invasive, cost-expansive and less than 30% of acute flare-ups of steroid refractory UC are associated with CMV colitis^{6,14}. To reduce endoscopy procedures and associated costs, several studies have highlighted predictive factors of CMV colitis in UC patients. Patients with a pancolitis have been identified at risk for CMV colitis^{15–17}. High Mayo endoscopic score¹⁸ is also a risk factor for CMV colitis^{17,19–21} as well as the presence of mucosa ulcers²². Other studies have evaluated the role of immunosuppressive therapies in CMV reactivation and, as expected, corticosteroids-based therapy is associated with an increased risk of CMV associated colitis^{15,17,20–25} whereas anti-TNF administration is not^{26–28}. It has also been found that UC patients with CMV colitis exhibit lower rates of hemoglobin^{21,29}, albumin^{17,29}, leucocytes³⁰ and eosinophils counts¹⁷. Altogether, the previous studies revealed interesting elements that could participate to better identify the risk of CMV-associated colitis in patients suffering from UC acute flare-up. Nevertheless, the studied populations were often heterogenous mixing UC and Crohn’s disease (CD)^{16,22,25,30–32}, whereas CMV infection does not significantly impact CD clinical course^{6,7,33}. Furthermore, disparate diagnostic techniques of CMV reactivation were used^{15–17,30}, such as serological tests, IHC, blood or tissue quantitative PCR, with variable sensitivities and specificities⁸.

The aim of this retrospective study was to evaluate clinical and endoscopic factors in a cohort of UC patients consulting for flare-up in order to identify predictive factors of CMV colitis.

Materials and Methods

Study design and patients

Consecutive UC patients consulting for moderate to-severe active UC based on the European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) guidelines¹³ at the department of Gastroenterology of the University Hospital of Saint-Etienne between January 2014 and December 2019 were included in this retrospective study. All patients underwent a rectosigmoidoscopy with sampling of 2 biopsies for CMV DNA load determination as previously described³⁴. The analyses for controlling a same flare-up were excluded from this study.

All patient characteristics were recorded at the time of the analyzed flare-up. The severity and extent of the disease were assessed from patient records using the Mayo endoscopic score¹⁸ and Montreal classification of extent of UC³⁵, respectively. The presence of ulceration during endoscopy was also noted. Immunosuppressive therapies (corticosteroids, 5-Aminosalicylic acid, azathioprine, methotrexate, purine synthesis inhibitors, calcineurin, tacrolimus, anti-JAK [Janus kinase] and monoclonal therapies such as anti-*tumor necrosis factor alpha* (TNF α), anti-integrin, ustekinumab) were also recorded. Steroid dependence was defined by the inability to reduce the dose of oral steroid below 10 mg/day. Refractoriness to steroid was defined by the absence of clinical remission despite a full dose of corticosteroid therapy (0.75 mg/kg/day). Biological parameters were also recorded but as they were lacking in more than 10% of the cases, they were not analyzed.

CMV qPCR and CMV serology

CMV DNA load was quantified by real-time polymerase chain reaction (also called quantitative PCR, qPCR) in 2 samples of inflamed tissue as previously described^{6,34}. CMV-associated colitis was defined by a viral load superior to 5 international units (IU)/100,000 cells in at least one biopsy of the sampled inflamed intestinal tissue³⁴. Anti-CMV IgG and IgM were detected by using Architect i2000sr Immunoassay analyzer (Abbott) or Vidas (bioMérieux); the result was considered positive (previous infection by CMV) according to the supplier's thresholds.

Statistical Analysis

Study population characteristics are reported as means \pm standard deviation (SD) for continuous variables, and number and percentages for categorical variables. The statistical analysis was firstly focused on all patients and secondarily in the seropositive (IgG+) subgroup. Univariate analysis was performed to screen for potential factors associated with absence of CMV colitis using a generalized linear mixed-effects model with a random intercept. Variables with a P value less than 0.15 were entered into the final multiple linear mixed-effects model analysis which provided odds ratio (OR) and corresponding 95% confidence interval (95% CI). In multivariate analysis, variables were selected on the following basis: 1) p-value <0.15 in univariate analysis, 2) prevalence >3%, 3) clinical relevance and 4) less than 10% of missing data. Factors with a P value less than 0.05 in the multivariate analysis were considered as independent factors associated with absence of CMV reactivation. P-value < 0.05 was statistically significant. Statistical analyses were performed using the SAS-Windows® software version 9.4 (SAS Institute Inc).

Ethical considerations

The study protocol was approved by the institutional review board of Saint-Etienne University Hospital (Reference number: IRBN1442020/CHUSTE).

Results

Patient characteristics

The study was carried out on 171 UC patients with a total of 323 acute flares-up (Figure 1). Patients with a positive CMV DNA load in the inflamed biopsy accounted for a total of 79 flares-up (24.5%); all presented a past CMV infection (IgG positive) at the time of biopsy. Of 244 colitis relapses with negative CMV DNA load (75.5%), 101 had a positive CMV serology, 97 had a negative CMV serology and for 46 the CMV status was unknown (Figure 1). None of the patients for which serological status could be determined exhibited positive IgM.

The patient characteristics are listed in Table 1. The mean age at UC diagnosis was 36.6 years. We observed a severe disease activity including a Mayo endoscopic score of 3 in 157

UC flare-ups and pancolitis in 154 UC flare-ups. A steroid dependence was found for 106 flare-ups (32.9%) and 60 flare-ups (18.6%) were steroid refractory. The most frequent treatments were anti-TNF α monoclonal antibodies (37.8%) and 5-aminosalicylic acid (5-ASA) (21.1%), followed by purine synthesis inhibitors (8.7%), and anti-integrin monoclonal antibodies in a small fraction of cases (2.2%).

Univariate and multivariate analyzes in the whole population

All statistical data of the studied variables are detailed in Table 2. Whereas Mayo endoscopic score ≥ 2 (OR 0.40, 95% CI 0.12-1.13, $p=0.08$) and presence of ulcers (OR 0.22, 95% CI 0.04-0.97, $p=0.046$) were identified as putative predictive factors of CMV colitis in univariate analysis, none were considered as independent factor in multivariate analysis. Pancolitis, which classifies UC at a severe state, was not found as a predictive factor. Gender, number of relapses per patient, age at biopsy or disease duration were also not predictive factors of absence of CMV colitis. The therapy regimen could not be associated with absence of CMV colitis: neither steroid dependence (1.55, 95% CI 0.26-12.87, $p=0.64$) nor steroid-refractory (0.77, 95% CI 0.07-11.46, $p=0.83$), and therapeutics such as 5-ASA, purine synthesis inhibitors, anti-TNF α monoclonal antibodies and anti-integrin monoclonal antibodies were found statistically significant.

Univariate and multivariate analyzes in the patients previously infected by CMV

As CMV colitis can only be observed in previously infected patients (who exhibit IgG against CMV), a similar analysis was performed in this subgroup of patients (Table 3). Male gender (0.34, 95% CI 0.09-0.97, $p=0.04$), age at biopsy sampling (0.98, 95% CI 0.94-1.01, $p=0.09$), Mayo endoscopic score ≥ 2 (0.36, 95% CI 0.17-0.65, $p=0.001$) and the presence of ulceration (0.23, 95% CI 0.08-0.54, $p=0.001$) were identified as putative predictive factors of CMV colitis in univariate analysis. None of these factors were found statistically significant in multivariate analysis in this subgroup.

Discussion

CMV colitis is diagnosed using specific markers (IHC or tissue qPCR as recommended¹³) directly in the sampled biopsies obtained from endoscopy, an invasive and cost intensive

analysis. Thus, the identification of risk factors of CMV reactivation could provide the means to reduce the need for biopsies.

In our study, none of the included patient exhibited primary CMV infection, this systemic infections being mostly severe in adults particularly in immunocompromised patient^{8,36}. Our study includes a homogeneous population with significant recruitment and CMV DNA load quantified by real-time polymerase chain reaction in biopsies as recommended¹³ which makes it possible to have sufficient statistical power and to avoid methodological bias. Several characteristics were studied in the whole population of patients included, as well in a subgroup of patients presenting IgG positives against CMV and being consequently at risk of CMV colitis occurring during acute inflammation of flare-up. Of note, more predictive factors could be highlighted in this subgroup of patients (Table 3), even if none of them was shown as statistically significant in the multivariate analysis.

First characteristics described in the literature to be associated with CMV infection is age > 30 years^{22,30}. Both retrospective studies were performed on a limited number of patients and mixed UC and CD. We show that the age at biopsy sampling was not associated to absence of CMV colitis both in the whole cohort and in the IgG anti-CMV positive subgroup. Male sex was more frequent in the colitis subgroup, but multivariate analysis could not show its association as statistically significant.

Previous studies showed that a severe active disease represented by a high Mayo endoscopic score^{16,20,21}, the presence of ulcers^{15,22,37} or a pancolitis^{15,16} are associated to CMV reactivation. Our study has identified Mayo endoscopic score and presence of ulcers, in the entire cohort and in the subgroup analysis, as predictive factors of CMV reactivation in univariate analyzes only. Moreover, pancolitis which classifies the pathology at a severe state, was not found as a predictive factor of CMV colitis in our study. This pitfall could be explained by the retrospective character of the study, and very severe diseases could have been missed, surgery being performed before sampling biopsies for CMV evaluation. The study's constraints was also to have performed at least 2 biopsies for CMV detection and it was not always the case in all the patients that consulted during the study period at the University Hospital of Saint-Etienne, missing around 30% of the patients (data not shown).

Regarding immunotherapies, steroid dependence and steroid refractory were not associated with viral colitis in our study, possibly due to the administration of a low dose of steroid at the time of the biopsy and an early switch to other immunotherapies now available to treat UC flare-up. Indeed, steroid-induced immunosuppression is known to lead to CMV reactivation only at high doses or during long lasting treatment^{15,17,20}. Of note, anti-TNF α monoclonal

antibodies use was not a predictive factor of CMV reactivation in this study, which is coherent with the literature^{15,17,22,27,31}.

In the literature several blood markers such as hemoglobin²¹, albumin^{15,17} and eosinopenia¹⁷ were considered as predictive factors of CMV reactivation but with contradictory results. In our retrospective cohort, biological markers of interest were recorded such as complete blood count, C reactive protein (CRP) level and liver function markers but could not be exploited due to more than 10% of missing data. This weakness of this retrospective study in which no standard guidelines for laboratory tests in the context of CMV-associated colitis should be assessed in a next prospective study.

Conclusion

Based on these results, it seems difficult to predict an acute flare-up associated with CMV colitis without requiring endoscopy to assess disease activity. We can although recommend performing first CMV serology to determine if intestinal latent CMV infection that occurred after a previous CMV infection could reactivate to induce CMV associated colitis, with IgG negative patients presenting no such risk (except in the course of primary infection). It is urgent to test other easy-to-perform and well-accepted markers of CMV reactivation to predict CMV colitis without need of biopsy. Future research may also focus on the specific anti-CMV response immunity: this has been poorly explored so far^{38,39} but can help classifying patients at high risk of viral colitis.

Acknowledgments

All the patients who accepted to participate to the study.

Bibliography

1. Collins-McMillen D, Buehler J, Peppenelli M, et al. Molecular determinants and the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Viruses*. 2018;10.
2. Varani S, Landini MP. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae*. 2011;2:6.
3. Nakase H, Honzawa Y, Toyonaga T, et al. Diagnosis and treatment of ulcerative colitis with cytomegalovirus infection: importance of controlling mucosal inflammation to prevent cytomegalovirus reactivation. *Intest Res*. 2014;12:5–11.

4. Jentzer A, Veyrard P, Roblin X, et al. Cytomegalovirus and inflammatory bowel diseases (IBD) with a special focus on the link with ulcerative colitis (UC). *Microorganisms*. 2020;8.
5. Hendler SA, Barber GE, Okafor PN, et al. Cytomegalovirus infection is associated with worse outcomes in inflammatory bowel disease hospitalizations nationwide. *Int J Colorectal Dis*. 2020;35:897–903.
6. Roblin X, Pillet S, Oussalah A, et al. Cytomegalovirus load in inflamed intestinal tissue is predictive of resistance to immunosuppressive therapy in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:2001–2008.
7. Pillet S, Pozzetto B, Jarlot C, et al. Management of cytomegalovirus infection in inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis*. 2012;44:541–548.
8. Pillet S. Cytomegalovirus and ulcerative colitis: Place of antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22:2030.
9. Nguyen M, Bradford K, Zhang X, et al. Cytomegalovirus reactivation in ulcerative colitis patients. *Ulcers*. 2011;2011.
10. Domènech E, Vega R, Ojanguren I, et al. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis: a prospective, comparative study on prevalence and diagnostic strategy. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:1373–1379.
11. Grossberg LB, Ezaz G, Grunwald D, et al. A national survey of the prevalence and impact of cytomegalovirus infection among hospitalized patients with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol*. 2018;52:241–245.
12. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2019.
13. Kucharzik T, Ellul P, Greuter T, et al. ECCO guidelines on the prevention, Diagnosis, and management of infections in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2021;15:879–913.
14. Tun GSZ, Raza M, Hale MF, et al. Polymerase chain reaction for detection of mucosal cytomegalovirus infection in patients with acute ulcerative colitis. *Ann Gastroenterol*. 2019;32:81–87.
15. Hirayama Y, Ando T, Hirooka Y, et al. Characteristic endoscopic findings and risk factors for cytomegalovirus-associated colitis in patients with active ulcerative colitis. *World J Gastrointest Endosc*. 2016;8:301–309.
16. Kishore J, Ghoshal U, Ghoshal UC, et al. Infection with cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease: prevalence, clinical significance and outcome. *Journal of Medical Microbiology*. 2004;53:1155–1160.
17. Yang H, Wu K, Zhang H, et al. IgA, albumin, and eosinopenia as early indicators of cytomegalovirus infection in patients with acute ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol*. 2020;20:294.
18. Mohammed Vashist N, Samaan M, Mosli MH, et al. Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;1:CD011450.
19. Clos-Parals A, Rodríguez-Martínez P, Cañete F, et al. Prognostic value of the burden of cytomegalovirus colonic reactivation evaluated by immunohistochemical staining in patients with active ulcerative colitis. *J Crohns Colitis*. 2019;13:385–388.
20. Lee H-S, Park SH, Kim S-H, et al. Risk factors and clinical outcomes associated with cytomegalovirus colitis in patients with acute severe ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis*. 2016;22:912–918.
21. Nowacki TM, Bettenworth D, Meister T, et al. Novel score predicts risk for cytomegalovirus infection in ulcerative colitis. *J. Clin. Virol*. 2018;105:103–108.
22. McCurdy JD, Jones A, Enders FT, et al. A model for identifying cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2015;13:131-137;

23. Olaisen M, Rydning A, Martinsen TC, et al. Cytomegalovirus infection and postoperative complications in patients with ulcerative colitis undergoing colectomy. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49:845–852.
24. Maconi G, Colombo E, Zerbi P, et al. Prevalence, detection rate and outcome of cytomegalovirus infection in ulcerative colitis patients requiring colonic resection. *Dig Liver Dis*. 2005;37:418–423.
25. Kuwabara A, Okamoto H, Suda T, et al. Clinicopathologic characteristics of clinically relevant cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2007;42:823–829.
26. Kopylov U, Papamichael K, Katsanos K, et al. Impact of Infliximab and Cyclosporine on the Risk of Colectomy in Hospitalized Patients with Ulcerative Colitis Complicated by Cytomegalovirus-A Multicenter Retrospective Study. *Inflamm. Bowel Dis*. 2017;23:1605–1613.
27. Nakase H, Chiba T. TNF-alpha is an important pathogenic factor contributing to reactivation of cytomegalovirus in inflamed mucosa of colon in patients with ulcerative colitis: lesson from clinical experience. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:550–551.
28. Pillet S, Jarlot C, Courault M, et al. Infliximab Does Not Worsen Outcomes During Flare-ups Associated with Cytomegalovirus Infection in Patients with Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis*. 2015;21:1580–1586.
29. Zagórowicz E, Bugajski M, Wieszczy P, et al. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis is related to severe inflammation and a high count of cytomegalovirus-positive cells in biopsy is a risk factor for colectomy. *J Crohns Colitis*. 2016;10:1205–1211.
30. Gauss A, Rosenstiel S, Schnitzler P, et al. Intestinal cytomegalovirus infection in patients hospitalized for exacerbation of inflammatory bowel disease: a 10-year tertiary referral center experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015;27:712–720.
31. Campos ST, Portela FA, Tomé L. Cytomegalovirus, inflammatory bowel disease, and anti-TNFα. *Int J Colorectal Dis*. 2017;32:645–650.
32. Tosca J, Garcia N, Pascual I, et al. Clinical assessment of risk factors for infection in inflammatory bowel disease patients. *Int J Colorectal Dis*. 2020;35:491–500.
33. Roblin X, Pillet S, Berthelot P, et al. Prevalence of cytomegalovirus infection in steroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis*. 2012;18:E1396-1397.
34. Pillet S, Williet N, Pouvaret A, et al. Distribution of Cytomegalovirus DNA Load in the Inflamed Colon of Ulcerative Colitis Patients. *Am J Gastroenterol*. 2016;111:439–441.
35. Roda G, Narula N, Pinotti R, et al. Systematic review with meta-analysis: proximal disease extension in limited ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;45:1481–1492.
36. Gugliesi F, Coscia A, Griffante G, et al. Where do we stand after decades of studying human cytomegalovirus? *Microorganisms*. 2020;8.
37. Suzuki H, Kato J, Kuriyama M, et al. Specific endoscopic features of ulcerative colitis complicated by cytomegalovirus infection. *World J Gastroenterol*. 2010;16:1245–1251.
38. Nowacki TM, Bettenworth D, Ross M, et al. Cytomegalovirus (CMV)-Specific Perforin and Granzyme B ELISPOT Assays Detect Reactivation of CMV Infection in Inflammatory Bowel Disease. *Cells*. 2012;1:35–50.
39. Ciccocioppo R, Mengoli C, Betti E, et al. Human Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus specific immunity in patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Med*. 2021;21:379–388.

Tables and figures

Figure 1: Flowchart of the study.

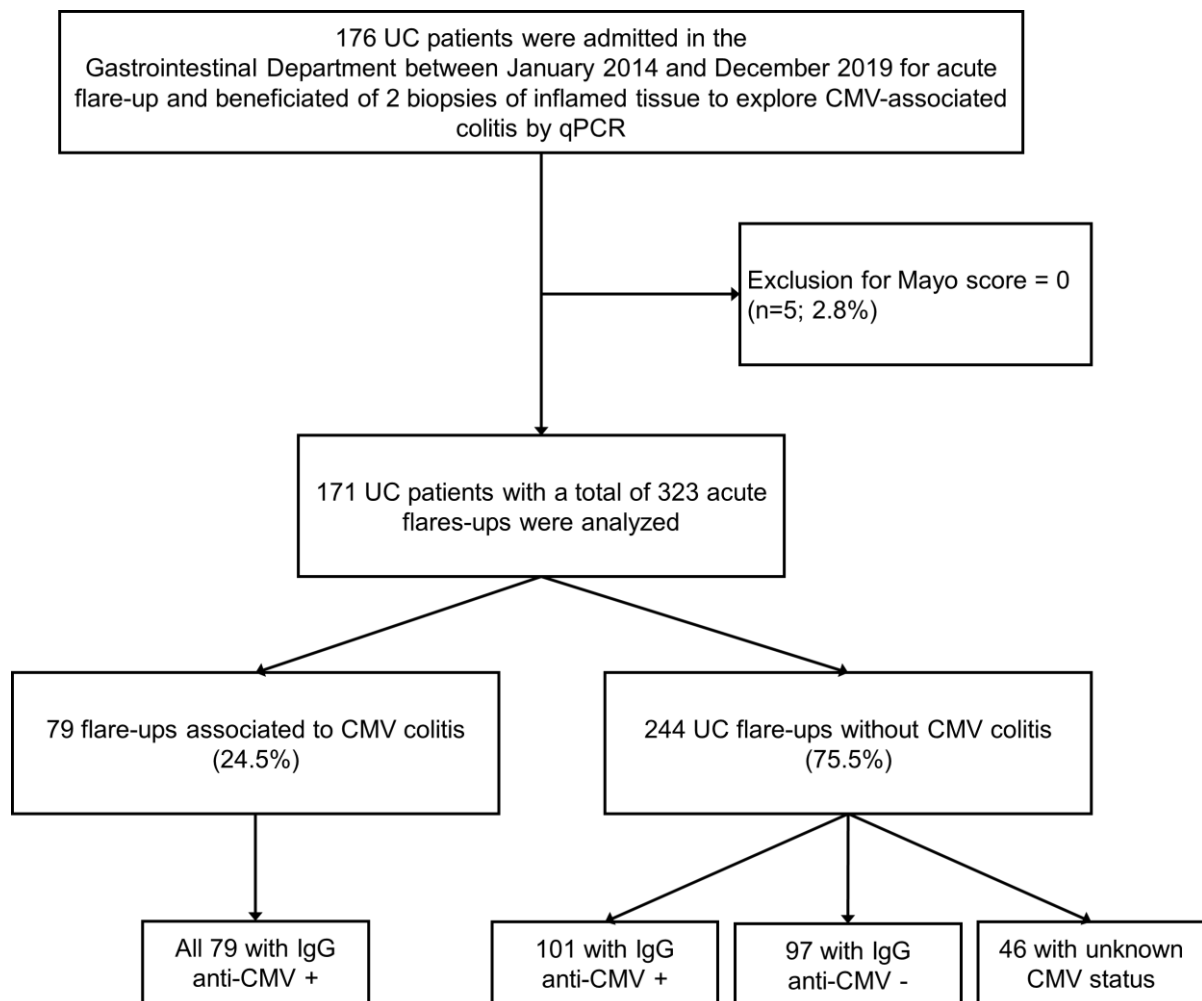


Table 1: Characteristics of flare-ups of ulcerative colitis (UC) according to the presence of cytomegalovirus (CMV)-associated colitis.

Characteristics	Absence of CMV colitis	Presence of CMV colitis
Number of patients*	143	47
Number of male (%)	72 (50.3%)	31 (66%)
Mean of age at biopsy (yr, range)	43.7 (15-96)	48 (20-88)
Number of UC flare-ups	244	79
<i>Disease description</i>		
Mean number of relapses per patient range)	1.87 (1-9)	2.23 (1-7)
Mean of age at UC diagnosis (yr, range)	35.59 (7-92)	40.51 (14-84)
Mean of disease duration at the time of biopsy (yr, range)	8.29 (0-35)	7.85 (0-23)
Mayo endoscopic score (number, %)		
1	36 (14.8%)	6 (8%)
2	102 (41.8%)	22 (27.9%)
3	106 (43.4%)	51 (64.6%)
Presence of ulcerations (number, %)	102 (41.8%)	52 (65.8%)
Montreal classification (number, %)		
E1 (proctitis)	29 (11.9%)	6 (8%)
E2 (left-sided colitis)	103 (42.2%)	30 (38%)
E3 (pancolitis)	111 (45.5%)	43 (54.4%)
<i>Detection of CMV DNA in at least one biopsy of inflamed tissue</i>		
Number	0	79
Mean viral load expressed as IU/100,000 cells (range)	-	6092 (5-159733)
<i>Therapeutics used at the time of flare-up (number, %)</i>		
Steroid dependence	72 (29.5%)	34 (43%)
Steroid refractory	48 (19.7%)	12 (15.2%)
5-ASA	54 (22.1%)	14 (17.7%)
Methotrexate	2 (0.8%)	1 (1.3%)
Purine synthesis inhibitors	18 (7.4%)	10 (12.7%)
Anti-TNF α monoclonal antibodies	89 (27.5%)	33 (41.8%)
Anti-integrin monoclonal antibodies	40 (36.5%)	13 (16.5%)
Anti-JAK	2 (0.8%)	14 (17.7%)
Calcineurin or tacrolimus	8 (3.3%)	2 (2.5%)
Mean number of molecules in therapeutic failure (range)	2.15 (0-7)	2.41 (0-6)
Mean number of failed therapeutic classes (range)	1.86 (0-5)	2 (0-4)

Yr: year; IU: international units, ASA: 5-Aminosalicylic acid, TNF α : tumor necrosis factor alpha; JAK: Janus kinase. *a patient can present several flare-ups in the course of the study, with a CMV status different between flare-ups.

Table 2: Predictive factors of CMV non-reactivation in univariate and multivariate analyzes.

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Male	0.39 (0.03-3.57)	p=0.40	-	-
Number of relapses per patient	0.93 (0.36-2.36)	p=0.87	-	-
Age at biopsy	0.97 (0.91-1.04)	p=0.36	-	-
Duration of the disease at the biopsy	1.01 (0.89-1.19)	p=0.85	-	-
Mayo endoscopic score ≥ 2	0.40 (0.12-1.13)	p=0.08	0.70 (0.16-2.90)	p=0.63
Pancolitis	0.44 (0.04-3.18)	p=0.31	-	-
Presence of ulceration	0.22 (0.04-0.97)	p=0.046	0.31 (0.03-2.30)	p=0.27
Steroid dependence	1.55 (0.26-12.87)	p=0.64	-	-
Steroid-refractory	0.77 (0.07-11.46)	p=0.83	-	-
Treatments apart from steroid	0.40 (0.08-1.72)	p=0.22	-	-
Treatment by 5-ASA	0.50 (0.09-2.55)	p=0.40	-	-
Treatment by purine synthesis inhibitors	1.04 (0.15-9.31)	p=0.95	-	-
Treatment by anti-TNF α monoclonal antibodies	0.89 (0.29-2.80)	p=0.84	-	-
Treatment by anti-integrin monoclonal antibodies	1.34 (0.34-5.72)	p=0.68	-	-

This table represents the studied variables for predictive factors of absence of CMV reactivation in univariate and multivariate analyzes. Odds Ratio (OR) with confidence interval (95% CI) and p value are shown. An OR<1 represents a risk factor of viral reactivation and an OR>1 represents a protective factor. A p<0.15 is applied in univariate analysis to select significant variables for multivariate analysis. A p<0.05 in the multivariate analysis is used to consider significant independent factors associated with absence of CMV reactivation.

Table 3: Predictive factors of CMV non-reactivation in univariate and multivariate analyzes in the CMV seropositive subgroup.

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Male	0.34 (0.09-0.97)	p=0.04	0.40 (0.12-1.09)	p=0.09
Number of relapses per patient	0.95 (0.70-1.27)	p=0.69	-	-
Age at biopsy	0.98 (0.94-1.01)	p=0.09	0.99 (0.9-61.01)	P=0.35
Duration of the disease at the biopsy	1.01 (0.95-1.09)	p=0.78	-	-
Mayo endoscopic score \geq 2	0.36 (0.17-0.65)	p=0.001	0.61 (0.23-1.47)	p=0.27
Pancolitis	0.70 (0.22-2.04)	p=0.19	-	-
Presence of ulceration	0.23 (0.08-0.54)	p=0.001	0.41 (0.10-1.46)	p=0.17
Steroid dependence	0.94 (0.37-2.71)	p=0.91	-	-
Steroid-refractory	0.70 (0.14-3.20)	p=0.63	-	-
Treatments apart from steroid	0.45 (0.13-1.34)	p=0.16	-	-
Treatment by 5-ASA	0.79 (0.24-2.30)	p=0.66	-	-
Treatment by purine synthesis inhibitors	0.44 (0.10-1.81)	p=0.25	-	-
Treatment by anti-TNFα monoclonal antibodies	0.87 (0.40-2.03)	p=0.74	-	-
Treatment by anti-integrin monoclonal antibodies	1.69 (0.58-5.31)	p=0.35	-	-

This table represents the studied variables for predictive factors of absence of CMV colitis in univariate and multivariate analyzes in the CMV seropositive subgroup. Odds Ratio (OR) with confidence interval (95% CI) and p value are shown. An OR<1 represents a risk factor of viral colitis and an OR>1 represents a protective factor. A p<0.15 is applied in univariate analysis to select significant variables for multivariate analysis. A p<0.05 in the multivariate analysis is used to consider significant independent factors associated with absence of CMV colitis.

III. Place du test QuantiFERON-CMV

Dans ce contexte, un projet présenté en Annexe 2 a été financé par le CHU de Saint-Etienne lors d'un Appel à Projet Local (AOL). Les inclusions sont actuellement encore en cours, et aucune analyse en cours d'inclusion n'est autorisée par le département de statistiques. Cet AOL permet la collaboration des départements de gastro-entérologie de Saint Etienne et de Lyon, et les services de Virologie, d'Immunologie et d'Anatomopathologie centrés autour du test QuantiFERON-CMV (QF-CMV, Qiagen).

Plusieurs études menées chez les patients transplantés [greffes d'organe (Kumar et al. 2009; Manuel et al. 2013) ou greffe de CSH (Yong et al. 2017)] et les patients en unité de soins intensifs (Castón et al. 2016) montrent qu'un test QF-CMV positif rendrait compte d'une bonne immunité cellulaire spécifique anti-HCMV par rapport à un test QF-CMV négatif, permettant de définir des populations à fort ou à faible risque de réactivation virale avec pour objectif l'adaptation de la prophylaxie anti-HCMV des patients greffés (Weclawiak et al. 2010; Sood et al. 2015). Il n'existe actuellement aucune publication dans laquelle le test QF-CMV a été utilisé au cours des MICI. Les patients atteints de RCH sont considérés comme immunodéprimés en raison de leur pathologie et de leurs traitements immunosuppresseurs. Le risque de réactivation de CMV est ainsi majoré même si l'immunosuppression n'est pas équivalente à la population des patients greffés ou hospitalisés en soins intensifs.

Actuellement, aucune étude n'a évalué le test QF-CMV chez des patients atteints de RCH afin d'analyser le risque de réactivation virale. Néanmoins, 2 études comportant un effectif réduit ont évalué l'immunité cellulaire par *enzyme-linked immunospot* dans les MICI concluant à un intérêt de ce test afin d'évaluer et de surveiller l'immunité lymphocytaire T spécifique (Ciccocioppo et al. 2021; Nowacki et al. 2012). Dans l'étude de Nowacki et coll., 32 patients atteints de MICI et 15 sujets sains ont été évalués retrouvant des LT spécifiques anti-CMV activés chez les patients atteints de la MC et de RCH en particulier lors de poussées de ces maladie (Nowacki et al. 2012). Ciccocioppo et coll. ont inclus 24 patients atteints de RCH, dont 10 patients en échec thérapeutique, et 26 sujets sains. Aucune différence de réponse lymphocytaire spécifique anti-HCMV n'a été observée entre les groupes (Ciccocioppo et al. 2021) probablement due à un faible nombre de patients et un manque d'analyse en sous groupe parmi les patients séropositifs.

Une étude prospective monocentrique débutée au CHU de Saint Etienne et au CHU de Lyon en 2019 dont l'objectif d'inclusion est de 196 patients séropositifs pour HCMV (IgG+) souffrant de poussées modérées à sévères de RCH et visant à évaluer l'intérêt d'un test sanguin : le test QF-CMV. Très brièvement, le test QF-CMV permet d'évaluer la réponse du

système immunitaire lymphocytaire T CD8 à HCMV. Il est composé d'un tube témoin négatif, d'un tube témoin positif, et d'un tube contenant les peptides immunodominants de HCMV (pp65, gB, IE1, etc...). Ces peptides, après apprêtement au CMH de classe I par les CPA, activent les LT CD8 puis un test ELISA de l'IFN- γ est effectué sur plasma afin de mesurer ce degré d'activation lymphocytaire reflet de la réponse immunitaire cellulaire anti-HCMV.

L'hypothèse de cette étude est que les patients atteints de RCH, séropositifs pour CMV et présentant une réponse immunitaire cellulaire anti-HCMV inefficace ou insuffisante, sont à risque de réactiver le virus lors de la poussée inflammatoire. Le test QF-CMV permettrait de mesurer ce niveau d'immunosuppression et d'évaluer le risque de réactivation virale du patient avec un risque de réactivation de CMV en cas de protection immunitaire insuffisante ; en corollaire, il permettrait d'éviter des biopsies coliques pour l'analyse des marqueurs viraux, acte invalidant et coûteux, chez les patients présentant une réponse cellulaire anti-CMV efficace.

L'objectif principal de cette étude originale est de déterminer le seuil de performance du test QF-CMV pour prédire la réactivation colique à HCMV diagnostiquée par analyse en qPCR de biopsies inflammatoires coliques chez les patients présentant une poussée de RCH.

Cette étude permettra également d'évaluer la concordance des résultats obtenus entre l'analyse des biopsies coliques en qPCR et la détection des cellules infectées par IHC afin de diagnostiquer la réactivation colique de HCMV. Il est initialement prévu de contrôler le test QF-CMV à 14 semaines du premier dosage afin de mesurer l'évolution de l'état immunitaire anti-CMV après la survenue de la poussée inflammatoire.

Ainsi le test QF-CMV pourrait être proposé aux patients afin d'évaluer leur risque de réactivation virale : ils pourraient d'être classés en fort ou faible risque de réactivation colique de HCMV et la prise en charge des patients lors des poussées pourraient être adaptée.

Ce projet mené au sein du CHU de Saint Etienne a une place de choix dans la recherche et la compréhension de facteurs pronostiques fiables de réactivation virale sur lesquels les cliniciens pourraient s'appuyer afin d'améliorer la prise en charge des patients.

IV. Discussion

Cette partie clinique de la thèse s'est concentrée sur l'aspect prédictif de la réactivation de HCMV chez les patients atteints de RCH. Devant un rôle péjoratif de la réactivation virale sur la morbi-mortalité des colites et l'impact sur l'efficacité thérapeutique, la clarification des

facteurs prédictifs de réactivation de HCMV chez les patients atteints de RCH semble une piste préventive intéressante.

La recherche des facteurs prédictifs de réaction virale dans une étude de cohorte rétrospective de 171 patients du CHU de Saint Etienne n'a malheureusement pas permis de mettre en avant des variables statistiquement significatives après analyse multivariée. Notre cohorte s'est concentrée uniquement sur les patients atteints de RCH pour lesquels une recherche par qPCR de HCMV sur biopsies coliques avait été demandée. Le diagnostic de colite à HCMV et la focalisation sur ces patients atteints de RCH ont permis de s'affranchir des biais de recrutement précédemment évoqués dans la littérature. Malheureusement, cette cohorte étalée sur 5 ans a souffert de données incomplètes rendant les analyses des bilans biologiques impossibles (calprotectine fécale, *C-reactive protein*, numération et formule sanguine...). Afin de palier à ce manque de données, une étude de cohorte prospective permettrait d'assurer la présence de la totalité des données biologiques.

Un test biologique potentiellement prometteur, le QF-CMV, est en cours d'étude au CHU de Saint-Etienne et pourrait aider à la classification des patients à faible ou à fort risque de réactivation virale. Ce test biologique à l'avantage, par rapport aux autres bilans biologiques « classiques » et aux variables étudiées dans notre publication, d'être spécifique de HCMV et de refléter l'état de l'immunité cellulaire anti-HCMV. Une fois les inclusions achevées nous serons plus à même de conclure sur l'intérêt de ce test comme facteur prédictif de la réactivation virale dans le cadre de patients en poussée de RCH.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La thèse s'est composée de 3 parties correspondant à 3 axes de recherche comprenant la modélisation *in vitro* de l'infection à HCMV dans le tissu intestinal, la modélisation *in vivo* de l'infection à CMV dans la RCH avec un modèle murin de colite induite par le DSS et l'étude des facteurs prédictifs de la réactivation colique de HCMV chez les patients atteints de RCH en poussée.

Les expérimentations *in vitro* avaient pour objectif la production de virions de HCMV à partir d'une souche virale permettant d'infecter une lignée cellulaire épithéliale intestinale Caco-2 afin de modéliser l'infection de HCMV au niveau de l'épithélium intestinal. Des difficultés concernant la transfection virale n'ont pas permis la production de virions infectants à partir des HFFF malgré les 3 techniques de transfection utilisées et les multiples conditions répétées. En l'absence de production virale, le projet de modélisation d'infection de la lignée Caco-2 n'a pu aboutir dans le cadre de ma thèse. Des mises au points ultérieures sont envisagées notamment en faisant appel à l'équipe de Henri Gruffat du CIRI qui a l'habitude de manipuler les BAC des herpès.

Les expérimentations *in vivo* avaient pour objectifs la mise en place et l'étude d'un modèle murin de réactivation de CMV dans le cadre d'une poussée de colite d'une RCH-like. Ce modèle aurait pu être utilisé comme moyen d'étude pré-clinique pour les médicaments antiviraux anti-CMV et le développement de nouvelles stratégies vaccinales anti-CMV. Initialement, il avait été prévu de développer une vaccination thérapeutique par voie muqueuse IgA médiée (Rochereau et al. 2015) anti-MCMV qui pourrait permettre l'élimination du réservoir viral digestif et de diminuer les conséquences sur la colite. Dans cette stratégie originale de vaccination, le vaccin pourrait être composé d'analogues protéiques de MCMV de la pp65 (protéine majeure du tégument et antigène majeur du CMV), de IE1 une protéine *starter* de la réplication virale, ou de la gB (glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale) (Klenerman et Oxenius 2016) couplées à une immunoglobuline d'isotype A sécrétoire (SIgA). Cette association protéines immunogènes et SIgA peut être administrée par voie orale et présentée aux cellules immuno-compétentes de la muqueuse intestinale par mécanisme de transcytose inverse c'est-à-dire par passage de la lumière intestinale vers la muqueuse par les cellules M via le récepteur *Dectin-1* et le corécepteur *Siglec-5* (Rochereau et al. 2013).

Ainsi, le développement de colite induite par le DSS chez les souris BALB/c infectées par MCMV a été maîtrisé mais notre modèle n'a ni retrouvé de réactivation virale lors de la détection par qPCR ni par IHC. Dans la littérature, les modèles murins de réactivation virale intestinale de MCMV restent discutés et peu reproductibles. Ainsi, le modèle d'étude murin de RCH avec réactivation virale de CMV pourrait être supplanté par d'autres modèles plus complexes afin de se rapprocher de la physiopathologie humaine. D'autres pistes précédemment évoquées consisteraient à étudier *in vivo* soit HCMV dans des modèles de souris humanisées (Crawford et al. 2017) en s'affranchissant des différences entre MCMV et HCMV soit RhCMV dans des modèles de primates non humains (Itell et al. 2017) dont l'induction de poussée RCH-*like* reste encore à développer.

Une autre piste consiste en l'exploitation de cellules intestinales humaines mises en culture *ex vivo* afin de proposer une structure épithéliale complète composée des cellules de Paneth, des cellules caliciformes, des entérocytes et des cellules entéroendocrines (Leushacke et Barker 2014). Les modèles d'organoïdes intestinaux sont principalement dérivés de la culture de cellules souches des cryptes intestinales ou des cellules souches pluripotentes différenciées. Actuellement, les organoïdes sont essentiellement développés autour de la complexification de l'épithélium et n'incluent ni les cellules de soutien mésenchymateuses ni les cellules immunitaires présentes dans les muqueuses (Angus et al. 2019). L'autre difficulté de ce type de culture réside dans l'apport du microbiote dont on sait l'importance dans la physiopathologie de la RCH (Angus et al. 2019). Ainsi, les modèles d'organoïdes pourraient devenir un modèle « gold standard » dans l'étude de la relation RCH/CMV si le développement des tissus de soutien et des cellules immunitaires était apporté aux actuels modèles d'épithélium intestinaux.

En plus des modèles expérimentaux, l'étude de la relation entre les réactivations de HCMV et les patients atteints de RCH nous a intéressés et particulièrement la tentative de mise en lumière de facteurs prédictifs de réactivation virale. Actuellement, il semble difficile de classer les patients à fort ou à faible risque de colite à HCMV en se basant sur des variables cliniques ou thérapeutiques de routine. Le projet en cours, concernant l'évaluation du système immunitaire cellulaire anti-HCMV par le test QuantiFERON-CMV, semble très prometteur et permettra peut-être d'ouvrir une voie de prise en charge ciblée des patients atteints de RCH séropositifs pour HCMV. En effet, si les résultats permettent de classer les patients à fort ou à faible risque de réactivation virale, un traitement antiviral pourrait alors être donné précocement lors de poussée de RCH sans attendre les analyses des biopsies coliques aux patients à fort risque de réactivation et les biopsies pourraient être évitées pour les autres. En allant plus loin dans cette voie, une étude supplémentaire évaluant un

traitement prophylactique au long cours anti-HCMV, comme cela se pratique chez les patients greffés, pourrait également être envisagée chez les patients ayant une réponse immunitaire cellulaire anti-HCMV très faible retrouvée par le test QuantiFERON-CMV avec un état d'immunosuppression important.

Finalement, par ces 3 axes intégrant des approches expérimentales *in vitro*, *in vivo* murine, et une étude épidémiologique chez l'Homme, même si ces résultats produits sont décevants à ce jour, cette thèse aura permis d'encadrer la relation entre le CMV et la RCH avec des perspectives de développement dans chacune de ces parties.

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, Alex M., Chao Yang, Monica S. Thakar, et Subramaniam Malarkannan. 2018. « Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization ». *Frontiers in Immunology* 9: 1869.
- Adler, S. P., S. A. Plotkin, E. Gonczol, M. Cadoz, C. Meric, J. B. Wang, P. Dellamonica, et al. 1999. « A Canarypox Vector Expressing Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Primes for Antibody Responses to a Live Attenuated CMV Vaccine (Towne) ». *The Journal of Infectious Diseases*
- Adler, S. P., S. E. Starr, S. A. Plotkin, S. H. Hempfling, J. Buis, M. L. Manning, et A. M. Best. 1995. « Immunity Induced by Primary Human Cytomegalovirus Infection Protects against Secondary Infection among Women of Childbearing Age ». *The Journal of Infectious Diseases* 171 (1): 26-32.
- Adler, Stuart P., Nicole Lewis, Anthony Conlon, Mark P. Christiansen, Mohamed Al-Ibrahim, Richard Rupp, Tong-Ming Fu, et al. 2019. « Phase 1 Clinical Trial of a Conditionally Replication-Defective Human Cytomegalovirus (CMV) Vaccine in CMV-Seronegative Subjects ». *The Journal of Infectious Diseases* 220 (3): 411-19.
- Adler, Stuart P., Anne-Marie Manganello, Ronzo Lee, Michael A. McVoy, Daniel E. Nixon, Stanley Plotkin, Edward Mocarski, et al. 2016. « A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimera Vaccines in Cytomegalovirus–Seronegative Men ». *The Journal of Infectious Diseases* 214 (9): 1341-48.
- Ahn, K., A. Gruhler, B. Galocha, T. R. Jones, E. J. Wiertz, H. L. Ploegh, P. A. Peterson, Y. Yang, et K. Früh. 1997. « The ER-Luminal Domain of the HCMV Glycoprotein US6 Inhibits Peptide Translocation by TAP ». *Immunity* 6 (5): 613-21.
- Alain, Sophie, et Isabelle Garrigue. 2019. « Cytomégalovirus ». In *Traité de Virologie Médicale*, 2ème édition, 239-56. Paris: Société Française de Microbiologie.
- Alex, Philip, Nicholas C. Zachos, Thuan Nguyen, Liberty Gonzales, Tian-E. Chen, Laurie S. Conklin, Michael Centola, et Xuhang Li. 2009. « Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-Induced Colitis ». *Inflammatory Bowel Diseases* 15 (3): 341-52.
- Allchin, W. H. 1909. « A Discussion on "Ulcerative Colitis.": Introductory Address ». *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 2 (Med Sect): 59-75.
- Almeqdadi, Mohammad, Miyeko D. Mana, Jatin Roper, et Ömer H. Yilmaz. 2019. « Gut organoids: mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 317 (3): C405-19.
- Al-Zafiri, Raed, Adrian Gologan, Polymnia Galiatsatos, et Andrew Szilagyi. 2012. « Cytomegalovirus Complicating Inflammatory Bowel Disease: A 10-Year Experience in a Community-Based, University-Affiliated Hospital ». *Gastroenterology & Hepatology* 8 (4): 230-39.
- Amarapurkar, Anjali D., Deepak N. Amarapurkar, Pravin Rathi, Prabha Sawant, Nikhil Patel, Praful Kamani, Krishnakant Rawal, et al. 2018. « Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Multi-Center Study ». *Indian Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology* 37 (3): 189-95.
- Angus, Hamish C. K., A. Grant Butt, Michael Schultz, et Roslyn A. Kemp. 2019. « Intestinal Organoids as a Tool for Inflammatory Bowel Disease Research ». *Frontiers in Medicine* 6: 334.
- Ashiru, Omodele, Neil J. Bennett, Louise H. Boyle, Mair Thomas, John Trowsdale, et Mark R. Wills. 2009. « NKG2D Ligand MICA Is Retained in the cis-Golgi Apparatus by Human Cytomegalovirus Protein UL142 ». *Journal of Virology* 83 (23): 12345-54.
- Avdic, Selmir, John Z. Cao, Allen K. L. Cheung, Allison Abendroth, et Barry Slobedman. 2011. « Viral Interleukin-10 Expressed by Human Cytomegalovirus during the Latent Phase of Infection Modulates Latently Infected Myeloid Cell Differentiation ▽ ». *Journal of Virology* 85 (14): 7465-71.
- Azad Khan, A. K., J. Piris, et S. C. Truelove. 1977. « An Experiment to Determine the Active Therapeutic Moiety of Sulphasalazine ». *Lancet (London, England)* 2 (8044): 892-95.
- Bailey, Michael T., Harald Engler, et John F. Sheridan. 2006. « Stress Induces the Translocation of Cutaneous and Gastrointestinal Microflora to Secondary Lymphoid Organs of C57BL/6 Mice ». *Journal of Neuroimmunology* 171 (1-2): 29-37.
- Balthesen, M., M. Messerle, et M. J. Reddehase. 1993. « Lungs Are a Major Organ Site of Cytomegalovirus Latency and Recurrence ». *Journal of Virology* 67 (9): 5360-66.

- Barreau, F., L. Ferrier, J. Fioramonti, et L. Bueno. 2004. « Neonatal Maternal Deprivation Triggers Long Term Alterations in Colonic Epithelial Barrier and Mucosal Immunity in Rats ». *Gut* 53 (4): 501-6.
- Baumgart, Daniel C., et William J. Sandborn. 2007. « Inflammatory Bowel Disease: Clinical Aspects and Established and Evolving Therapies ». *Lancet (London, England)* 369 (9573): 1641-57.
- Beaugerie, Laurent, Magali Svrcek, Philippe Seksik, Anne-Marie Bouvier, Tabassome Simon, Matthieu Allez, Hedia Brixi, et al. 2013. « Risk of Colorectal High-Grade Dysplasia and Cancer in a Prospective Observational Cohort of Patients with Inflammatory Bowel Disease ». *Gastroenterology* 145 (1): 166-175.e8.
- Bego, Mariana, J. Maciejewski, S. Khaiboullina, G. Pari, et S. St Jeor. 2005. « Characterization of an Antisense Transcript Spanning the UL81-82 Locus of Human Cytomegalovirus ». *Journal of Virology* 79 (17): 11022-34.
- Beisser, P. S., L. Laurent, J. L. Virelizier, et S. Michelson. 2001. « Human Cytomegalovirus Chemokine Receptor Gene US28 Is Transcribed in Latently Infected THP-1 Monocytes ». *Journal of Virology* 75 (13): 5949-57.
- Bekiaris, Vasileios, Olga Timoshenko, Tie Zheng Hou, Kai Toellner, Saba Shakib, Fabrina Gaspal, Fiona M. McConnell, et al. 2008. « Ly49H+ NK Cells Migrate to and Protect Splenic White Pulp Stroma from Murine Cytomegalovirus Infection ». *The Journal of Immunology* 180 (10): 6768-76.
- Berencsi, K., Z. Gyulai, E. Gönczöl, S. Pincus, W. I. Cox, S. Michelson, L. Kari, et al. 2001. « A Canarypox Vector-Expressing Cytomegalovirus (CMV) Phosphoprotein 65 Induces Long-Lasting Cytotoxic T Cell Responses in Human CMV-Seronegative Subjects ». *The Journal of Infectious Diseases* 183 (8): 1171-79.
- Bernstein, David I., Flor M. Munoz, S. Todd Callahan, Richard Rupp, Susan H. Wootton, Kathryn M. Edwards, Christine B. Turley, et al. 2016. « Safety and Efficacy of a Cytomegalovirus Glycoprotein B (gB) Vaccine in Adolescent Girls: a Randomized Clinical Trial ». *Vaccine* 34 (3): 313-19.
- Bernstein, David I., Elizabeth A. Reap, Kevin Katen, Aubrey Watson, Kaitlin Smith, Pamela Norberg, Robert A. Olmsted, et al. 2009. « Randomized, Double-Blind, Phase 1 Trial of an Alphavirus Replicon Vaccine for Cytomegalovirus in CMV Seronegative Adult Volunteers ». *Vaccine* 28 (2): 484-93.
- Berry, Richard, Gabrielle M. Watson, Stipan Jonjic, Mariapia A. Degli-Esposti, et Jamie Rossjohn. 2020. « Modulation of Innate and Adaptive Immunity by Cytomegaloviruses ». *Nature Reviews. Immunology* 20 (2): 113-27.
- Bhan, A. K., E. Mizoguchi, R. N. Smith, et A. Mizoguchi. 2000. « Spontaneous Chronic Colitis in TCR Alpha-Mutant Mice; an Experimental Model of Human Ulcerative Colitis ». *International Reviews of Immunology* 19 (1): 123-38.
- Boehme, Karl W., Mario Guerrero, et Teresa Compton. 2006. « Human Cytomegalovirus Envelope Glycoproteins B and H Are Necessary for TLR2 Activation in Permissive Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (10): 7094-7102.
- Boer, Nanne K. H. de, Laurent Peyrin-Biroulet, Bindia Jharap, Jeremy D. Sanderson, Berrie Meijer, Imke Atreya, Murray L. Barclay, et al. 2018. « Thiopurines in Inflammatory Bowel Disease: New Findings and Perspectives ». *Journal of Crohn's & Colitis* 12 (5): 610-20.
- Boirivant, Monica, Ivan J. Fuss, Alan Chu, et Warren Strober. 1998. « Oxazolone Colitis: A Murine Model of T Helper Cell Type 2 Colitis Treatable with Antibodies to Interleukin 4 ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (10): 1929-39.
- Bonaz, Bruno L., et Charles N. Bernstein. 2013. « Brain-Gut Interactions in Inflammatory Bowel Disease ». *Gastroenterology* 144 (1): 36-49.
- Bourne, G. 1926. « Chronic Ulcerative Colitis in Children ». *Archives of Disease in Childhood* 1 (3): 175-81.
- Boyle, Kathleen A., et Teresa Compton. 1998. « Receptor-Binding Properties of a Soluble Form of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B ». *Journal of Virology* 72 (3): 1826-33.
- Bradley, Amanda J., Nell S. Lurain, Peter Ghazal, Urmi Trivedi, Charles Cunningham, Katarina Baluchova, Derek Gatherer, Gavin W. G. Wilkinson, Derrick J. Dargan, et Andrew J. Davison. 2009. « High-Throughput Sequence Analysis of Variants of Human Cytomegalovirus Strains Towne and AD169 ». *The Journal of General Virology* 90 (Pt 10): 2375-80.
- Brunson, Jerry L., Felix Becker, et Karen Y. Stokes. 2015. « The Impact of Primary and Persistent Cytomegalovirus Infection on the Progression of Acute Colitis in a Murine Model ».

Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology 22 (1): 31-37.

- Buehler, Jason, Ethan Carpenter, Sebastian Zeltzer, Suzu Igarashi, Michael Rak, Iliyana Mikell, Jay A. Nelson, et Felicia Goodrum. 2019. « Host Signaling and EGR1 Transcriptional Control of Human Cytomegalovirus Replication and Latency ». *PLoS Pathogens* 15 (11): e1008037.
- Burisch, Johan, Natalia Pedersen, Silvja Cukovic-Cavka, Niksa Turk, Ioannis Kaimakliotis, Dana Duricova, Olga Shonová, et al. 2014. « Initial Disease Course and Treatment in an Inflammatory Bowel Disease Inception Cohort in Europe: The ECCO-EpiCom Cohort ». *Inflammatory Bowel Diseases* 20 (1): 36-46.
- Cannon, Michael J., D. Scott Schmid, et Terri B. Hyde. 2010. « Review of Cytomegalovirus Seroprevalence and Demographic Characteristics Associated with Infection ». *Reviews in Medical Virology* 20 (4): 202-13.
- Castón, Juan José, Sara Cantisán, Francisco González-Gasca, Aurora Páez-Vega, Hasania Abdel-Hadi, Soledad Illescas, Gema Alonso, et Julián Torre-Cisneros. 2016. « Interferon- γ Production by CMV-Specific CD8+ T Lymphocytes Provides Protection against Cytomegalovirus Reactivation in Critically Ill Patients ». *Intensive Care Medicine* 42 (1): 46-53.
- Cattell, R. B. 1942. « CLOSURE OF ILEOSTOMY IN ULCERATIVE COLITIS ». *Annals of Surgery* 115 (6): 956-68.
- Cha, T. A., E. Tom, G. W. Kemble, G. M. Duke, E. S. Mocarski, et R. R. Spaete. 1996. « Human Cytomegalovirus Clinical Isolates Carry at Least 19 Genes Not Found in Laboratory Strains ». *Journal of Virology* 70 (1): 78-83.
- Chan, Shawna T., et Aaron C. Logan. 2017. « The Clinical Impact of Cytomegalovirus Infection Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Why the Quest for Meaningful Prophylaxis Still Matters ». *Blood Reviews* 31 (3): 173-83.
- Chassaing, Benoit, Gayathri Srinivasan, Maria A. Delgado, Andrew N. Young, Andrew T. Gewirtz, et Matam Vijay-Kumar. 2012. « Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation ». *PloS One* 7 (9): e44328.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchison, T. Kouzarides, et J. A. Martignetti. 1990. « Analysis of the Protein-Coding Content of the Sequence of Human Cytomegalovirus Strain AD169 ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 154: 125-69.
- Chen, Kaiwen, Matthew P. Cheng, Sarah P. Hammond, Hermann Einsele, et Francisco M. Marty. 2018. « Antiviral prophylaxis for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation ». *Blood Advances* 2 (16): 2159-75.
- Cherrier, Lauren, Aasya Nasar, Kellie J. Goodlet, Michael D. Nailor, Sofya Tokman, et Sunwen Chou. 2018. « Emergence of letermovir resistance in a lung transplant recipient with ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection ». *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 18 (12): 3060-64.
- Cheung, Allen K. L., David J. Gottlieb, Bodo Plachter, Sandra Pepperl-Klindworth, Selmir Avdic, Anthony L. Cunningham, Allison Abendroth, et Barry Slobedman. 2009. « The Role of the Human Cytomegalovirus UL111A Gene in Down-Regulating CD4+ T-Cell Recognition of Latently Infected Cells: Implications for Virus Elimination during Latency ». *Blood* 114 (19): 4128-37.
- Chien, Yueh-hsiu, Christina Meyer, et Marc Bonneville. 2014. « $\gamma\delta$ T Cells: First Line of Defense and Beyond ». *Annual Review of Immunology* 32 (1): 121-55.
- Chinen, Javier, et William T. Shearer. 2010. « Secondary Immunodeficiencies, Including HIV Infection ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 Suppl 2): S195-203.
- Chou, Sunwen. 2017. « A third component of the human cytomegalovirus terminase complex is involved in letermovir resistance ». *Antiviral research* 148 (décembre): 1-4.
- Ciccocioppo, Rachele, Caterina Mengoli, Elena Betti, Giuditta Comolli, Irene Cassaniti, Antonio Piralla, Peter Kruzliak, et al. 2021. « Human Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Specific Immunity in Patients with Ulcerative Colitis ». *Clinical and Experimental*
- Clos-Parals, Ariadna, Paula Rodríguez-Martínez, Fiorella Cañete, Míriam Mañosa, Alejandra Ruiz-Cerulla, M^a José Paúles, Jordina Llaó, et al. 2019. « Prognostic Value of the Burden of Cytomegalovirus Colonic Reactivation Evaluated by Immunohistochemical Staining in Patients with Active Ulcerative Colitis ». *Journal of Crohn's & Colitis* 13 (3): 385-88.

- Compton, Teresa, Evelyn A. Kurt-Jones, Karl W. Boehme, John Belko, Eicke Latz, Douglas T. Golenbock, et Robert W. Finberg. 2003. « Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-like Receptor 2 ». *Journal of Virology* 77 (8): 4588-96.
- Coudert, Jerome D., Christopher E. Andoniu, et Mariapia A. Degli-Esposti. 2010. « Chapter Thirty-Seven - Cytomegalovirus Infection and NK Cells ». In *Natural Killer Cells*, édité par Michael T. Lotze et Angus W. Thomson, 499-510. San Diego: Academic Press.
- Crawford, Lindsey B., Rebecca Tempel, Daniel N. Streblov, Craig Kreklywich, Patricia Smith, Louis J. Picker, Jay A. Nelson, et Patrizia Caposio. 2017. « Human Cytomegalovirus Induces Cellular and Humoral Virus-specific Immune Responses in Humanized BLT Mice ». *Scientific Reports* 7 (avril).
- Criscuoli, Valeria, Maria Rosa Rizzuto, Elena Gallo, Ambrogio Orlando, et Mario Cottone. 2015. « Toxic Megacolon and Human Cytomegalovirus in a Series of Severe Ulcerative Colitis Patients ». *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 66 (mai): 103-6.
- Crough, Tania, et Rajiv Khanna. 2009. « Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside ». *Clinical Microbiology Reviews* 22 (1): 76-98.
- D'Amico, Ferdinando, Tommaso Lorenzo Parigi, Gionata Fiorino, Laurent Peyrin-Biroulet, et Silvio Danese. 2019. « Tofacitinib in the Treatment of Ulcerative Colitis: Efficacy and Safety from Clinical Trials to Real-World Experience ». *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 12: 1756284819848631.
- Danese, Silvio, Janusz Rudziński, Wolfgang Brandt, Jean-Louis Dupas, Laurent Peyrin-Biroulet, Yoram Bouhnik, Dariusz Kleczkowski, et al. 2015. « Tralokinumab for Moderate-to-Severe UC: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase IIa Study ». *Gut* 64 (2): 243-49.
- Davison, Andrew J. 2010. « Herpesvirus systematics ». *Veterinary Microbiology* 143 (1-2): 52-69.
- . 2011. « Evolution of Sexually Transmitted and Sexually Transmissible Human Herpesviruses ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1230 (août): E37-49.
- Davison, Andrew J., Richard Eberle, Bernhard Ehlers, Gary S. Hayward, Duncan J. McGeoch, Anthony C. Minson, Philip E. Pellett, Bernard Roizman, Michael J. Studdert, et Etienne Thiry. 2009. « The Order Herpesvirales ». *Archives of Virology* 154 (1): 171-77.
- Day, Le Zhang, Cora Stegmann, Eric P. Schultz, Jean-Marc Lanchy, Qin Yu, et Brent J. Ryckman. 2020. « Polymorphisms in Human Cytomegalovirus Glycoprotein O (GO) Exert Epistatic Influences on Cell-Free and Cell-to-Cell Spread and Antibody Neutralization on GH Epitopes ». *Journal of Virology* 94 (8).
- De Fazio, Luigia, Elena Cavazza, Enzo Spisni, Antonio Strillacci, Manuela Centanni, Marco Candela, Chiara Praticò, Massimo Campieri, Chiara Ricci, et Maria Chiara Valerii. 2014. « Longitudinal analysis of inflammation and microbiota dynamics in a model of mild chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice ». *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20 (8): 2051-61.
- Déchanet, J., P. Merville, A. Lim, C. Retière, V. Pitard, X. Lafarge, S. Michelson, et al. 1999. « Implication of Gammadelta T Cells in the Human Immune Response to Cytomegalovirus ». *The Journal of Clinical Investigation* 103 (10): 1437-49.
- DeRoche, Tom C., Shu-Yuan Xiao, et Xiuli Liu. 2014. « Histological evaluation in ulcerative colitis ». *Gastroenterology Report* 2 (3): 178-92.
- Dinallo, Vincenzo, Irene Marafini, Davide Di Fusco, Federica Laudisi, Eleonora Franzè, Antonio Di Grazia, Michele M. Figliuzzi, et al. 2019. « Neutrophil Extracellular Traps Sustain Inflammatory Signals in Ulcerative Colitis ». *Journal of Crohn's & Colitis* 13 (6): 772-84.
- Dolan, Aidan, Charles Cunningham, Ralph D. Hector, Aycan F. Hassan-Walker, Lydia Lee, Clare Addison, Derrick J. Dargan, et al. 2004. « Genetic Content of Wild-Type Human Cytomegalovirus ». *The Journal of General Virology* 85 (Pt 5): 1301-12.
- Douglas, Cameron M., Richard Barnard, Daniel Holder, Randi Leavitt, Diane Levitan, Maureen Maguire, David Nickle, et al. 2020. « Letemovir Resistance Analysis in a Clinical Trial of Cytomegalovirus Prophylaxis for Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients ». *The Journal of Infectious Diseases* 221 (7): 1117-26.
- Dubois-Camacho, Karen, Payton A Ottum, Daniel Franco-Muñoz, Marjorie De la Fuente, Alejandro Torres-Riquelme, David Díaz-Jiménez, Mauricio Olivares-Morales, Gonzalo Astudillo, Rodrigo Quera, et Marcela A Hermoso. 2017. « Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel diseases: From clinical practice to molecular biology ». *World Journal of Gastroenterology* 23 (36): 6628-38.
- Dupont, Liane, Lily Du, Madeleine Poulter, Stephanie Choi, Megan McIntosh, et Matthew B. Reeves. 2019. « Src Family Kinase Activity Drives Cytomegalovirus Reactivation by Recruiting MOZ

- Histone Acetyltransferase Activity to the Viral Promoter ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (35): 12901-10.
- Eaden, J. A., K. R. Abrams, et J. F. Mayberry. 2001. « The Risk of Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis: A Meta-Analysis ». *Gut* 48 (4): 526-35.
- Eberhardt, Meghan K., Ashlesha Deshpande, W. L. William Chang, Stephen W. Barthold, Mark R. Walter, et Peter A. Barry. 2013. « Vaccination against a Virus-Encoded Cytokine Significantly Restricts Viral Challenge ». *Journal of Virology* 87 (21): 11323-31.
- Eichele, Derrick D, et Kusum K Kharbanda. 2017. « Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis ». *World Journal of Gastroenterology* 23 (33): 6016-29.
- Einsele, Hermann, Eddy Roosnek, Nathalie Rufer, Christian Sinzger, Susanne Riegler, Jürgen Löffler, Ulrich Grigoleit, et al. 2002. « Infusion of cytomegalovirus (CMV)–specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy ». *Blood* 99 (11): 3916-22.
- Elliott, David E., Jie Li, Arthur Blum, Ahmed Metwali, Khurram Qadir, Joseph F. Urban, et Joel V. Weinstock. 2003. « Exposure to Schistosome Eggs Protects Mice from TNBS-Induced Colitis ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 284 (3): G385-391.
- Esclatine, A., A. Bellon, S. Michelson, A. L. Servin, A. M. Quéro, et M. Géniteau-Legendre. 2001. « Differentiation-Dependent Redistribution of Heparan Sulfate in Epithelial Intestinal Caco-2 Cells Leads to Basolateral Entry of Cytomegalovirus ». *Virology* 289 (1): 23-33.
- Esclatine, A., M. Lemullois, A. L. Servin, A. M. Quero, et M. Geniteau-Legendre. 2000. « Human Cytomegalovirus Infects Caco-2 Intestinal Epithelial Cells Basolaterally Regardless of the Differentiation State ». *Journal of Virology* 74 (1): 513-17.
- Esposito, Susanna, Giulia Chiopris, Giulia Messina, Tiziana D'Alvano, Serafina Perrone, et Nicola Principi. 2021. « Prevention of Congenital Cytomegalovirus Infection with Vaccines: State of the Art ». *Vaccines* 9 (5): 523.
- Fairhurst, Natalie Grace, et Simon P. L. Travis. 2018. « Why Is It so Difficult to Evaluate Faecal Microbiota Transplantation as a Treatment for Ulcerative Colitis? ». *Intestinal Research* 16 (2): 209-15.
- Fan, Yi-Hsin, Sujayita Roy, Rupkatha Mukhopadhyay, Arun Kapoor, Priya Duggal, Genevieve L. Wojcik, Robert F. Pass, et Ravit Arav-Boger. 2016. « Role of Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1 (NOD1) and Its Variants in Human Cytomegalovirus Control in Vitro and in Vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (48): E7818-27.
- Feagan, Brian G., Paul Rutgeerts, Bruce E. Sands, Stephen Hanauer, Jean-Frédéric Colombel, William J. Sandborn, Gert Van Assche, et al. 2013. « Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis ». *New England Journal of Medicine* 369 (8): 699-710.
- Fefferman, David S., et Richard J. Farrell. 2005. « Endoscopy in Inflammatory Bowel Disease: Indications, Surveillance, and Use in Clinical Practice ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 3 (1): 11-24.
- Forster, Meghan R., Joanne Trgovcich, Peter Zimmerman, Alexander Chang, Cortland Miller, Paul Klenerman, et Charles H. Cook. 2010. « Antiviral Prevention of Sepsis Induced Cytomegalovirus Reactivation in Immunocompetent Mice ». *Antiviral Research* 85 (3): 496-503.
- Forte, Eleonora, Zheng Zhang, Edward B. Thorp, et Mary Hummel. 2020. « Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay with the Host Immune Response ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10.
- Forte, Eleonora, Suchitra Swaminathan, Mark W. Schroeder, Jeong Yeon Kim, Scott S. Terhune, et Mary Hummel. 2018. « Tumor Necrosis Factor Alpha Induces Reactivation of Human Cytomegalovirus Independently of Myeloid Cell Differentiation Following Posttranscriptional Establishment of Latency ». *MBio* 9 (5): e01560-18
- Frank, Daniel N., Allison L. St. Amand, Robert A. Feldman, Edgar C. Boedeker, Noam Harpaz, et Norman R. Pace. 2007. « Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (34): 13780-85.

- Fumery, Mathurin, Guillaume Savoye, Benjamin Pariente, Dominique Turck, et Corinne Gower-Rousseau. 2018. « Epidemiology and natural history of inflammatory bowel disease: 30 years of epimad registry ». *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive* 25 (2): 145-52.
- Furman, Margo H., Neelendu Dey, Domenico Tortorella, et Hidde L. Ploegh. 2002. « The Human Cytomegalovirus US10 Gene Product Delays Trafficking of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules ». *Journal of Virology* 76 (22): 11753-56.
- Fuss, I. J., M. Neurath, M. Boirivant, J. S. Klein, C. de la Motte, S. A. Strong, C. Fiocchi, et W. Strober. 1996. « Disparate CD4+ Lamina Propria (LP) Lymphokine Secretion Profiles in Inflammatory Bowel Disease. Crohn's Disease LP Cells Manifest Increased Secretion of IFN-Gamma, Whereas Ulcerative Colitis LP Cells Manifest Increased Secretion of IL-5. » *The Journal of Immunology* 157 (3): 1261-70.
- Gan, S. Ian, et P. L. Beck. 2003. « A New Look at Toxic Megacolon: An Update and Review of Incidence, Etiology, Pathogenesis, and Management ». *The American Journal of Gastroenterology* 98 (11): 2363-71.
- Gauss, Annika, Simon Rosenstiel, Paul Schnitzler, Ulf Hinz, Tobias Rehlen, Martina Kadmon, Robert Eehalt, Wolfgang Stremmel, et Anna Zawierucha. 2015. « Intestinal Cytomegalovirus Infection in Patients Hospitalized for Exacerbation of Inflammatory Bowel Disease: A 10-Year Tertiary Referral Center Experience ». *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 27 (6): 712-20.
- Geremia, Alessandra, Paolo Biancheri, Philip Allan, Gino R. Corazza, et Antonio Di Sabatino. 2014. « Innate and Adaptive Immunity in Inflammatory Bowel Disease ». *Autoimmunity Reviews* 13 (1): 3-10.
- Gerlach, Katharina, YouYi Hwang, Alexej Nikolaev, Raja Atreya, Heike Dornhoff, Stefanie Steiner, Hans-Anton Lehr, et al. 2014. « TH9 Cells That Express the Transcription Factor PU.1 Drive T Cell-Mediated Colitis via IL-9 Receptor Signaling in Intestinal Epithelial Cells ». *Nature Immunology* 15 (7): 676-86.
- Gerna, Giuseppe, et Daniele Lillieri. 2019. « Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection/Re-Infection: Development of a Protective HCMV Vaccine ». *The New Microbiologica* 42 (1): 1-20.
- Goldmacher, Victor S., Laura M. Bartle, Anna Skaletskaya, Cheryl A. Dionne, Nancy L. Kedersha, Carol A. Vater, Jia-wen Han, et al. 1999. « A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (22): 12536-41.
- Goodman, A. L., C. D. Murray, J. Watkins, P. D. Griffiths, et D. P. Webster. 2015. « CMV in the Gut: A Critical Review of CMV Detection in the Immunocompetent Host with Colitis ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 34: 13.
- Goodrum, Felicia, Matthew Reeves, John Sinclair, Kevin High, et Thomas Shenk. 2007. « Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro ». *Blood* 110 (3): 937-45..
- Griffiths, Paul D., Anna Stanton, Erin McCarrell, Colette Smith, Mohamed Osman, Mark Harber, Andrew Davenport, et al. 2011. « Cytomegalovirus Glycoprotein-B Vaccine with MF59 Adjuvant in Transplant Recipients: A Phase 2 Randomised Placebo-Controlled Trial ». *Lancet (London, England)* 377 (9773): 1256-63.
- Gugliesi, Francesca, Alessandra Coscia, Gloria Griffante, Ganna Galitska, Selina Pasquero, Camilla Albano, et Matteo Biolatti. 2020. « Where Do We Stand after Decades of Studying Human Cytomegalovirus? » *Microorganisms* 8 (5).
- Günther, Claudia, Eva Martini, Nadine Wittkopf, Kerstin Amann, Benno Weigmann, Helmut Neumann, Maximilian J. Waldner, et al. 2011. « Caspase-8 Regulates TNF- α -Induced Epithelial Necroptosis and Terminal Ileitis ». *Nature* 477 (7364): 335-39.
- Guo, Xiao Yan, Xin Juan Liu, et Jian Yu Hao. 2020. « Gut Microbiota in Ulcerative Colitis: Insights on Pathogenesis and Treatment ». *Journal of Digestive Diseases* 21 (3): 147-59.
- Ha, Sha, Fengsheng Li, Matthew C. Troutman, Daniel C. Freed, Aimin Tang, John W. Loughney, Dai Wang, et al. 2017. « Neutralization of Diverse Human Cytomegalovirus Strains Conferred by Antibodies Targeting Viral GH/GL/PUL128-131 Pentameric Complex ». *Journal of Virology* 91 (7).
- Hahn, Gabriele, Maria Grazia Revello, Marco Patrone, Elena Percivalle, Giulia Campanini, Antonella Sarasini, Markus Wagner, et al. 2004. « Human Cytomegalovirus UL131-128 Genes Are Indispensable for Virus Growth in Endothelial Cells and Virus Transfer to Leukocytes ». *Journal of Virology* 78 (18): 10023-33.

- Hakki, Morgan, et Sunwen Chou. 2011. « The biology of cytomegalovirus drug resistance ». *Current opinion in infectious diseases* 24 (6): 605-11.
- Halary, Franck, Vincent Pitard, Dorota Dlubek, Roman Krzysiek, Henri de la Salle, Pierre Merville, Claire Dromer, Dominique Emilie, Jean-François Moreau, et Julie Déchanet-Merville. 2005. « Shared Reactivity of V δ 2(Neg) $\gamma\delta$ T Cells against Cytomegalovirus-Infected Cells and Tumor Intestinal Epithelial Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 201 (10): 1567-78.
- Halwachs-Baumann, G., M. Wilders-Truschning, G. Desoye, T. Hahn, L. Kiesel, K. Klingel, P. Rieger, G. Jahn, et C. Sinzger. 1998. « Human Trophoblast Cells Are Permissive to the Complete Replicative Cycle of Human Cytomegalovirus ». *Journal of Virology* 72 (9): 7598-7602.
- Hammer, Quirin, Timo Rückert, Eva Maria Borst, Josefine Dunst, André Haubner, Pawel Durek, Frederik Heinrich, et al. 2018. « Peptide-Specific Recognition of Human Cytomegalovirus Strains Controls Adaptive Natural Killer Cells ». *Nature Immunology* 19 (5): 453-63.
- Hantz, Sébastien, Françoise Garnier-Geoffroy, Marie-Christine Mazon, Isabelle Garrigue, Pierre Merville, Catherine Mengelle, Lionel Rostaing, et al. 2010. « Drug-Resistant Cytomegalovirus in Transplant Recipients: A French Cohort Study ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (12): 2628-40.
- Hantz, Sébastien, Léa Moret, et Sophie Alain. 2019. « Prise en charge de l'infection à cytomégalovirus en transplantation ». *Revue Francophone des Laboratoires* 2019 (515): 36-43.
- Harbord, Marcus, Vito Annesse, Stephan R. Vavricka, Matthieu Allez, Manuel Barreiro-de Acosta, Kirsten Muri Boberg, Johan Burisch, et al. 2016. « The First European Evidence-Based Consensus on Extra-Intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Crohn's & Colitis* 10 (3): 239-54.
- Harbord, Marcus, Rami Eliakim, Dominik Bettenworth, Konstantinos Karmiris, Konstantinos Katsanos, Uri Kopylov, Torsten Kucharzik, et al. 2017. « Third European Evidence-Based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management ». *Journal of Crohn's & Colitis* 11 (7): 769-84.
- Harusato, A., H. Abo, V. L. Ngo, S. W. Yi, K. Mitsutake, S. Osuka, J. E. Kohlmeier, et al. 2017. « IL-36 γ Signaling Controls the Induced Regulatory T Cell-Th9 Cell Balance via NF κ B Activation and STAT Transcription Factors ». *Mucosal Immunology* 10 (6): 1455-67.
- Hauso, Øyvind, Tom Christian Martinsen, et Helge Waldum. 2015. « 5-Aminosalicylic Acid, a Specific Drug for Ulcerative Colitis ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 50 (8): 933-41.
- Heieren, M. H., Y. K. Kim, et H. H. Balfour. 1988. « Human Cytomegalovirus Infection of Kidney Glomerular Visceral Epithelial and Tubular Epithelial Cells in Culture ». *Transplantation* 46 (3): 426-32.
- Heller, Frank, Peter Florian, Christian Bojarski, Jan Richter, Melanie Christ, Bernd Hillenbrand, Joachim Mankertz, et al. 2005. « Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution ». *Gastroenterology* 129 (2): 550-64.
- Heller, Frank, Ivan J. Fuss, Edward E. Nieuwenhuis, Richard S. Blumberg, et Warren Strober. 2002. « Oxazolone Colitis, a Th2 Colitis Model Resembling Ulcerative Colitis, Is Mediated by IL-13-Producing NK-T Cells ». *Immunity* 17 (5): 629-38.
- Herbein, Georges. 2018. « The Human Cytomegalovirus, from Oncomodulation to Oncogenesis ». *Viruses* 10 (8): E408.
- Hibi, Toshifumi, et Haruhiko Ogata. 2006. « Novel Pathophysiological Concepts of Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Gastroenterology* 41 (1): 10-16
- Hirayama, Yutaka, Takafumi Ando, Yoshiki Hirooka, Osamu Watanabe, Ryoji Miyahara, Masanao Nakamura, Takeshi Yamamura, et Hidemi Goto. 2016. « Characteristic Endoscopic Findings and Risk Factors for Cytomegalovirus-Associated Colitis in Patients with Active Ulcerative Colitis ». *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy* 8 (6): 301-9.
- Ho, Monto. 2008. « The History of Cytomegalovirus and Its Diseases ». *Medical Microbiology and Immunology* 197 (2): 65-73.
- Hotchkiss, R. S., K. W. Tinsley, P. E. Swanson, R. E. Schmieg, J. J. Hui, K. C. Chang, D. F. Osborne, et al. 2001. « Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4 $^{+}$ T Lymphocytes in Humans ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (11): 6952-63.
- Hsu, Kimberly M., Jennifer R. Pratt, Walter J. Akers, Samuel I. Achilefu, et Wayne M. Yokoyama. 2009. « Murine Cytomegalovirus Displays Selective Infection of Cells within Hours after Systemic Administration ». *The Journal of general virology* 90 (Pt 1): 33-43.

- Hudson, J. B., D. G. Walker, et M. Altamirano. 1988. « Analysis in Vitro of Two Biologically Distinct Strains of Murine Cytomegalovirus ». *Archives of Virology* 102 (3-4): 289-95.
- Humar, A., D. Snyderman, et AST Infectious Diseases Community of Practice. 2009. « Cytomegalovirus in Solid Organ Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 Suppl 4 (décembre): S78-86.
- Humby, Monica S., et Christine M. O'Connor. 2015. « Human Cytomegalovirus US28 Is Important for Latent Infection of Hematopoietic Progenitor Cells ». *Journal of Virology* 90 (6): 2959-70.
- Hummel, M., Z. Zhang, S. Yan, I. DePlaen, P. Golia, T. Varghese, G. Thomas, et M. I. Abecassis. 2001. « Allogeneic Transplantation Induces Expression of Cytomegalovirus Immediate-Early Genes in Vivo: A Model for Reactivation from Latency ». *Journal of Virology* 75 (10): 4814-22.
- Hummel, Mary, Shixian Yan, Zhigao Li, Thomas K. Varghese, et Michael Abecassis. 2007. « Transcriptional Reactivation of Murine Cytomegalovirus Ie Gene Expression by 5-Aza-2'-Deoxycytidine and Trichostatin A in Latently Infected Cells despite Lack of Methylation of the Major Immediate-Early Promoter ». *The Journal of General Virology* 88 (Pt 4): 1097-1102.
- Ibanez, C. E., R. Schrier, P. Ghazal, C. Wiley, et J. A. Nelson. 1991. « Human Cytomegalovirus Productively Infects Primary Differentiated Macrophages ». *Journal of Virology* 65 (12): 6581-88.
- Information, National Center for Biotechnology, U. S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, et 20894 Usa. 1995. « Antibodies to Interleukin 12 Abrogate Established Experimental Colitis in Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 182 (5): 1281.
- Ishii, Ken J., Shohei Koyama, Atsushi Nakagawa, Cevayir Coban, et Shizuo Akira. 2008. « Host Innate Immune Receptors and beyond: Making Sense of Microbial Infections ». *Cell Host & Microbe* 3 (6): 352-63.
- Itell, Hannah L., Amitinder Kaur, Jesse D. Deere, Peter A. Barry, et Sallie R. Permar. 2017. « Rhesus Monkeys for a Nonhuman Primate Model of Cytomegalovirus Infections ». *Current opinion in virology* 25 (août): 126-33.
- Jacobson, Mark A., Stuart P. Adler, Elizabeth Sinclair, Douglas Black, Anna Smith, Alice Chu, Ron B. Moss, et Mary K. Wloch. 2009. « A CMV DNA Vaccine Primes for Memory Immune Responses to Live-Attenuated CMV (Towne Strain) ». *Vaccine* 27 (10): 1540-48.
- Jahn, G., B. C. Scholl, B. Traupe, et B. Fleckenstein. 1987. « The Two Major Structural Phosphoproteins (Pp65 and Pp150) of Human Cytomegalovirus and Their Antigenic Properties ». *The Journal of General Virology* 68 (Pt 5) (mai): 1327-37.
- Jarvis, M. A., C. E. Wang, H. L. Meyers, P. P. Smith, C. L. Corless, G. J. Henderson, J. Vieira, W. J. Britt, et J. A. Nelson. 1999. « Human Cytomegalovirus Infection of Caco-2 Cells Occurs at the Basolateral Membrane and Is Differentiation State Dependent ». *Journal of Virology* 73 (6): 4552-60.
- Jentzer, Alexandre, Pauline Veyrard, Xavier Roblin, Pierre Saint-Sardos, Nicolas Rochereau, Stéphane Paul, Thomas Bourlet, Bruno Pozzetto, et Sylvie Pillet. 2020. « Cytomegalovirus and inflammatory bowel diseases (IBD) with a special focus on the link with ulcerative colitis (UC) ». *Microorganisms* 8 (7).
- Jewell, D. P., et S. C. Truelove. 1974. « Azathioprine in Ulcerative Colitis: Final Report on Controlled Therapeutic Trial ». *British Medical Journal* 4 (5945): 627-30.
- Johnson, J. D., J. Campisi, C. M. Sharkey, S. L. Kennedy, M. Nickerson, B. N. Greenwood, et M. Fleshner. 2005. « Catecholamines Mediate Stress-Induced Increases in Peripheral and Central Inflammatory Cytokines ». *Neuroscience* 135 (4): 1295-1307.
- Jones, T. R., et L. Sun. 1997. « Human Cytomegalovirus US2 Destabilizes Major Histocompatibility Complex Class I Heavy Chains ». *Journal of Virology* 71 (4): 2970-79.
- Jones, T. R., E. J. Wiertz, L. Sun, K. N. Fish, J. A. Nelson, et H. L. Ploegh. 1996. « Human Cytomegalovirus US3 Impairs Transport and Maturation of Major Histocompatibility Complex Class I Heavy Chains ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (21): 11327-33.
- Jordan, M. C., J. D. Shanley, et J. G. Stevens. 1977. « Immunosuppression Reactivates and Disseminates Latent Murine Cytomegalovirus ». *The Journal of General Virology* 37 (2): 419-23.
- Kääriäinen, L., E. Klemola, et J. Paloheimo. 1966. « Rise of Cytomegalovirus Antibodies in an Infectious-mononucleosis-like Syndrome after Transfusion ». *British Medical Journal* 1 (5498): 1270-72.

- Kaplan, Gilaad G. 2015. « The Global Burden of IBD: From 2015 to 2025 ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 12 (12): 720-27..
- Kapoor, Arun, Michael Forman, et Ravit Arav-Boger. 2014. « Activation of Nucleotide Oligomerization Domain 2 (NOD2) by Human Cytomegalovirus Initiates Innate Immune Responses and Restricts Virus Replication ». *PLoS ONE* 9 (3).
- Kayal, Maia, et Shailja Shah. 2019. « Ulcerative Colitis: Current and Emerging Treatment Strategies ». *Journal of Clinical Medicine* 9 (1).
- Keubler, Lydia M., Manuela Buettner, Christine Häger, et André Bleich. 2015. « A Multihit Model: Colitis Lessons from the Interleukin-10–deficient Mouse ». *Inflammatory Bowel Diseases* 21 (8): 1967-75.
- Khairallah, Camille, Julie Déchanet-Merville, et Myriam Capone. 2017. « $\Gamma\delta$ T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection ». *Frontiers in Immunology* 8: 105.
- Khairallah, Camille, Sonia Netzer, Arnaud Villacreces, Marina Juzan, Benoît Rousseau, Sara Dulanto, Alban Giese, et al. 2015. « $\Gamma\delta$ T Cells Confer Protection against Murine Cytomegalovirus (MCMV) ». *PLoS Pathogens* 11 (3): e1004702.
- Kharfan-Dabaja, Mohamed A., Michael Boeckh, Marissa B. Wilck, Amelia A. Langston, Alice H. Chu, Mary K. Wloch, Don F. Guterwill, Larry R. Smith, Alain P. Rolland, et Richard T. Kenney. 2012. « A Novel Therapeutic Cytomegalovirus DNA Vaccine in Allogeneic Haemopoietic Stem-Cell Transplantation: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial ». *The Lancet. Infectious Diseases* 12 (4): 290-99.
- Kiesler, Patricia, Ivan J. Fuss, et Warren Strober. 2015. « Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 1 (2): 154-70.
- Kiliaan, A. J., P. R. Saunders, P. B. Bijlsma, M. C. Berin, J. A. Taminiau, J. A. Groot, et M. H. Perdue. 1998. « Stress Stimulates Transepithelial Macromolecular Uptake in Rat Jejunum ». *The American Journal of Physiology* 275 (5): G1037-1044.
- Kim, D. H., J. G. Kim, N. Y. Lee, W. J. Sung, S. K. Sohn, J. S. Suh, K. S. Lee, et K. B. Lee. 2004. « Risk Factors for Late Cytomegalovirus Infection after Allogeneic Stem Cell Transplantation Using HLA-Matched Sibling Donor: Donor Lymphocyte Infusion and Previous History of Early CMV Infection ». *Bone Marrow Transplantation* 34 (1): 21-27.
- Kishore, Janak, Ujjala Ghoshal, Uday C Ghoshal, Narendra Krishnani, Sanjay Kumar, Manisha Singh, et Archana Ayyagari. 2004. « Infection with cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease: prevalence, clinical significance and outcome ». *Journal of Medical Microbiology* 53 (11): 1155-60.
- Kitajima, S., S. Takuma, et M. Morimoto. 1999. « Tissue Distribution of Dextran Sulfate Sodium (DSS) in the Acute Phase of Murine DSS-Induced Colitis ». *The Journal of Veterinary Medical Science* 61 (1): 67-70.
- . 2000. « Histological Analysis of Murine Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium of Different Molecular Weights ». *Experimental Animals* 49 (1): 9-15.
- Klenerman, Paul, et Annette Oxenius. 2016. « T Cell Responses to Cytomegalovirus ». *Nature Reviews. Immunology* 16 (6): 367-77.
- Klotman, M. E., S. C. Henry, R. C. Greene, P. C. Brazy, P. E. Klotman, et J. D. Hamilton. 1990. « Detection of Mouse Cytomegalovirus Nucleic Acid in Latently Infected Mice by in Vitro Enzymatic Amplification ». *The Journal of Infectious Diseases* 161 (2): 220-25.
- Kobayashi, T., S. Okamoto, T. Hisamatsu, N. Kamada, H. Chinen, R. Saito, M. T. Kitazume, et al. 2008. « IL23 Differentially Regulates the Th1/Th17 Balance in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease ». *Gut* 57 (12): 1682-89.
- Kobayashi, Taku, Britta Siegmund, Catherine Le Berre, Shu Chen Wei, Marc Ferrante, Bo Shen, Charles N. Bernstein, Silvio Danese, Laurent Peyrin-Biroulet, et Toshifumi Hibi. 2020. « Ulcerative Colitis ». *Nature Reviews. Disease Primers* 6 (1): 74.
- Krishna, B. A., M. R. Wills, et J. H. Sinclair. 2019. « Advances in the Treatment of Cytomegalovirus ». *British Medical Bulletin* 131 (1): 5-17.
- Krishna, Benjamin A., Emma L. Poole, Sarah E. Jackson, Martine J. Smit, Mark R. Wills, et John H. Sinclair. 2017. « Latency-Associated Expression of Human Cytomegalovirus US28 Attenuates Cell Signaling Pathways To Maintain Latent Infection ». *mBio* 8 (6).
- Krmpotić, Astrid, Jürgen Podlech, Matthias J. Reddehase, William J. Britt, et Stipan Jonjić. 2019. « Role of Antibodies in Confining Cytomegalovirus after Reactivation from Latency: Three Decades' Résumé ». *Medical Microbiology and Immunology* 208 (3): 415-29.

- Kucharzik, T., P. Ellul, T. Greuter, J. F. Rahier, B. Verstockt, C. Abreu, A. Albuquerque, et al. 2021. « ECCO Guidelines on the Prevention, Diagnosis, and Management of Infections in Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Crohn's & Colitis* 15 (6): 879-913.
- Kühn, R., J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky, et W. Müller. 1993. « Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis ». *Cell* 75 (2): 263-74.
- Kumar, D., S. Chernenko, G. Moussa, I. Cobos, O. Manuel, J. Preiksaitis, S. Venkataraman, et A. Humar. 2009. « Cell-Mediated Immunity to Predict Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid Organ Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9 (5): 1214-22.
- Kurz, S. K., M. Rapp, H. P. Steffens, N. K. Grzimek, S. Schmalz, et M. J. Reddehase. 1999. « Focal Transcriptional Activity of Murine Cytomegalovirus during Latency in the Lungs ». *Journal of Virology* 73 (1): 482-94.
- Kurz, S. K., et M. J. Reddehase. 1999. « Patchwork Pattern of Transcriptional Reactivation in the Lungs Indicates Sequential Checkpoints in the Transition from Murine Cytomegalovirus Latency to Recurrence ». *Journal of Virology* 73 (10): 8612-22.
- Kurz, S, H P Steffens, A Mayer, J R Harris, et M J Reddehase. 1997. « Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. » *Journal of Virology* 71 (4): 2980-87.
- Kutle, Ivana, Sarah Sengstake, Corinna Templin, Mandy Glaß, Tobias Kubsch, Kirsten A. Keyser, Anne Binz, et al. 2017. « The M25 Gene Products Are Critical for the Cytopathic Effect of Mouse Cytomegalovirus ». *Scientific Reports* 7 (1): 15588.
- Kuwabara, Akifumi, Haruhiko Okamoto, Takeyasu Suda, Yoichi Ajioka, et Katsuyoshi Hatakeyama. 2007. « Clinicopathologic Characteristics of Clinically Relevant Cytomegalovirus Infection in Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Gastroenterology* 42 (10): 823-29.
- Kvedaraite, Egle, Magda Lourda, Maja Idestrom, Puran Chen, Selma Olsson-Åkefeldt, Marianne Forkel, Désirée Gavhed, et al. 2016. « Tissue-Infiltrating Neutrophils Represent the Main Source of IL-23 in the Colon of Patients with IBD ». *Gut* 65 (10): 1632-41.
- La Rosa, Corinna, Jeff Longmate, Joy Martinez, Qiao Zhou, Teodora I. Kaltcheva, Weimin Tsai, Jennifer Drake, et al. 2017. « MVA vaccine encoding CMV antigens safely induces durable expansion of CMV-specific T cells in healthy adults ». *Blood* 129 (1): 114-25.
- Laer, D. von, U. Meyer-Koenig, A. Serr, J. Finke, L. Kanz, A. A. Fauser, D. Neumann-Haefelin, W. Brugger, et F. T. Hufert. 1995. « Detection of Cytomegalovirus DNA in CD34+ Cells from Blood and Bone Marrow ». *Blood* 86 (11): 4086-90.
- Lamb, Christopher Andrew, Nicholas A. Kennedy, Tim Raine, Philip Anthony Hendy, Philip J. Smith, Jimmy K. Limdi, Bu'Hussain Hayee, et al. 2019. « British Society of Gastroenterology Consensus Guidelines on the Management of Inflammatory Bowel Disease in Adults ». *Gut* 68 (Suppl 3): s1-106.
- Langholz, E., P. Munkholm, M. Davidsen, et V. Binder. 1994. « Course of Ulcerative Colitis: Analysis of Changes in Disease Activity over Years ». *Gastroenterology* 107 (1): 3-11.
- Lawrance, Ian C., Feng Wu, André Z. A. Leite, Joseph Willis, Gail A. West, Claudio Fiocchi, et Shukti Chakravarti. 2003. « A Murine Model of Chronic Inflammation-Induced Intestinal Fibrosis down-Regulated by Antisense NF-Kappa B ». *Gastroenterology* 125 (6): 1750-61.
- Lawrence, Robert M., et Ruth A. Lawrence. 2004. « Breast milk and infection ». *Clinics in Perinatology* 31 (3): 501-28.
- Lee, Ho-Su, Sang Hyoung Park, Sung-Han Kim, Jihun Kim, Jene Choi, Hyo Jeong Lee, Wan Soo Kim, et al. 2016. « Risk Factors and Clinical Outcomes Associated with Cytomegalovirus Colitis in Patients with Acute Severe Ulcerative Colitis ». *Inflammatory Bowel Diseases* 22 (4): 912-18.
- Lee, Song Hee, Emily R. Albright, Jeong-Hee Lee, Derek Jacobs, et Robert F. Kalejta. 2015. « Cellular Defense against Latent Colonization Foiled by Human Cytomegalovirus UL138 Protein ». *Science Advances* 1 (10): e1501164.
- Lerner, Aaron, et Torsten Matthias. 2015. « Changes in Intestinal Tight Junction Permeability Associated with Industrial Food Additives Explain the Rising Incidence of Autoimmune Disease ». *Autoimmunity Reviews* 14 (6): 479-89.
- Leushacke, Marc, et Nick Barker. 2014. « Ex Vivo Culture of the Intestinal Epithelium: Strategies and Applications ». *Gut* 63 (8): 1345-54.
- Levin, Alon D., Manon E. Wildenberg, et Gijs R. van den Brink. 2016. « Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Crohn's and Colitis* 10 (8): 989-97.

- Ligat, G, R Casal, S Hantz, et S Alain. 2018. « The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view ». *FEMS Microbiology Reviews* 42 (2): 137-45.
- Lilleri, Daniele, Chiara Fornara, Antonella Chiesa, Daniela Caldera, Emilio Paolo Alessandrino, et Giuseppe Gerna. 2008. « Human Cytomegalovirus-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Reconstitution in Adult Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients and Immune Control of Viral Infection ». *Haematologica* 93 (2): 248-56.
- Limaye, Ajit P., Katharine A. Kirby, Gordon D. Rubenfeld, Wendy M. Leisenring, Eileen M. Bulger, Margaret J. Neff, Nicole S. Gibran, et al. 2008. « Cytomegalovirus Reactivation in Critically-Ill Immunocompetent Patients ». *JAMA : the journal of the American Medical Association* 300 (4): 413-22.
- Lio, Chan-Wang J., Bryan McDonald, Mariko Takahashi, Rekha Dhanwani, Nikita Sharma, Jenny Huang, Elise Pham, Chris A. Benedict, et Sonia Sharma. 2016. « CGAS-STING Signaling Regulates Initial Innate Control of Cytomegalovirus Infection ». *Journal of Virology* 90 (17): 7789-97.
- Liu, Chen-Chen, Shusheng Ji, Yuanyuan Ding, Lili Zhou, Xiangyu Liu, et Wen Li. 2018. « Cytomegalovirus Infection and Steroid-Refractory Inflammatory Bowel Disease: Possible Relationship from an Updated Meta-Analysis ». *Irish Journal of Medical Science*, février.
- Ljunggren, H. G., et K. Kärre. 1990. « In Search of the "Missing Self": MHC Molecules and NK Cell Recognition ». *Immunology Today* 11 (7): 237-44.
- Ljungman, Per, Michael Boeckh, Hans H. Hirsch, Filip Josephson, Jens Lundgren, Garrett Nichols, Andreas Pikis, et al. 2017. « Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 64 (1): 87-91.
- Lumbreras, C., O. Manuel, O. Len, I. J. M. ten Berge, D. Sgarabotto, et H. H. Hirsch. 2014. « Cytomegalovirus Infection in Solid Organ Transplant Recipients ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 Suppl 7 (septembre): 19-26.
- Lutarewych, M. A., M. R. Quirk, B. A. Kringstad, W. Li, C. M. Verfaillie, et M. C. Jordan. 1997. « Propagation and Titration of Murine Cytomegalovirus in a Continuous Bone Marrow-Derived Stromal Cell Line (M2-10B4) ». *Journal of Virological Methods* 68 (2): 193-98.
- Lüttichau, Hans R. 2010. « The Cytomegalovirus UL146 Gene Product VCXCL1 Targets Both CXCR1 and CXCR2 as an Agonist ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (12): 9137-46.
- Lyte, Mark, Lucy Vulchanova, et David R. Brown. 2011. « Stress at the Intestinal Surface: Catecholamines and Mucosa-Bacteria Interactions ». *Cell and Tissue Research* 343 (1): 23-32.
- Mach, Michael, Barbara Kropff, Magdalena Kryzaniak, et William Britt. 2005. « Complex Formation by Glycoproteins M and N of Human Cytomegalovirus: Structural and Functional Aspects ». *Journal of Virology* 79 (4): 2160-70.
- Maconi, G., E. Colombo, P. Zerbi, G. M. Sampietro, P. Fociani, M. Bosani, A. Cassinotti, et al. 2005. « Prevalence, Detection Rate and Outcome of Cytomegalovirus Infection in Ulcerative Colitis Patients Requiring Colonic Resection ». *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 37 (6): 418-23.
- Magro, F., C. Langner, A. Driessen, A. Ensari, K. Geboes, G. J. Mantzaris, V. Villanacci, et al. 2013. « European Consensus on the Histopathology of Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Crohn's & Colitis* 7 (10): 827-51.
- Magro, Fernando, Paolo Gionchetti, Rami Eliakim, Sandro Ardizzone, Alessandro Armuzzi, Manuel Barreiro-de Acosta, Johan Burisch, et al. 2017. « Third European Evidence-Based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-Intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-Anal Pouch Disorders ». *Journal of Crohn's & Colitis* 11 (6): 649-70.
- Mahid, Suhail S., Kyle S. Minor, Roberto E. Soto, Carlton A. Hornung, et Susan Galandiuk. 2006. « Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis ». *Mayo Clinic Proceedings* 81 (11): 1462-71.
- Mai, Chu-Tian, Mei-Mei Wu, Chun-Li Wang, Zi-Ren Su, Yuan-Yuan Cheng, et Xiao-Jun Zhang. 2019. « Palmatine Attenuated Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis via Promoting Mitophagy-Mediated NLRP3 Inflammasome Inactivation ». *Molecular Immunology* 105 (janvier): 76-85.

- Manceau, Hana, Valérie Chicha-Cattoir, Hervé Puy, et Katell Peoc'h. 2017. « Fecal Calprotectin in Inflammatory Bowel Diseases: Update and Perspectives ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 55 (4): 474-83.
- Manuel, Oriol, Shahid Husain, Deepali Kumar, Carlos Zayas, Steve Mawhorter, Marilyn E. Levi, Jayant Kalpoe, et al. 2013. « Assessment of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity for the Prediction of Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid-Organ Transplant Recipients: A Multicenter Cohort Study ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 56 (6): 817-24.
- Marchal-Bressenot, Aude, Julia Salleron, Camille Boulagnon-Rombi, Claire Bastien, Virginie Cahn, Guillaume Cadiot, Marie-Danièle Diebold, et al. 2017. « Development and Validation of the Nancy Histological Index for UC ». *Gut* 66 (1): 43-49.
- Marshall, Emily E., et Adam P. Geballe. 2009. « Multifaceted Evasion of the Interferon Response by Cytomegalovirus ». *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29 (9): 609-19.
- Marsico, Concetta, et David W. Kimberlin. 2017. « Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment ». *Italian Journal of Pediatrics* 43 (avril).
- Martini, Eva, Susanne M. Krug, Britta Siegmund, Markus F. Neurath, et Christoph Becker. 2017. « Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and Its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 4 (1): 33-46.
- Marty, Francisco M., Per Ljungman, Genovefa A. Papanicolaou, Drew J. Winston, Roy F. Chemaly, Lynne Strasfeld, Jo-Anne H. Young, et al. 2011. « Maribavir Prophylaxis for Prevention of Cytomegalovirus Disease in Recipients of Allogeneic Stem-Cell Transplants: A Phase 3, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomised Trial ». *The Lancet. Infectious Diseases* 11 (4): 284-92.
- Mason, Gavin M., Sarah Jackson, Georgina Okecha, Emma Poole, J. G. Patrick Sissons, John Sinclair, et Mark R. Wills. 2013. « Human Cytomegalovirus Latency-Associated Proteins Elicit Immune-Suppressive IL-10 Producing CD4⁺ T Cells ». *PLoS Pathogens* 9 (10): e1003635.
- Matsumura, Kayoko, Hiroshi Nakase, Isao Kosugi, Yusuke Honzawa, Takuya Yoshino, Minoru Matsuura, Hideya Kawasaki, et al. 2013. « Establishment of a Novel Mouse Model of Ulcerative Colitis with Concomitant Cytomegalovirus Infection: In Vivo Identification of Cytomegalovirus Persistent Infected Cells ». *Inflammatory Bowel Diseases* 19 (9): 1951-63.
- Maxwell, Joseph R., Yu Zhang, William A. Brown, Carole L. Smith, Fergus R. Byrne, Mike Fiorino, Erin Stevens, et al. 2015. « Differential Roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in Intestinal Immunoregulation ». *Immunity* 43 (4): 739-50.
- Mayo, D. R., J. A. Armstrong, et M. Ho. 1977. « Reactivation of Murine Cytomegalovirus by Cyclophosphamide ». *Nature* 267 (5613): 721-23.
- McCurdy, Jeffrey D., Andrea Jones, Felicity T. Enders, Jill M. Killian, Edward V. Loftus, Thomas C. Smyrk, et David H. Bruining. 2015. « A Model for Identifying Cytomegalovirus in Patients with Inflammatory Bowel Disease ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 13 (1): 131-137;
- McSharry, B. P., C. J. Jones, J. W. Skinner, D. Kipling, et G. W. Wilkinson. 2001. « Human Telomerase Reverse Transcriptase-Immortalized MRC-5 and HCA2 Human Fibroblasts Are Fully Permissive for Human Cytomegalovirus ». *The Journal of General Virology* 82 (Pt 4): 855-63.
- Melmed, Gil Y., Robert Elashoff, Gary C. Chen, Igor Nastaskin, Konstantinos A. Papadakis, Eric A. Vasiliauskas, Weiqing Liu, Carol Landers, Andrew F. Ippoliti, et Stephan R. Targan. 2007. « Predicting a Change in Diagnosis from Ulcerative Colitis to Crohn's Disease: A Nested, Case-Control Study ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 5 (5): 602-8; quiz 525.
- Misra, V., et J. B. Hudson. 1980. « Minor Base Sequence Differences between the Genomes of Two Strains of Murine Cytomegalovirus Differing in Virulence ». *Archives of Virology* 64 (1): 1-8.
- Mitchell, Douglas K., Sandra J. Holmes, Rae Lynn Burke, Anne Marie Duliege, et Stuart P. Adler. 2002. « Immunogenicity of a Recombinant Human Cytomegalovirus GB Vaccine in Seronegative Toddlers ». *The Pediatric Infectious Disease Journal* 21 (2): 133-38.
- Mlera, Luwanika, Melissa Moy, Kristen Maness, Linh N. Tran, et Felicia D. Goodrum. 2020. « The Role of the Human Cytomegalovirus UL133-UL138 Gene Locus in Latency and Reactivation ». *Viruses* 12 (7).

- Mohammadnia-Afrouzi, Mousa, Ahmad Zavarani Hosseini, Ali Khalili, Saeid Abediankenari, Vahid Hosseini, et Iradj Maleki. 2015. « Decrease of CD4(+) CD25(+) CD127(Low) FoxP3(+) Regulatory T Cells with Impaired Suppressive Function in Untreated Ulcerative Colitis Patients ». *Autoimmunity* 48 (8): 556-61.
- Montag, Christina, Jutta Annabella Wagner, Iris Gruska, Barbara Vetter, Lüder Wiebusch, et Christian Hagemeyer. 2011. « The Latency-Associated UL138 Gene Product of Human Cytomegalovirus Sensitizes Cells to Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-Alpha) Signaling by Upregulating TNF-Alpha Receptor 1 Cell Surface Expression ». *Journal of Virology* 85 (21): 11409-21.
- Murrell, Isa, Gavin S. Wilkie, Andrew J. Davison, Evelina Statkute, Ceri A. Fielding, Peter Tomasec, Gavin W. G. Wilkinson, et Richard J. Stanton. 2016. « Genetic Stability of Bacterial Artificial Chromosome-Derived Human Cytomegalovirus during Culture In Vitro ». *Journal of Virology* 90 (8): 3929-43.
- Nalleweg, Nancy, Mircea Teodor Chiriac, Eva Podstawa, Christian Lehmann, Tilman T. Rau, Raja Atreya, Ekaterina Krauss, et al. 2015. « IL-9 and Its Receptor Are Predominantly Involved in the Pathogenesis of UC ». *Gut* 64 (5): 743-55.
- N'Diaye, D. S., O. Launay, O. Picone, V. Tsatsaris, E. Azria, F. Rozenberg, M. Schwarzinger, et Y. Yazdanpanah. 2018. « Cost-Effectiveness of Vaccination against Cytomegalovirus (CMV) in Adolescent Girls to Prevent Infections in Pregnant Women Living in France ». *Vaccine* 36 (10): 1285-96.
- Neufert, Clemens, Markus F. Neurath, et Raja Atreya. 2020. « Rationale for IL-36 Receptor Antibodies in Ulcerative Colitis ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 20 (4): 339-42.
- Neurath, M., I. Fuss, et W. Strober. 2000. « TNBS-Colitis ». *International Reviews of Immunology* 19 (1): 51-62.
- Neurath, Markus F. 2019. « Targeting Immune Cell Circuits and Trafficking in Inflammatory Bowel Disease ». *Nature Immunology* 20 (8): 970-79.
- Ng, Siew C., Hai Yun Shi, Nima Hamidi, Fox E. Underwood, Whitney Tang, Eric I. Benchimol, Remo Panaccione, et al. 2017. « Worldwide Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the 21st Century: A Systematic Review of Population-Based Studies ». *The Lancet* 0 (0).
- Nishida, Atsushi, Kentaro Hidaka, Toshihiro Kanda, Hirotugu Imaeda, Makoto Shioya, Osamu Inatomi, Shigeki Bamba, Katsuyuki Kitoh, Mitsushige Sugimoto, et Akira Andoh. 2016. « Increased Expression of Interleukin-36, a Member of the Interleukin-1 Cytokine Family, in Inflammatory Bowel Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 22 (2): 303-14.
- Nordøy, I., F. Müller, K. P. Nordal, H. Rollag, E. Lien, P. Aukrust, et S. S. Froland. 2000. « The Role of the Tumor Necrosis Factor System and Interleukin-10 during Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Recipients ». *The Journal of Infectious Diseases* 181 (1): 51-57.
- Nowacki, Tobias M., Dominik Bettenworth, Matthias Ross, Jan Heidemann, Paul V. Lehmann, et Andreas Lügering. 2012. « Cytomegalovirus (CMV)-Specific Perforin and Granzyme B ELISPOT Assays Detect Reactivation of CMV Infection in Inflammatory Bowel Disease ». *Cells* 1 (2): 35-50.
- Nowacki, Tobias M., Dominik Bettenworth, Tobias Meister, Jan Heidemann, Frank Lenze, Hartmut H. Schmidt, et Hauke S. Heinzow. 2018. « Novel Score Predicts Risk for Cytomegalovirus Infection in Ulcerative Colitis ». *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 105: 103-8.
- Oh, Shin Ju, Chang Kyun Lee, Youn-Wha Kim, Su Jin Jeong, Yoo Min Park, Chi Hyuk Oh, Jung-Wook Kim, et Hyo Jong Kim. 2019. « True Cytomegalovirus Colitis Is a Poor Prognostic Indicator in Patients with Ulcerative Colitis Flares: The 10-Year Experience of an Academic Referral Inflammatory Bowel Disease Center ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 54 (8): 976-83.
- Okayasu, I., S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki, et R. Nakaya. 1990. « A Novel Method in the Induction of Reliable Experimental Acute and Chronic Ulcerative Colitis in Mice ». *Gastroenterology* 98 (3): 694-702.
- Olaisen, Maya, Astrid Rydning, Tom Christian Martinsen, Ivar Skjåk Nordrum, Patricia Mjølnes, et Reidar Fossmark. 2014. « Cytomegalovirus Infection and Postoperative Complications in Patients with Ulcerative Colitis Undergoing Colectomy ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49 (7): 845-52.
- Olbrich, Henning, Sebastian J. Theobald, Constanze Slabik, Laura Gerasch, Andreas Schneider, Michael Mach, Thomas Shum, Maksim Mamonkin, et Renata Stripecke. 2020. « Adult and

- Cord Blood-Derived High-Affinity GB-CAR-T Cells Effectively React Against Human Cytomegalovirus Infections ». *Human Gene Therapy* 31 (7-8): 423-39.
- O'Mahony, Siobhain M., Niall P. Hyland, Timothy G. Dinan, et John F. Cryan. 2011. « Maternal Separation as a Model of Brain-Gut Axis Dysfunction ». *Psychopharmacology* 214 (1): 71-88.
- Onyeagocha, Chukwuma, Mohammad S. Hossain, Amrita Kumar, Rheinallt M. Jones, John Roback, et Andrew T. Gewirtz. 2009. « Latent Cytomegalovirus Infection Exacerbates Experimental Colitis ». *The American Journal of Pathology* 175 (5): 2034-42.
- Orange, Jordan S. 2013. « Natural Killer Cell Deficiency ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (3): 515-25.
- Ott, Stephan J., Sophie Plamondon, Ailsa Hart, Alexander Begun, Ateequr Rehman, Michael A. Kamm, et Stefan Schreiber. 2008. « Dynamics of the Mucosa-Associated Flora in Ulcerative Colitis Patients during Remission and Clinical Relapse ». *Journal of Clinical Microbiology* 46 (10): 3510-13.
- Pang, Yanhua, Huijie Ruan, Dongfang Wu, Yanfei Lang, Ke Sun, et Cuiping Xu. 2020. « Assessment of Clinical Activity and Severity Using Serum ANCA and ASCA Antibodies in Patients with Ulcerative Colitis ». *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 16: 37.
- Papayannopoulos, Venizelos. 2018. « Neutrophil Extracellular Traps in Immunity and Disease ». *Nature Reviews. Immunology* 18 (2): 134-47.
- Paramsothy, Sudarshan, Ramesh Paramsothy, David T. Rubin, Michael A. Kamm, Nadeem O. Kaakoush, Hazel M. Mitchell, et Natalia Castaño-Rodríguez. 2017. « Faecal Microbiota Transplantation for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Crohn's & Colitis* 11 (10): 1180-99.
- Pardieck, Iris N., Guillaume Beyrend, Anke Redeker, et Ramon Arens. 2018. « Cytomegalovirus infection and progressive differentiation of effector-memory T cells ». *F1000Research* 7 (septembre).
- Pass, R. F., A. M. Duliege, S. Boppana, R. Sekulovich, S. Percell, W. Britt, et R. L. Burke. 1999. « A Subunit Cytomegalovirus Vaccine Based on Recombinant Envelope Glycoprotein B and a New Adjuvant ». *The Journal of Infectious Diseases* 180 (4): 970-75.
- Pass, Robert F., Changpin Zhang, Ashley Evans, Tina Simpson, William Andrews, Meei-Li Huang, Lawrence Corey, et al. 2009. « Vaccine Prevention of Maternal Cytomegalovirus Infection ». *The New England Journal of Medicine* 360 (12): 1191-99..
- Paulus, Christina, et Michael Nevels. 2009. « The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins as Antagonists of Intrinsic and Innate Antiviral Host Responses ». *Viruses* 1 (3): 760-79.
- Pavlov, Valentin A., Hong Wang, Christopher J. Czura, Steven G. Friedman, et Kevin J. Tracey. 2003. « The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 9 (5-8): 125-34.
- Peggs, Karl S., Stephanie Verfuether, Arnold Pizzey, Shoon-Ling C. Chow, Kirsty Thomson, et Stephen Mackinnon. 2009. « Cytomegalovirus-Specific T Cell Immunotherapy Promotes Restoration of Durable Functional Antiviral Immunity Following Allogeneic Stem Cell Transplantation ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 49 (12): 1851-60.
- Petrucelli, Alex, Mahadevaiah Umashankar, Patricia Zagallo, Michael Rak, et Felicia Goodrum. 2012. « Interactions between Proteins Encoded within the Human Cytomegalovirus UL133-UL138 Locus ». *Journal of Virology* 86 (16): 8653-62.
- Peyrin-Biroulet, L., W. Sandborn, B. E. Sands, W. Reinisch, W. Bemelman, R. V. Bryant, G. D'Haens, et al. 2015. « Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target ». *The American Journal of Gastroenterology* 110 (9): 1324-38.
- Pillet, Sylvie. 2016. « Cytomegalovirus and Ulcerative Colitis: Place of Antiviral Therapy ». *World Journal of Gastroenterology* 22 (6): 2030.
- Pillet, Sylvie, Camille Jarlot, Mathilde Courault, Emilie Del Tedesco, Renaud Chardon, Pierre Saint-Sardos, Emilie Presles, et al. 2015. « Infliximab Does Not Worsen Outcomes During Flare-Ups Associated with Cytomegalovirus Infection in Patients with Ulcerative Colitis ». *Inflammatory Bowel Diseases* 21 (7): 1580-86.
- Pillet, Sylvie, Bruno Pozzetto, Camille Jarlot, Stéphane Paul, et Xavier Roblin. 2012. « Management of Cytomegalovirus Infection in Inflammatory Bowel Diseases ». *Digestive and Liver Disease:*

- Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 44 (7): 541-48.
- Pillet, Sylvie, Nicolas Williet, Anne Pouvaret, Emilie Del Tedesco, Pierre Saint-Sardos, Bruno Pozzetto, et Xavier Roblin. 2016. « Distribution of Cytomegalovirus DNA Load in the Inflamed Colon of Ulcerative Colitis Patients ». *The American Journal of Gastroenterology* 111 (3): 439-41.
- Pitard, Vincent, David Roumanes, Xavier Lafarge, Lionel Couzi, Isabelle Garrigue, Marie-Edith Lafon, Pierre Merville, Jean-François Moreau, et Julie Déchanet-Merville. 2008. « Long-Term Expansion of Effector/Memory Vdelta2-Gammadelta T Cells Is a Specific Blood Signature of CMV Infection ». *Blood* 112 (4): 1317-24.
- Plotkin, S. A., T. Furukawa, N. Zygraich, et C. Huygelen. 1975. « Candidate Cytomegalovirus Strain for Human Vaccination ». *Infection and Immunity* 12 (3): 521-27.
- Plotsky, Paul M., K. V. Thirivikraman, Charles B. Nemeroff, Christian Caldji, Shakti Sharma, et Michael J. Meaney. 2005. « Long-Term Consequences of Neonatal Rearing on Central Corticotropin-Releasing Factor Systems in Adult Male Rat Offspring ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30 (12): 2192-2204.
- Poland, S. D., P. Costello, G. A. Dekaban, et G. P. Rice. 1990. « Cytomegalovirus in the Brain: In Vitro Infection of Human Brain-Derived Cells ». *The Journal of Infectious Diseases* 162 (6): 1252-62.
- Polić, B., H. Hengel, A. Krmpotić, J. Trgovcich, I. Pavić, P. Luccaronin, S. Jonjić, et U. H. Koszinowski. 1998. « Hierarchical and Redundant Lymphocyte Subset Control Precludes Cytomegalovirus Replication during Latent Infection ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (6): 1047-54.
- Pollock, J. L., et H. W. Virgin. 1995. « Latency, without Persistence, of Murine Cytomegalovirus in the Spleen and Kidney ». *Journal of Virology* 69 (3): 1762-68.
- Pomeroy, C., P. J. Hilleren, et M. C. Jordan. 1991. « Latent Murine Cytomegalovirus DNA in Splenic Stromal Cells of Mice ». *Journal of Virology* 65 (6): 3330-34.
- Poole, Emma L., Verity G. Kew, Jonathan C. H. Lau, Matthew J. Murray, Thomas Stamminger, John H. Sinclair, et Matthew B. Reeves. 2018. « A Virally Encoded DeSUMOylase Activity Is Required for Cytomegalovirus Reactivation from Latency ». *Cell Reports* 24 (3): 594-606.
- Poritz, Lisa S., Kristian I. Garver, Cecelia Green, Leo Fitzpatrick, Francesca Ruggiero, et Walter A. Koltun. 2007. « Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis ». *The Journal of Surgical Research* 140 (1): 12-19.
- Pourgheysari, Batoul, Naeem Khan, Donna Best, Rachel Bruton, Laxman Nayak, et Paul A. H. Moss. 2007. « The Cytomegalovirus-Specific CD4+ T-Cell Response Expands with Age and Markedly Alters the CD4+ T-Cell Repertoire ». *Journal of Virology* 81 (14): 7759-65.
- Prichard, M. N., M. E. Penfold, G. M. Duke, R. R. Spaete, et G. W. Kemble. 2001. « A Review of Genetic Differences between Limited and Extensively Passaged Human Cytomegalovirus Strains ». *Reviews in Medical Virology* 11 (3): 191-200.
- Qiu, B. S., B. A. Vallance, P. A. Blennerhassett, et S. M. Collins. 1999. « The Role of CD4+ Lymphocytes in the Susceptibility of Mice to Stress-Induced Reactivation of Experimental Colitis ». *Nature Medicine* 5 (10): 1178-82.
- Rafailidis, Petros I, Eleni G Mourtzoukou, Ioannis C Varbobitis, et Matthew E Falagas. 2008. « Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review ». *Virology Journal* 5 (mars): 47.
- Rahier, J. F., F. Magro, C. Abreu, A. Armuzzi, S. Ben-Horin, Y. Chowers, M. Cottone, et al. 2014. « Second European Evidence-Based Consensus on the Prevention, Diagnosis and Management of Opportunistic Infections in Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Crohn's and Colitis* 8 (6): 443-68.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, et B. G. Barrell. 1996. « Analysis of the Complete DNA Sequence of Murine Cytomegalovirus ». *Journal of Virology* 70 (12): 8833-49.
- Rawlinson, William D, Suresh B Boppana, Karen B Fowler, David W Kimberlin, Tiziana Lazzarotto, Sophie Alain, Kate Daly, et al. 2017. « Congenital Cytomegalovirus Infection in Pregnancy and the Neonate: Consensus Recommendations for Prevention, Diagnosis, and Therapy ». *The Lancet Infectious Diseases* 17 (6): e177-88.
- Reeves, Matthew B., et John H. Sinclair. 2010. « Analysis of Latent Viral Gene Expression in Natural and Experimental Latency Models of Human Cytomegalovirus and Its Correlation with Histone Modifications at a Latent Promoter ». *The Journal of General Virology* 91 (Pt 3): 599-604.

- Riddell, S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Agha, et P. D. Greenberg. 1992. « Restoration of Viral Immunity in Immunodeficient Humans by the Adoptive Transfer of T Cell Clones ». *Science (New York, N.Y.)* 257 (5067): 238-41.
- Riegler, S., H. Hebart, H. Einsele, P. Brossart, G. Jahn, et C. Sinzger. 2000. « Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Permissive to the Complete Replicative Cycle of Human Cytomegalovirus ». *The Journal of General Virology* 81 (Pt 2): 393-99.
- Rinninella, Emanuele, Pauline Raoul, Marco Cintoni, Francesco Franceschi, Giacinto Abele Donato Miggiano, Antonio Gasbarrini, et Maria Cristina Mele. 2019. « What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases ». *Microorganisms* 7 (1).
- Roblin, Xavier, Sylvie Pillet, Philippe Berthelot, Emilie Del Tedesco, Jean-Marc Phelip, Marie-Laure Chambonnière, Laurent Peyrin-Biroulet, et Bruno Pozzetto. 2012. « Prevalence of Cytomegalovirus Infection in Steroid-Refractory Crohn's Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 18 (7): E1396-1397.
- Roblin, Xavier, Sylvie Pillet, Abderrahim Oussalah, Philippe Berthelot, Emilie Del Tedesco, Jean-Marc Phelip, Marie-Laure Chambonnière, Olivier Garraud, Laurent Peyrin-Biroulet, et Bruno Pozzetto. 2011. « Cytomegalovirus Load in Inflamed Intestinal Tissue Is Predictive of Resistance to Immunosuppressive Therapy in Ulcerative Colitis ». *The American Journal of Gastroenterology* 106 (11): 2001-8.
- Rochereau, Nicolas, Daniel Drocourt, Eric Perouzel, Vincent Pavot, Pierre Redelinguys, Gordon D. Brown, Gerard Tiraby, et al. 2013. « Dectin-1 Is Essential for Reverse Transcytosis of Glycosylated SIgA-Antigen Complexes by Intestinal M Cells ». *PLoS Biology* 11 (9): e1001658.
- Rochereau, Nicolas, Vincent Pavot, Bernard Verrier, Agathe Ensinas, Christian Genin, Blaise Corthésy, et Stéphane Paul. 2015. « Secretory IgA as a Vaccine Carrier for Delivery of HIV Antigen to M Cells ». *European Journal of Immunology* 45 (3): 773-79.
- Rochereau, Nicolas, Xavier Roblin, Eva Michaud, Rémi Gayet, Blandine Chanut, Fabienne Jospin, Blaise Corthésy, et Stéphane Paul. 2021. « NOD2 Deficiency Increases Retrograde Transport of Secretory IgA Complexes in Crohn's Disease ». *Nature Communications* 12 (1): 261.
- Römkens, Tessa EH, Geert J Bulte, Loes HC Nissen, et Joost PH Drenth. 2016. « Cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: A systematic review ». *World Journal of Gastroenterology* 22 (3): 1321-30.
- Rose, William A., Kaori Sakamoto, et Cynthia A. Leifer. 2012. « Multifunctional role of dextran sulfate sodium for in vivo modeling of intestinal diseases ». *BMC Immunology* 13 (1): 41.
- Ross, Shannon A., Nitin Arora, Zdenek Novak, Karen B. Fowler, William J. Britt, et Suresh B. Boppana. 2010. « Cytomegalovirus Reinfections in Healthy Seroimmune Women ». *The Journal of Infectious Diseases* 201 (3): 386-89.
- Ross, Shannon A., Pravasini Pati, Travis L. Jensen, Johannes B. Goll, Casey E. Gelber, Amy Singh, Monica McNeal, Suresh B. Boppana, et David I. Bernstein. 2020. « Cytomegalovirus Genetic Diversity Following Primary Infection ». *The Journal of Infectious Diseases* 221 (5): 715-20.
- Rubin, David T., Ashwin N. Ananthakrishnan, Corey A. Siegel, Bryan G. Sauer, et Millie D. Long. 2019. « ACG Clinical Guideline: Ulcerative Colitis in Adults ». *The American Journal of Gastroenterology* 114 (3): 384-413.
- Rutgeerts, Paul, William J. Sandborn, Brian G. Feagan, Walter Reinisch, Allan Olson, Jewel Johanns, Suzanne Travers, et al. 2005. « Infliximab for Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis ». *New England Journal of Medicine* 353 (23): 2462-76.
- Ruzgys, Paulius, Milda Jakutavičiūtė, Ingrida Šatkauskienė, Karolina Čepurnienė, et Saulius Šatkauskas. 2019. « Effect of Electroporation Medium Conductivity on Exogenous Molecule Transfer to Cells in Vitro ». *Scientific Reports* 9 (1): 1436.
- Ryckman, Brent J., Michael A. Jarvis, Derek D. Drummond, Jay A. Nelson, et David C. Johnson. 2006. « Human Cytomegalovirus Entry into Epithelial and Endothelial Cells Depends on Genes UL128 to UL150 and Occurs by Endocytosis and Low-PH Fusion ». *Journal of Virology* 80 (2): 710-22.
- Ryckman, Brent J., Barb L. Rainish, Marie C. Chase, Jamie A. Borton, Jay A. Nelson, Michael A. Jarvis, et David C. Johnson. 2008. « Characterization of the Human Cytomegalovirus GH/GL/UL128-131 Complex That Mediates Entry into Epithelial and Endothelial Cells ». *Journal of Virology* 82 (1): 60-70.
- Sands, Bruce E., et Gilaad G. Kaplan. 2007. « The Role of TNF α in Ulcerative Colitis ». *The Journal of Clinical Pharmacology* 47 (8): 930-41.

- Sands, Bruce E., William J. Sandborn, Remo Panaccione, Christopher D. O'Brien, Hongyan Zhang, Jewel Johans, Omoniyi J. Adedokun, et al. 2019. « Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis ». *The New England Journal of Medicine* 381 (13): 1201-14.
- Satsangi, J., M. S. Silverberg, S. Vermeire, et J.-F. Colombel. 2006. « The Montreal Classification of Inflammatory Bowel Disease: Controversies, Consensus, and Implications ». *Gut* 55 (6): 749-53.
- Scheibe, Kristina, Christina Kersten, Anabel Schmied, Michael Vieth, Tatjana Primbs, Birgitta Carlé, Ferdinand Knieling, et al. 2019. « Inhibiting Interleukin 36 Receptor Signaling Reduces Fibrosis in Mice With Chronic Intestinal Inflammation ». *Gastroenterology* 156 (4): 1082-1097.e11.
- Schenk, Wiebke, Tobias Klugmann, Annett Borkenhagen, Chris Klecker, Peter Dietel, Ralf Kirschner, Eckhardt Schneider, Tony Bruns, Andreas Stallmach, et Niels Teich. 2019. « The Detection of the Cytomegalovirus DNA in the Colonic Mucosa of Patients with Ulcerative Colitis Is Associated with Increased Long-Term Risk of Proctocolectomy: Results from an Outpatient IBD Clinic ». *International Journal of Colorectal Disease* 34 (3): 393-400.
- Schippers, A, M Muschaweck, T Clahsen, S Tautorat, L Grieb, K Tenbrock, N Gaßler, et N Wagner. 2016. « β 7-Integrin exacerbates experimental DSS-induced colitis in mice by directing inflammatory monocytes into the colon ». *Mucosal Immunology* 9 (2): 527-38.
- Schub, Andrea, Ingrid G. Schuster, Wolfgang Hammerschmidt, et Andreas Moosmann. 2009. « CMV-Specific TCR-Transgenic T Cells for Immunotherapy ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (10): 6819-30.
- Seckert, Christof K., Marion Griessl, Julia K. Büttner, Sabine Scheller, Christian O. Simon, Kai A. Kropp, Angélique Renzaho, Birgit Kühnappel, Natascha K. A. Grzimek, et Matthias J. Reddehase. 2012. « Viral Latency Drives "Memory Inflation": A Unifying Hypothesis Linking Two Hallmarks of Cytomegalovirus Infection ». *Medical Microbiology and Immunology* 201 (4): 551-66.
- Seckert, Christof K., Sina I. Schader, Stefan Ebert, Doris Thomas, Kirsten Freitag, Angélique Renzaho, Jürgen Podlech, Matthias J. Reddehase, et Rafaela YR 2011 Holtappels. s. d. « Antigen-presenting cells of haematopoietic origin prime cytomegalovirus-specific CD8 T-cells but are not sufficient for driving memory inflation during viral latency ». *Journal of General Virology* 92 (9): 1994-2005.
- Shukla, Tushar, Siddharth Singh, Parul Tandon, et Jeffrey D. McCurdy. 2016. « Corticosteroids and Thiopurines, But Not Tumor Necrosis Factor Antagonists, Are Associated With Cytomegalovirus Reactivation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Clinical Gastroenterology*, novembre.
- Simanek, Amanda M., Jennifer Beam Dowd, Graham Pawelec, David Melzer, Ambarish Dutta, et Allison E. Aiello. 2011. « Seropositivity to Cytomegalovirus, Inflammation, All-Cause and Cardiovascular Disease-Related Mortality in the United States ». *PloS One* 6 (2): e16103.
- Sinzger, C., A. L. Bissinger, R. Viebahn, H. Oettle, C. Radke, C. A. Schmidt, et G. Jahn. 1999. « Hepatocytes Are Permissive for Human Cytomegalovirus Infection in Human Liver Cell Culture and In Vivo ». *The Journal of Infectious Diseases* 180 (4): 976-86.
- Sinzger, Christian, Annemarie Grefte, Bodo Plachter, Annette S. H. Gouw, T. Hauw The, et Gerhard YR 1995 Jahn. s. d. « Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues ». *Journal of General Virology* 76 (4): 741-50.
- Skaletskaya, A., L. M. Bartle, T. Chittenden, A. L. McCormick, E. S. Mocarski, et V. S. Goldmacher. 2001. « A Cytomegalovirus-Encoded Inhibitor of Apoptosis That Suppresses Caspase-8 Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (14): 7829-34.
- Smith, Corinne J., Michael Quinn, et Christopher M. Snyder. 2016. « CMV-Specific CD8 T Cell Differentiation and Localization: Implications for Adoptive Therapies ». *Frontiers in Immunology* 7 (septembre).
- Smith, L. M., A. R. McWhorter, L. L. Masters, G. R. Shellam, et A. J. Redwood. 2008. « Laboratory Strains of Murine Cytomegalovirus Are Genetically Similar to but Phenotypically Distinct from Wild Strains of Virus ». *Journal of Virology* 82 (13): 6689
- Smith, M. G. 1954. « Propagation of Salivary Gland Virus of the Mouse in Tissue Cultures ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 86 (3): 435-40.

- Smith, Wendell, Peter Tomasec, Rebecca Aicheler, Andrea Loewendorf, Ivana Nemčovičová, Eddie C. Y. Wang, Richard J. Stanton, et al. 2013. « Human Cytomegalovirus Glycoprotein UL141 Targets the TRAIL Death Receptors to Thwart Host Innate Antiviral Defenses ». *Cell Host & Microbe* 13 (3): 324-35.
- Snyder, Christopher M., Kathy S. Cho, Elizabeth L. Morrison, Serani van Dommelen, Geoffrey R. Shellam, et Ann B. Hill. 2008. « Memory Inflation During Chronic Viral Infection is Maintained by Continuous Production of Short-Lived Functional T Cells ». *Immunity* 29 (4): 650-59.
- Sokol, Harry, Valentin Leducq, Hugues Aschard, Hang-Phuong Pham, Sarah Jegou, Cecilia Landman, David Cohen, et al. 2017. « Fungal Microbiota Dysbiosis in IBD ». *Gut* 66 (6): 1039-48.
- Sood, Siddharth, Craig Haifer, Lijia Yu, Julie Pavlovic, Paul J. Gow, Robert M. Jones, Kumar Visvanathan, Peter W. Angus, et Adam G. Testro. 2015. « Targeted Individual Prophylaxis Offers Superior Risk Stratification for Cytomegalovirus Reactivation after Liver Transplantation ». *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 21 (12): 1478-85.
- Stanton, Richard J., Katarina Baluchova, Derrick J. Dargan, Charles Cunningham, Orla Sheehy, Sepehr Seirafian, Brian P. McSharry, et al. 2010. « Reconstruction of the Complete Human Cytomegalovirus Genome in a BAC Reveals RL13 to Be a Potent Inhibitor of Replication ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (9): 3191-3208.
- Stanton, Richard J., Virginie Prod'homme, Marco A. Purbhoo, Melanie Moore, Rebecca J. Aicheler, Marcus Heinzmann, Susanne M. Bailer, et al. 2014. « HCMV PUL135 Remodels the Actin Cytoskeleton to Impair Immune Recognition of Infected Cells ». *Cell Host & Microbe* 16 (2): 201-14.
- Steininger, Christoph, Elisabeth Puchhammer-Stöckl, et Theresia Popow-Kraupp. 2006. « Cytomegalovirus Disease in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) ». *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 37 (1): 1-9.
- Stern, Anat, et Genovefa A. Papanicolaou. 2019. « CMV Prevention and Treatment in Transplantation: What's New in 2019 ». *Current Infectious Disease Reports* 21 (11): 45.
- Stern, Martin, Hans Hirsch, Alexia Cusini, Christian van Delden, Oriol Manuel, Pascal Meylan, Katia Boggian, Nicolas J. Mueller, Michael Dickenmann, et Members of Swiss Transplant Cohort Study. 2014. « Cytomegalovirus Serology and Replication Remain Associated with Solid Organ Graft Rejection and Graft Loss in the Era of Prophylactic Treatment ». *Transplantation* 98 (9): 1013-18.
- Stern, Lauren, Barbara Withers, Selmir Avdic, David Gottlieb, Allison Abendroth, Emily Blyth, et Barry Slobedman. 2019. « Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients ». *Frontiers in Microbiology* 10: 1186.
- Straub, R. H., R. Wiest, U. G. Strauch, P. Härle, et J. Schölmerich. 2006. « The Role of the Sympathetic Nervous System in Intestinal Inflammation ». *Gut* 55 (11): 1640-49.
- Straub, Rainer H., Hans Herfarth, Werner Falk, Tilo Andus, et Jürgen Schölmerich. 2002. « Uncoupling of the Sympathetic Nervous System and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Inflammatory Bowel Disease? ». *Journal of Neuroimmunology* 126 (1-2): 116-25.
- Summers, Robert W., David E. Elliott, Joseph F. Urban, Robin A. Thompson, et Joel V. Weinstock. 2005. « Trichuris Suis Therapy for Active Ulcerative Colitis: A Randomized Controlled Trial ». *Gastroenterology* 128 (4): 825-32.
- Sutherland, C. L., N. J. Chalupny, et D. Cosman. 2001. « The UL16-Binding Proteins, a Novel Family of MHC Class I-Related Ligands for NKG2D, Activate Natural Killer Cell Functions ». *Immunological Reviews* 181 (juin): 185-92.
- Sylwester, Andrew W., Bridget L. Mitchell, John B. Edgar, Cara Taormina, Christian Pelte, Franziska Ruchti, Paul R. Sleath, et al. 2005. « Broadly Targeted Human Cytomegalovirus-Specific CD4+ and CD8+ T Cells Dominate the Memory Compartments of Exposed Subjects ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (5): 673.
- Tandon, Parul, Paul James, Erin Cordeiro, Ranjeeta Mallick, Tushar Shukla, et Jeffrey D. McCurdy. 2017. « Diagnostic Accuracy of Blood-Based Tests and Histopathology for Cytomegalovirus Reactivation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Inflammatory Bowel Diseases* 23 (4): 551-60.
- Tomás-Barberán, Francisco A., María V. Selma, et Juan C. Espín. 2016. « Interactions of Gut Microbiota with Dietary Polyphenols and Consequences to Human Health ». *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 19 (6): 471-76.

- Tomazin, R., J. Boname, N. R. Hegde, D. M. Lewinsohn, Y. Altschuler, T. R. Jones, P. Cresswell, J. A. Nelson, S. R. Riddell, et D. C. Johnson. 1999. « Cytomegalovirus US2 Destroys Two Components of the MHC Class II Pathway, Preventing Recognition by CD4+ T Cells ». *Nature Medicine* 5 (9): 1039-43.
- Tracey, Kevin J. 2002. « The Inflammatory Reflex ». *Nature* 420 (6917): 853-59.
- Truelove, S. C., et L. J. Witts. 1955. « Cortisone in Ulcerative Colitis; Final Report on a Therapeutic Trial ». *British Medical Journal* 2 (4947): 1041-48.
- Tugizov, S., E. Maidji, et L. Pereira. 1996. « Role of Apical and Basolateral Membranes in Replication of Human Cytomegalovirus in Polarized Retinal Pigment Epithelial Cells ». *The Journal of General Virology* 77 (Pt 1) (janvier): 61-74.
- Tumilowicz, J. J., M. E. Gawlik, B. B. Powell, et J. J. Trentin. 1985. « Replication of Cytomegalovirus in Human Arterial Smooth Muscle Cells ». *Journal of Virology* 56 (3): 839-45.
- Uhlig, Holm H., Janine Coombes, Christian Mottet, Ana Izcue, Claire Thompson, Andrea Fanger, Andrea Tannapel, Jason D. Fontenot, Fred Ramsdell, et Fiona Powrie. 2006. « Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-Secreting CD4+CD25+ T Cells during Cure of Colitis ». *The Journal of Immunology* 177 (9): 5852-60.
- Ulbrecht, M., S. Martinozzi, M. Grzeschik, H. Hengel, J. W. Ellwart, M. Pla, et E. H. Weiss. 2000. « Cutting Edge: The Human Cytomegalovirus UL40 Gene Product Contains a Ligand for HLA-E and Prevents NK Cell-Mediated Lysis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (10): 5019-22.
- Umashankar, Mahadevaiah, Michael Rak, Farah Bughio, Patricia Zagallo, Katie Caviness, et Felicia D. Goodrum. 2014. « Antagonistic Determinants Controlling Replicative and Latent States of Human Cytomegalovirus Infection ». *Journal of Virology* 88 (11): 5987-6002.
- Ungaro, Ryan, Charles N. Bernstein, Richard Geary, Anders Hviid, Kaija-Leena Kolho, Matthew P. Kronman, Souradet Shaw, Herbert Van Kruiningen, Jean-Frédéric Colombel, et Ashish Atreja. 2014. « Antibiotics Associated with Increased Risk of New-Onset Crohn's Disease but Not Ulcerative Colitis: A Meta-Analysis ». *The American Journal of Gastroenterology* 109 (11): 1728-38.
- Upadhyayula, Shankar, et Marian G. Michaels. 2013. « Ganciclovir, Foscarnet, and Cidofovir: Antiviral Drugs Not Just for Cytomegalovirus ». *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 2 (3): 286-90.
- Valencia, Sarah, Rachel B. Gill, Kennichi C. Dowdell, Yanmei Wang, Ron Hornung, J. Jason Bowman, Juan C. Lacayo, et Jeffrey I. Cohen. 2019. « Comparison of Vaccination with Rhesus CMV (RhCMV) Soluble GB with a RhCMV Replication-Defective Virus Deleted for MHC Class I Immune Evasion Genes in a RhCMV Challenge Model ». *Vaccine* 37 (2): 333-42.
- Van Craenenbroeck, Amaryllis H., Evelien L. J. Smits, Sébastien Anguille, Ann Van de Velde, Barbara Stein, Tessa Braeckman, Kirsten Van Camp, et al. 2015. « Induction of Cytomegalovirus-Specific T Cell Responses in Healthy Volunteers and Allogeneic Stem Cell Recipients Using Vaccination with Messenger RNA-Transfected Dendritic Cells ». *Transplantation* 99 (1): 120-27.
- Van der Sluis, Maria, Barbara A. E. De Koning, Adrianus C. J. M. De Bruijn, Anna Velcich, Jules P. P. Meijerink, Johannes B. Van Goudoever, Hans A. Büller, et al. 2006. « Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection ». *Gastroenterology* 131 (1): 117-29.
- Van Klinken, B. J., J. W. Van der Wal, A. W. Einerhand, H. A. Büller, et J. Dekker. 1999. « Sulphation and Secretion of the Predominant Secretory Human Colonic Mucin MUC2 in Ulcerative Colitis ». *Gut* 44 (3): 387-93.
- Vanarsdall, Adam L., Marie C. Chase, et David C. Johnson. 2011. « Human Cytomegalovirus Glycoprotein gO Complexes with gH/gL, Promoting Interference with Viral Entry into Human Fibroblasts but Not Entry into Epithelial Cells ». *Journal of Virology* 85 (22): 11638-45.
- Vermeire, Séverine, Gert Van Assche, et Paul Rutgeerts. 2005. « The Role of C-Reactive Protein as an Inflammatory Marker in Gastrointestinal Diseases ». *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology* 2 (12): 580-86.
- Vincenti, Flavio, Klemens Budde, Pierre Merville, Fuad Shihab, V. Ram Peddi, Malay Shah, Kate Wyburn, et al. 2018. « A Randomized, Phase 2 Study of ASP0113, a DNA-Based Vaccine, for the Prevention of CMV in CMV-Seronegative Kidney Transplant Recipients Receiving a Kidney from a CMV-Seropositive Donor ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, mai.

- Wagner, Claudia S., Hans-Gustaf Ljunggren, et Adnane Achour. 2008. « Immune Modulation by the Human Cytomegalovirus-Encoded Molecule UL18, a Mystery yet to Be Solved ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (1): 19-24.
- Waldman, W. J., J. M. Sneddon, R. E. Stephens, et W. H. Roberts. 1989. « Enhanced Endothelial Cytopathogenicity Induced by a Cytomegalovirus Strain Propagated in Endothelial Cells ». *Journal of Medical Virology* 28 (4): 223-30.
- Walter, E. A., P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K. S. Watanabe, E. D. Thomas, et S. R. Riddell. 1995. « Reconstitution of Cellular Immunity against Cytomegalovirus in Recipients of Allogeneic Bone Marrow by Transfer of T-Cell Clones from the Donor ». *The New England Journal of Medicine* 333 (16): 1038-44.
- Walton, Andrew H., Jared T. Muenzer, David Rasche, Jonathan S. Boomer, Bryan Sato, Bernard H. Brownstein, Alexandre Pachot, et al. 2014. « Reactivation of Multiple Viruses in Patients with Sepsis ». *PLoS ONE* 9 (6): e98819.
- Wang, Dai, Daniel C. Freed, Xi He, Fengsheng Li, Aimin Tang, Kara S. Cox, Sheri A. Dubey, et al. 2016. « A Replication-Defective Human Cytomegalovirus Vaccine for Prevention of Congenital Infection ». *Science Translational Medicine* 8 (362): 362ra145..
- Wang, Dai, et Thomas Shenk. 2005. « Human Cytomegalovirus UL131 Open Reading Frame Is Required for Epithelial Cell Tropism ». *Journal of Virology* 79 (16): 10330-38.
- Wang, Dai, Qian-Chun Yu, Jörg Schröer, Eain Murphy, et Thomas Shenk. 2007. « Human Cytomegalovirus Uses Two Distinct Pathways to Enter Retinal Pigmented Epithelial Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (50): 20037-42.
- Wang, George C., Wen Hong L. Kao, Peter Murakami, Qian-Li Xue, Roger B. Chiou, Barbara Detrick, John F. McDyer, et al. 2010. « Cytomegalovirus Infection and the Risk of Mortality and Frailty in Older Women: A Prospective Observational Cohort Study ». *American Journal of Epidemiology* 171 (10): 1144-52.
- Wang, Peiqi, Jun Hu, Shadi Ghadermarzi, Ali Raza, Douglas O'Connell, Amy Xiao, Faraz Ayyaz, et al. 2018. « Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Comparison of China, India, and the USA ». *Digestive diseases and sciences* 63 (10): 2703-13.
- Wang, Peng, Ana M. Gamero, et Liselotte E. Jensen. 2019. « IL-36 Promotes Anti-Viral Immunity by Boosting Sensitivity to IFN- α/β in IRF1 Dependent and Independent Manners ». *Nature Communications* 10 (1): 4700.
- Wang, Yu-Fang, Qin Ou-Yang, Bing Xia, Li-Na Liu, Fang Gu, Kai-Fang Zhou, Qiao Mei, et al. 2013. « Multicenter Case-Control Study of the Risk Factors for Ulcerative Colitis in China ». *World Journal of Gastroenterology* 19 (11): 1827-33.
- Wangensteen, O. H., et R. W. Toon. 1948. « Primary Resection of the Colon and Rectum with Particular Reference to Cancer and Ulcerative Colitis ». *American Journal of Surgery* 75 (2): 384-404.
- Watanabe, Hiroyuki, Kousuke Numata, Takaaki Ito, Katsumasa Takagi, et Akihiro Matsukawa. 2004. « Innate Immune Response in Th1- and Th2-Dominant Mouse Strains ». *Shock (Augusta, Ga.)* 22 (5): 460-66.
- Weber, B., et H. W. Doerr. 1994. « Diagnosis and Epidemiology of Transfusion-Associated Human Cytomegalovirus Infection: Recent Developments ». *Infusionstherapie Und Transfusionsmedizin* 21 Suppl 1 (août): 32-39.
- Weclawiak, Hugo, Catherine Mengelle, Abdellatif Ould Mohamed, Jacques Izopet, Lionel Rostaing, et Nassim Kamar. 2010. « [Cytomegalovirus effects in solid organ transplantation and the role of antiviral prophylaxis] ». *Nephrologie & Therapeutique* 6 (6): 505-12.
- White, Elizabeth A., Charles L. Clark, Veronica Sanchez, et Deborah H. Spector. 2004. « Small Internal Deletions in the Human Cytomegalovirus IE2 Gene Result in Nonviable Recombinant Viruses with Differential Defects in Viral Gene Expression ». *Journal of Virology* 78 (4): 1817-30.
- Wiertz, E. J., T. R. Jones, L. Sun, M. Bogoy, H. J. Geuze, et H. L. Ploegh. 1996. « The Human Cytomegalovirus US11 Gene Product Dislocates MHC Class I Heavy Chains from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol ». *Cell* 84 (5): 769-79.
- Wilkinson, Gavin W. G., Andrew J. Davison, Peter Tomasec, Ceri A. Fielding, Rebecca Aicheler, Isa Murrell, Sepher Seirafian, et al. 2015. « Human cytomegalovirus: taking the strain ». *Medical Microbiology and Immunology* 204 (3): 273-84.

- Wirtz, Stefan, Vanessa Popp, Markus Kindermann, Katharina Gerlach, Benno Weigmann, Stefan Fichtner-Feigl, et Markus F. Neurath. 2017. « Chemically Induced Mouse Models of Acute and Chronic Intestinal Inflammation ». *Nature Protocols* 12 (7): 1295-1309.
- Wood, L. J., M. K. Baxter, S. M. Plafker, et W. Gibson. 1997. « Human Cytomegalovirus Capsid Assembly Protein Precursor (PUL80.5) Interacts with Itself and with the Major Capsid Protein (PUL86) through Two Different Domains ». *Journal of Virology* 71 (1): 179-90.
- Wright, A. D. 1942. « Ulcerative Colitis Complicated by Polyarthritits Treated by Total Colectomy ». *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 35 (3): 189-90.
- Wujcicka, Wioletta, Edyta Paradowska, Mirosława Studzińska, Zuzanna Gaj, Jan Wilczyński, Zbigniew Leśniowski, et Dorota Nowakowska. 2015. « TLR9 2848 GA Heterozygotic Status Possibly Predisposes Fetuses and Newborns to Congenital Infection with Human Cytomegalovirus ». *PLoS ONE* 10 (4).
- Wyant, Tim, Eric Fedyk, et Brihad Abhyankar. 2016. « An Overview of the Mechanism of Action of the Monoclonal Antibody Vedolizumab ». *Journal of Crohn's & Colitis* 10 (12): 1437-44.
- Yan, Yutao, Vasantha Kolachala, Guillaume Dalmasso, Hang Nguyen, Hamed Laroui, Shanthi V. Sitaraman, et Didier Merlin. 2009. « Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis ». *PloS One* 4 (6): e6073.
- Yanai, Henit, Lev Lichtenstein, Amit Assa, Yoav Mazor, Batia Weiss, Arie Levine, Yulia Ron, et al. 2015. « Levels of Drug and Antidrug Antibodies Are Associated with Outcome of Interventions after Loss of Response to Infliximab or Adalimumab ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 13 (3): 522-530.e2.
- Yang, Hong, Kaichun Wu, Hongjie Zhang, Qin Owyang, Yinglei Miao, Fang Gu, Naizhong Hu, et al. 2020. « IgA, Albumin, and Eosinopenia as Early Indicators of Cytomegalovirus Infection in Patients with Acute Ulcerative Colitis ». *BMC Gastroenterology* 20 (1): 294.
- Yew, K. H., et C. J. Harrison. 2011. « Blockade of Lyn Kinase Upregulates Both Canonical and Non-Canonical TLR-3 Pathways in THP-1 Monocytes Exposed to Human Cytomegalovirus ». *Acta Virologica* 55 (3): 243-53.
- Yew, Kok-Hooi, Cory Carpenter, R. Scott Duncan, et Christopher J. Harrison. 2012. « Human Cytomegalovirus Induces TLR4 Signaling Components in Monocytes Altering TIRAP, TRAM and Downstream Interferon-Beta and TNF-Alpha Expression ». *PloS One* 7 (9): e44500.
- Yew, Kok-Hooi, Bonnie Carsten, et Christopher Harrison. 2010. « Scavenger Receptor A1 Is Required for Sensing HCMV by Endosomal TLR-3/-9 in Monocytic THP-1 Cells ». *Molecular Immunology* 47 (4): 883-93.
- Yong, Michelle K., Paul U. Cameron, Monica Slavin, C. Orla Morrissey, Krystal Bergin, Andrew Spencer, David Ritchie, et al. 2017. « Identifying Cytomegalovirus (CMV) Complications Using the Quantiferon-CMV Assay after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *The Journal of Infectious Diseases*, avril.
- You, David M., et Mark D. Johnson. 2012. « Cytomegalovirus Infection and the Gastrointestinal Tract ». *Current Gastroenterology Reports* 14 (4): 334-42.
- Zagórowicz, Edyta, Marek Bugajski, Paulina Wieszczy, Anna Pietrzak, Agnieszka Magdziak, et Andrzej Mróz. 2016. « Cytomegalovirus Infection in Ulcerative Colitis Is Related to Severe Inflammation and a High Count of Cytomegalovirus-Positive Cells in Biopsy Is a Risk Factor for Colectomy ». *Journal of Crohn's & Colitis* 10 (10): 1205-11.
- Zammarchi, L., T. Lazzarotto, M. Andreoni, I. Campolmi, L. Pasquini, M. Di Tommaso, G. Simonazzi, et al. 2020. « Management of Cytomegalovirus Infection in Pregnancy: Is It Time for Valacyclovir? ». *Clinical Microbiology and Infection* 26 (9): 1151-54.
- Zeng, Boning, Shengnan Shi, Gareth Ashworth, Changjiang Dong, Jing Liu, et Feiyue Xing. 2019. « ILC3 Function as a Double-Edged Sword in Inflammatory Bowel Diseases ». *Cell Death & Disease* 10 (4): 315.
- Zhang, Wei-Xia, Cheng-Yan Ma, Jian-Guo Zhang, Feng He, Qing-Min Liu, Aibin Cheng, Tiejun Liu, et al. 2016. « Effects of Cytomegalovirus Infection on the Prognosis of Inflammatory Bowel Disease Patients ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 12 (5): 3287-93.
- Zidar, Nina, Ivan Ferkolj, Katja Tepeš, Borut Štabuc, Nika Kojc, Tina Uršič, et Miroslav Petrovec. 2015. « Diagnosing Cytomegalovirus in Patients with Inflammatory Bowel Disease--by Immunohistochemistry or Polymerase Chain Reaction? ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 466 (5): 533-39.

Zuhair, Mohamed, G. Suzanne A. Smit, Gabriel Wallis, Faiz Jabbar, Colette Smith, Brecht Devleesschauwer, et Paul Griffiths. 2019. « Estimation of the Worldwide Seroprevalence of Cytomegalovirus: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Reviews in Medical Virology* 29

ANNEXES

I. Revue publiée dans Virologie en 2017

Cytomégalovirus et maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) avec un focus spécial sur son rôle dans la rectocolite hémorragique

Alexandre Jentzer^{1,2,3}

Nicolas Williet⁴

Xavier Roblin^{1,4}

Nicolas Rochereau¹

Stéphane Paul^{1,3}

Bruno Pozzetto^{1,2}

Sylvie Pillet^{1,2}

¹ EA3064, Groupe immunité des muqueuses et agents pathogènes (Gimap), Campus Santé Innovations, Faculté de médecine,

10 rue de la Marandière, BP 80019, 42270 Saint-Priest-en-Jarez

² Laboratoire des agents infectieux et hygiène, CHU de Saint-Étienne, France <sylvie.pillet@chu-st-etienne.fr>

³ Laboratoire d'Immunologie, CHU de Saint-Étienne, France

⁴ Service de Gastro-entérologie, CHU de Saint-Étienne, France

Résumé. Le cytomégalovirus (CMV) infecte environ 50 % des individus en France et persiste à vie sous forme latente dans divers organes dont le côlon. Une interrelation étroite est observée entre l'inflammation qui favorise l'expression virale et la réplication virale qui module la réaction inflammatoire. C'est dans ce contexte que CMV impacte le pronostic des patients souffrant de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) et plus particulièrement de rectocolite hémorragique (RCH). Dans cette dernière pathologie, l'inflammation de la muqueuse au sein d'un bain cytokinique de type Th2, associée aux médicaments immunomodulateurs administrés pour juguler les poussées aiguës, favorise la réactivation virale dans le côlon qui entraîne en retour une exacerbation de l'inflammation muqueuse ; la conséquence clinique est une potentielle inefficacité de la corticothérapie (risque de corticorésistance multiplié par un facteur d'ordre 20 en cas de colite à CMV) et des médications immunosuppressives, précipitant le recours à la chirurgie (colectomie). Cette revue fait une large place aux outils virologiques recommandés pour diagnostiquer les infections coliques à CMV au cours des MICI. Elle discute également l'intérêt d'un traitement antiviral par ganciclovir dans le traitement des poussées de RCH associées à une colite à CMV.

Mots clés : colite à CMV, réponse cytokinique Th2, inflammation, corticorésistance, ganciclovir

Résumé. Cytomegalovirus (CMV) infects approximately 50 % of adults in France and persists lifelong as a latent agent in different organs, including the gut. A close relationship is observed between inflammation that favors viral expression, and viral replication that modulates inflammation. In this context, CMV colitis may impact the prognosis of patients suffering from inflammatory bowel diseases (IBD), and notably those with ulcerative colitis (UC). In UC, the mucosal inflammation in link with Th2 cytokines, together with immunomodulatory drugs used for controlling flares-up, favors viral reactivation within the gut, which increases mucosal inflammation ; it results in an important risk of impairing corticoid and immunosuppressor efficacy (the probability of steroid resistance is multiplied by more than 20 in case of CMV colitis), precipitating the need for colectomy. This review emphasizes the virological tools that are recommended for exploring CMV colitis during IBD and underlines the interest of using ganciclovir for treating flares-up associated to CMV colitis in UC patients.

Key words : CMV-associated colitis, Th2 cytokines, inflammation, steroid resistance, ganciclovir

doi:10.1684/vir.2017.0713

Tirés à part : S. Pillet

Introduction

Les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) regroupent principalement deux entités : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ce sont des affections fréquentes du tube digestif qui touchent 200 000 personnes en France, majoritairement des sujets jeunes et actifs avec un diagnostic porté généralement entre 20 et 30 ans. L'incidence annuelle est globalement en progression, avec 24,3 cas pour 100 000 habitants en Europe [1]. Ces affections chroniques sont incurables et invalidantes avec un impact majeur sur la vie socioprofessionnelle des patients. Leur physiopathologie complexe est dominée par une inflammation chronique du tube digestif ; elle fait intervenir à la fois des facteurs génétiques, concernant notamment les réponses immunitaires innées et adaptatives de la muqueuse digestive, et des facteurs environnementaux. Les MICI se caractérisent cliniquement par l'alternance de poussées inflammatoires aiguës et de phases de rémission asymptomatiques. L'administration de médicaments anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs tels que corticoïdes, azathioprine, cyclosporine, anticorps monoclonaux notamment dirigés contre le *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α), permet le plus souvent de juguler la phase aiguë et d'allonger les périodes de rémission. Plusieurs lignes de traitement sont parfois nécessaires avant d'obtenir la cicatrisation de la muqueuse intestinale [1]. Malgré ces différentes options thérapeutiques, l'inflammation peut se compliquer de nécrose tissulaire qui impose alors une colectomie chirurgicale partielle ou totale.

Le cytomégalo virus humain (CMV), ou herpès virus 5, est un pathogène opportuniste qui interagit dans de nombreux processus inflammatoires [2]. Le diagnostic de colite à CMV chez les patients atteints de MICI est difficile parce qu'aucun symptôme clinique ou endoscopique ne permet de la différencier de la colite associée à la maladie inflammatoire elle-même ; il repose exclusivement sur la mise en évidence de marqueurs histologiques ou viraux dans la muqueuse intestinale [3]. L'objet de cette revue est de montrer la place des infections coliques à CMV au cours des MICI en insistant sur la relation entre l'infection de la muqueuse colique par CMV et les poussées inflammatoires de RCH, les deux facteurs interagissant mutuellement l'un avec l'autre pour pérenniser et aggraver les lésions coliques. Nous montrerons aussi comment, dans cette maladie, les traitements immunosuppresseurs et antiviraux peuvent contribuer à contrôler cette inflammation colique. Nous rappellerons en préambule quelques éléments généraux sur la physiopathologie de l'infection à CMV qui sont nécessaires à la compréhension de son rôle en pathologie colique.

Rappels succincts sur la physiopathologie de l'infection à CMV

Au-delà de rappels limités aux objectifs de cette revue, le lecteur intéressé par plus d'information est invité à se reporter à des revues générales récentes sur le sujet [4, 5].

Tropisme cellulaire et modes de transmission

CMV appartient à la sous-famille des *beta-Herpesvirinae* au sein de la famille des *Herpesviridae*. C'est un virus ubiquitaire à forte spécificité d'espèce, le cytomégalo virus humain n'infectant que l'homme. Le virus est constitué d'une molécule d'ADN double brin, protégée par une capside de symétrie icosaédrique, d'un tégment et d'une enveloppe. Il se réplique dans de nombreux types cellulaires, notamment les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les monocytes/macrophages. CMV est un virus fragile qui se transmet par contacts étroits à partir des sécrétions (salive, lait, sécrétions génitales et sperme) et des fluides biologiques (urines) d'un individu infecté. Présent dans de nombreux types cellulaires, il est retrouvé dans le sang et les organes qui constituent des sources potentielles de transmission. Enfin, il se transmet de la mère au fœtus pendant la grossesse. La primo-infection s'accompagne d'une dissémination sanguine transitoire qui permet au virus de gagner l'ensemble des organes.

Cycle lytique de réplication

Le cycle viral a essentiellement été étudié dans les cellules fibroblastiques. L'attachement d'un complexe de glycoprotéines de l'enveloppe virale aux récepteurs cellulaires (glycosaminoglycane tels que le sulfate d'héparane, les intégrines ou encore de nombreux récepteurs de facteurs de croissance) permet à la nucléocapside de pénétrer dans le cytosol puis dans le noyau cellulaire. L'expression des gènes viraux se déroule en trois phases : les gènes très précoces (ou *Immediate Early*, IE) codent des facteurs de transcription qui vont induire l'expression de gènes précoces (*Early*, E) ; ceux-ci codent des protéines impliquées dans la réplication du génome viral dont l'ADN polymérase (UL54) et la sérine-thréonine kinase (UL97) virales. Après réplication de l'ADN viral et expression des gènes structuraux ou tardifs (*Late*, L) (protéines de capsid, d'enveloppe et aussi la protéine de tégment pp65), le génome viral est encapsidé et la nucléocapside est maturée au cours d'un cheminement complexe à travers les membranes intracellulaires endoplasmiques pour libérer de nouveaux virions par bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique.

La transmission à une nouvelle cellule se fait soit par l'intermédiaire des particules virales libres soit par contacts intercellulaires. Il est à noter que le tropisme endothélial et épithélial de CMV est l'apanage des souches primaires isolées de prélèvements de patients infectés, et qui expriment la région ULb' du génome viral.

Latence et réactivation

La réplication virale est rapidement contrôlée par la mobilisation de l'ensemble des acteurs de l'immunité innée et adaptative [5], avec production d'anticorps neutralisants et expansion de lymphocytes T cytotoxiques. Le virus entre ensuite en phase de latence, avec arrêt de la production de particules infectieuses et expression virale limitée aux protéines nécessaires au maintien du programme de latence. Cette infection latente s'établit à vie dans l'organisme ; elle reste encore assez mal connue. Elle a été observée dans les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ circulants et les monocytes mais d'autres cellules (cellules endothéliales notamment), disséminées dans les tissus, sont probablement susceptibles d'héberger le virus latent *in vivo*. Durant la latence, le génome viral persiste sous forme épisomale dans le noyau de la cellule infectée sans intégration au génome cellulaire ; l'expression virale est très limitée, restreinte à des protéines spécifiques dont le rôle principal est d'inhiber la présentation des épitopes viraux aux cellules immunitaires. L'infection latente doit être différenciée de la persistance avec production à bas bruit de particules virales, en deçà des techniques de détection habituelles. Sous l'action de certains facteurs, le virus peut se réactiver avec production de nouvelles particules virales infectieuses. Ces facteurs sont encore mal identifiés ; ils peuvent impliquer une stimulation du système immunitaire lors d'une infection, d'un stress important, d'une inflammation, de réactions allogéniques (grossesse, transfusion, greffe d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques), ou au contraire une diminution de sa vigilance (administration de traitements immunosuppresseurs et chimiothérapies). La réinfection par des souches différentes est également possible.

CMV et inflammation

Les interactions de CMV avec le système immunitaire sont nombreuses et complexes, tant avec les acteurs de l'immunité innée qu'avec ceux de la réponse adaptative [2, 4-6]. De par ses activités pro- et anti-inflammatoires, CMV est souvent qualifié d'« immunopathogène » [2]. L'activation du système immunitaire commence très précocement, dès la reconnaissance des protéines virales par les *Toll Like Receptors* (TLR) et l'activation de la production des interférons [6]. L'infection des cellules par CMV augmente la sécrétion de cytokines et de chi-

miokines pro-inflammatoires telles que la *Transforming Growth Factor* (TGF)- β , le TNF- α , l'interleukine (IL)-1 β , l'IL-6, le *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), le facteur RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted* ou CCL5 pour *Chemokine (C-C motif) Ligand-5*), le *Monocyte Chemo-attractant Protein* (MCP)-1, les *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1 α et β [6, 7]. La reconnaissance des cellules infectées par les cellules cytotoxiques induit également la production de cytokines pro-inflammatoires [6]. Une population de lymphocytes T non conventionnels, les lymphocytes T γ 6, joue aussi un rôle prépondérant dans la lutte anti-CMV et est notamment présente dans le tissu intestinal. En cas d'infection à CMV, ces lymphocytes T γ 6, à la frontière entre les systèmes immunitaires innés et adaptatifs, sont capables d'induire une synthèse précoce de cytokines pro-inflammatoires et de se multiplier de manière importante afin d'exercer leur activité cytotoxique anti-CMV [8]. De plus, CMV est capable de produire des homologues du récepteur du TNF- α , de cytokines (IL-8, IL-10), de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et de chimiokines (protéines virales US27, US28, UL33, UL78) [7]. Ainsi, CMV produit une IL-10 virale qui diminue la réponse immunitaire cellulaire T et qui a une action anti-inflammatoire. Par contre, ce virus active l'expression de cytokines inflammatoires *via* la stimulation du facteur de transcription NF κ B, de la cyclo-oxygénase-2 et de la 5-lipo-oxygénase [9]. L'ensemble de ces médiateurs pro-inflammatoires participe à l'activation de la réplication virale comme nous le décrirons un peu plus loin. L'instauration d'un véritable cercle vicieux entre infection à CMV et inflammation est ainsi évoquée par plusieurs auteurs [2, 7, 10].

Antiviraux actifs sur CMV

La principale molécule antivirale utilisée, en traitement préemptif ou curatif, en particulier chez le patient immunodéprimé, est le ganciclovir (et sa prodrogue administrable par voie orale, le valganciclovir). Cet antiviral est un inhibiteur de la polymérase virale ; analogue de la guanosine, il agit comme terminateur de chaîne après phosphorylation par UL97. En cas de résistance, on peut utiliser le foscarnet, un peu plus toxique, qui est un analogue structural de l'anion pyrophosphate et qui inhibe sélectivement le site de liaison au pyrophosphate sur l'ADN polymérase virale, ou le cidofovir qui entre en compétition avec la polymérase virale comme analogue de la cytidine. D'autres molécules (esters de cidofovir, maribavir, letermovir, artésunate ..) arrivent sur le marché ; cependant leurs indications et leur disponibilité restent très limitées. Il n'existe actuellement aucun vaccin anti-CMV mais de nombreuses équipes travaillent à la mise au point de stratégies dans un but préventif,

pour empêcher la primo-infection, ou à visée thérapeutique, pour limiter les conséquences de l'infection, en particulier chez les patients immunodéprimés [11].

Tropisme digestif de CMV hors MICI

Une étude de séroprévalence réalisée en France en 2010 a montré que 41,9 % des individus âgés entre 15 et 49 ans avaient rencontré CMV [12] et sont donc susceptibles d'héberger du virus à l'état latent dans de nombreux organes ; la séroprévalence augmente avec l'âge. En l'absence d'étude analysant spécifiquement la prévalence de l'infection à CMV chez les patients atteints de MICI, cette dernière peut raisonnablement être considérée comme au moins équivalente à celle de la population générale. L'ensemble du tube digestif peut être infecté par CMV et le côlon est considéré comme un site majeur de la latence et de la réactivation virale. Les inclusions virales sont souvent retrouvées dans les cellules endothéliales mais aussi dans les macrophages, dans les cellules épithéliales, dans les fibroblastes et dans les cellules musculaires lisses [13, 14]. Le mécanisme de la pathogénèse de la colite à CMV reste encore mal compris ; la réplication du virus dans les cellules endothéliales pourrait générer une vascularite associée à une thrombose des micro-vaisseaux et une ulcération locale, ce qui induirait une colite ischémique [15].

Le tropisme digestif de CMV s'exprime cliniquement par la fréquence des infections digestives chez les patients immunodéprimés, notamment chez les receveurs d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques et les patients infectés par HIV au stade sida [4, 5, 10, 14]. L'infection à CMV est une cause majeure de rejet après greffe intestinale [2]. Chez les patients immunocompétents, plusieurs cas d'atteintes digestives ont été rapportés en situation de primo-infection, allant de l'œsophagite jusqu'à la rectite (hors MICI) [14, 16] ; le diagnostic n'est souvent évoqué que tardivement, après réalisation d'une endoscopie avec mise en évidence de marqueurs viraux sur la biopsie de tissu digestif ; le retard à l'administration d'un traitement antiviral peut parfois mettre en jeu le pronostic vital de ces patients considérés pourtant comme immunocompétents.

Rôle controversé de CMV dans les poussées inflammatoires de MICI—analyse des facteurs confondants

Chez les patients atteints de MICI, la colite à CMV est fréquente ; elle peut révéler la maladie inflammatoire qui n'était pas diagnostiquée jusqu'à l'épisode infectieux [10, 17]. En revanche, l'infection à CMV n'est pas

considérée comme un élément étiologique de la maladie inflammatoire. Réactivée par les lésions de la muqueuse intestinales et l'inflammation locale, elle peut favoriser les poussées, exacerber les atteintes muqueuses et raccourcir les périodes de rémission.

Le rôle de CMV dans les poussées inflammatoires de MICI a fait l'objet de débats, avec d'une part les auteurs en faveur d'un rôle actif du virus dans les poussées inflammatoires et de l'autre ceux qui sont adeptes du concept du « spectateur innocent » où l'infection à CMV ne jouerait aucun rôle sur l'évolution de la maladie [18, 19]. Une méta-analyse publiée en 2006 montrait une prévalence de l'infection à CMV dans les MICI comprise entre 0,5 et 100 % [20] ! Deux études publiées il y a une dizaine d'années permettent d'illustrer cette controverse : la première rapporte un taux de colectomie identique entre les patients CMV positifs et CMV négatifs, et une disparition spontanée des marqueurs d'infection chez les patients CMV positifs [21], tandis que la seconde montre une association entre l'infection à CMV et l'absence de réponse de la poussée au traitement par corticoïdes (corticorésistance) [22]. Ces divergences peuvent s'expliquer par l'inclusion de patients présentant des maladies différentes (RCH *versus* MC), avec des scores cliniques et des traitements hétérogènes, ou encore par l'utilisation de méthodes de détection de CMV non appropriées.

Réactivation tissulaire versus primo-infection

Il convient tout d'abord de mettre à part le cas particulier de la primo-infection à CMV chez les patients pour lesquels le diagnostic de MICI (RCH ou MC) est établi et qui reçoivent un traitement immunosuppresseur (notamment de type azathioprine). Dans ce contexte, la primo-infection à CMV peut être grave et se présente avec une virémie importante associée à des atteintes tissulaires, en particulier une pneumopathie et un syndrome d'activation macrophagique pouvant entraîner le décès du patient, même si un traitement par ganciclovir est rapidement instauré [19]. Les atteintes digestives sont rarement décrites lors de ces primo-infections et seront exclues du champ de cette revue.

RCH versus MC

RCH et MC sont deux affections distinctes (tableau 1). Anatomiquement, elles affectent le tube digestif de façons différentes : l'atteinte dans la RCH est constante au niveau du rectum et variable mais continue au niveau du côlon alors que dans la MC les lésions sont discontinues tout au long du tube digestif. Sur le plan immunologique, la MC se caractérise par une orientation des lymphocytes T de type Th1 avec production d'interféron (IFN) γ aux propriétés anti-CMV [6], alors que, dans la RCH, les lymphocytes T ont plutôt un profil de type Th2 avec production de cytokines pro-inflammatoires sans effet anti-CMV, ce

Tableau 1 Présentation comparative de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique.

	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
Épidémiologie		200 000 patients atteints en France 2,5 millions de patients atteints en Europe Diagnostic entre 20 et 30 ans
Clinique	Diarrhées Douleurs abdominales Signes cliniques variables suivant la localisation de l'atteinte muqueuse Altération de l'état général	Diarrhées Selles glairo-sanglantes Douleurs abdominales Ténesme Altération de l'état général
Biologie		Marqueurs biologiques des MICI (ANCA, ASCA, CF) Syndrome inflammatoire (CRP augmentée) Anémie (ferriprive, inflammatoire) Malabsorption
Imagerie		Scanner (complications) Entéro-IRM ou vidéocapsule (atteintes digestives non accessibles aux endoscopies)
Endoscopie / Biopsie	Atteinte discontinue de la muqueuse Infiltration lympho-plasmocytaire Granulomes épithélioïdes géantocellulaires sans nécrose caséuse	Atteinte digestive continue et terminale Infiltration lympho-plasmocytaire Absence de granulome épithélioïde géantocellulaire
Évolutions		Poussées / rémissions Impact socioprofessionnel majeur Complications : fistules, sténoses, occlusions, abcès, perforations, nécroses
Traitements		Corticoïdes (lors des poussées) Azathioprine (traitement de fond et/ou association avec les anti-TNF- α) Biothérapie (colites sévères ou non contrôlées) Chirurgie (si complications ou échec des traitements médicaux) Colectomie partielle ou totale

ANCA : *antineutrophil cytoplasmic antibodies* ou anticorps anti-neutrophile cytoplasmatique ; ASCA : anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* ; CF : calprotectine fécale ; CRP : protéine C réactive ; TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha*.

qui favoriserait la réplication virale [23] (*figure 1*). C'est cette différence immunologique majeure qui est avancée pour expliquer pourquoi la réactivation de CMV est rare dans les poussées de MC alors qu'elle est fréquente dans celles de RCH. Ainsi, dans notre cohorte stéphanoise, nous avons montré que l'infection tissulaire à CMV était de 11 % chez les patients corticoréfractaires atteints de MC *versus* 38 % en cas de RCH [25] ; des prévalences similaires ont été publiées dans la littérature [19]. Dans la suite de notre exposé, nous nous intéresserons donc uniquement au rôle de CMV dans les poussées de RCH.

Analyse des marqueurs viraux

L'infection de la muqueuse par CMV ne peut pas être diagnostiquée par le seul examen endoscopique de la muqueuse et des marqueurs viraux doivent être recherchés dans les prélèvements du patient. Les méthodes de détection de

l'infection à CMV sont très hétérogènes dans les études et constituent un biais majeur dans l'interprétation des résultats. L'infection à CMV peut être mise en évidence par des méthodes indirectes (détection des IgM et des IgG spécifiques) et directes (détection du virus ou des constituants du virus) (*figure 2*). Certaines de ces méthodes ne sont pas adaptées à la mise en évidence de la réactivation de CMV à partir de son réservoir intestinal.

La présence d'IgG anti-CMV permet de cibler les patients à risque de réactivation virale ; la sérologie IgM et IgG permet également de mettre en évidence une séroconversion et une primo-infection de pronostic défavorable. En dehors de ces indications, la sérologie n'a pas d'intérêt pour le suivi des patients atteints de MICI.

En dehors de la primo-infection, la virémie est peu fréquente chez les patients atteints de RCH [26] et ne survient qu'après plusieurs jours ou semaines de réplication du virus dans le tissu colique inflammatoire. Les réactivations

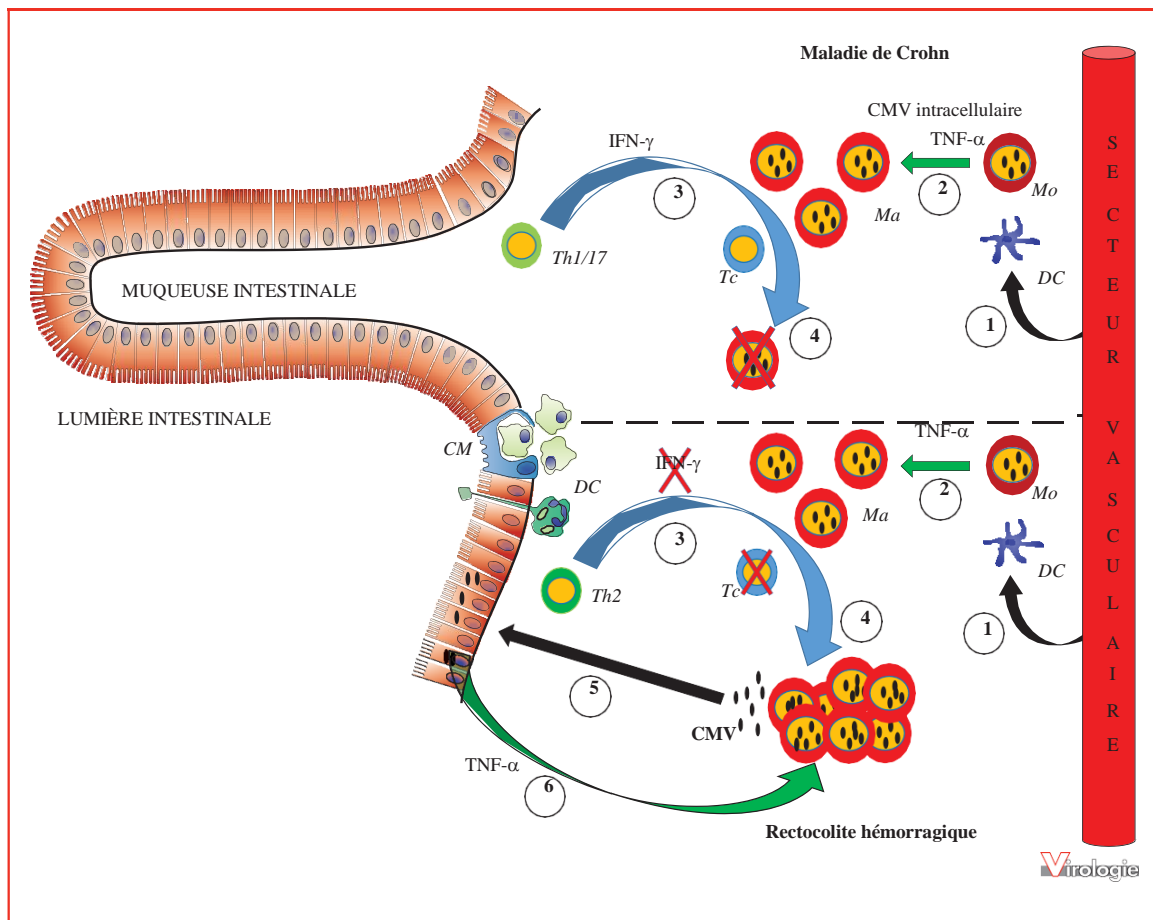


Figure 1. Hypothèses physiopathologiques concernant la réactivation de CMV au cours des MICI (adapté de [24]).
 Partie supérieure : maladie de Crohn. 1. Recrutement des cellules dendritiques et des monocytes sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires (notamment le TNF- α) et de chimiokines, au niveau de la muqueuse intestinale. 2. Différenciation des monocytes en macrophages sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires (notamment le TNF- α). 3. Production d'IFN- γ due à l'orientation Th1/Th17 de la maladie de Crohn. 4. Contrôle de la réactivation virale par élimination des cellules réservoirs de CMV.
 Partie inférieure : rectocolite hémorragique. 1. Recrutement des cellules dendritiques et des monocytes sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires (notamment le TNF- α) et de chimiokines, au niveau de la muqueuse intestinale. 2. Différenciation des monocytes en macrophages sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires (notamment le TNF- α). 3. Absence de production d'IFN- γ due à l'orientation Th2 de la rectocolite hémorragique. 4. Réactivation et multiplication virales. 5. Infection des cellules épithéliales. 6. Production de TNF- α par les cellules inflammatoires impliquant une boucle amplificatrice et favorisant la multiplication virale.
 CM : cellules M ; CMV : cytomégalo virus ; DC : cellules dendritiques ; IFN- γ : interféron gamma ; Ma : macrophage ; Mo : monocyte ; Tc : lymphocyte T cytotoxique ; TNF- α : *Tumor Necrosis Factor α* ; Th : *lymphocyte T helper*.

tissulaires des patients virémiques sont donc en général de moins bon pronostic. Les techniques qui visent à mettre en évidence le virus dans le sang périphérique (antigénémie pp65, technique encore utilisée dans de nombreux pays, et charge virale par PCR quantitative (qPCR) qui remplace l'antigénémie pp65 en raison de sa praticabilité et sa meilleure sensibilité, (figure 2)) sont donc peu précoces et manquent de sensibilité pour le diagnostic d'infection

tissulaire [27] ; elles ne peuvent pas être utilisées dans les réactivations coliques comme elles le sont chez le patient immunodéprimé pour suivre la réactivation virale au niveau systémique. Les travaux à l'appui de la théorie de « CMV spectateur innocent » ont globalement détecté les stigmates d'infection à CMV dans le sang des patients par antigénémie pp65, voire par des techniques sérologiques, et ont rarement ciblé l'atteinte tissulaire [19].

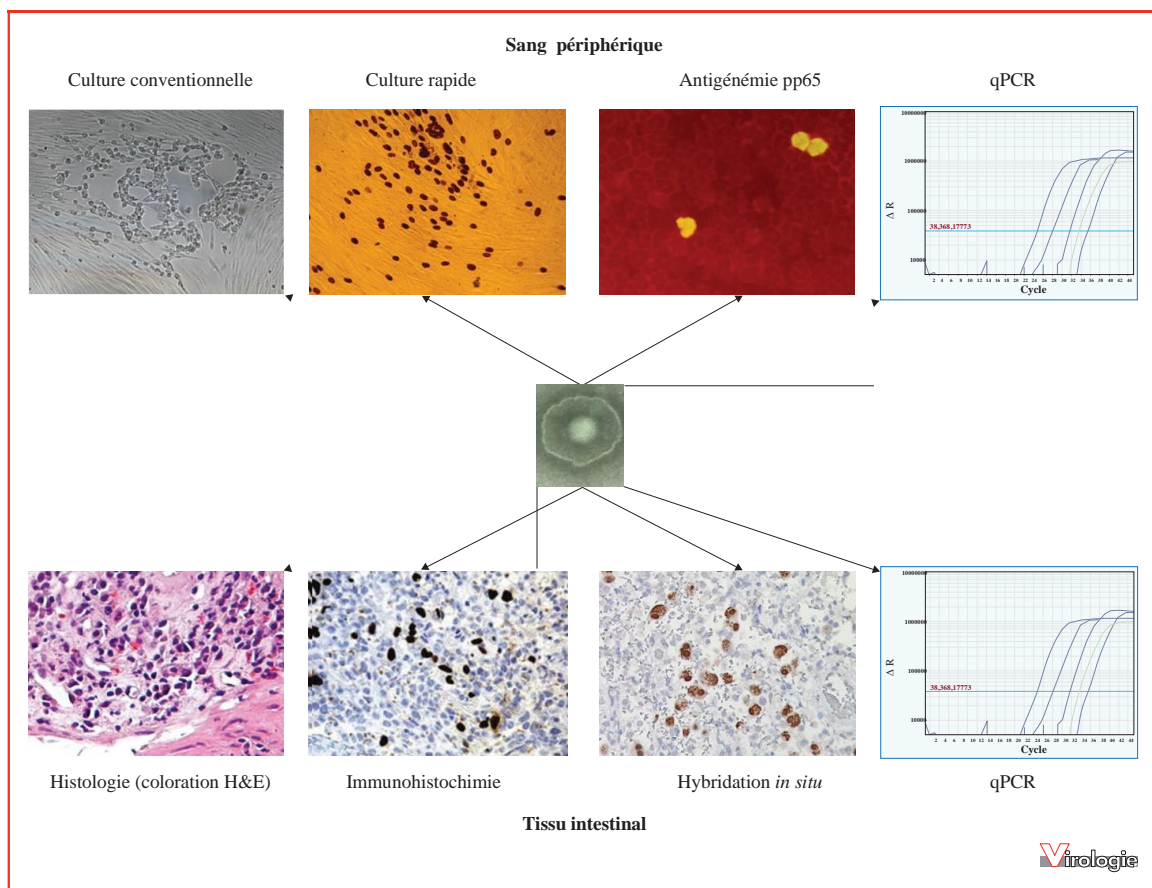


Figure 2. Méthodes utilisées pour le diagnostic d'une infection à CMV au niveau systémique (partie supérieure) et au niveau intestinal (partie inférieure) (adapté de [19]).

La réactivation de CMV étant, au moins initialement, localisée au niveau colique chez les patients atteints de RCH, ce sont plutôt les techniques qui visent à détecter le virus dans le côlon qui sont les plus pertinentes [26, 27] et sont actuellement recommandées par les sociétés savantes [28] (figure 2). Ces techniques peuvent être histologiques et pratiquées plutôt dans des laboratoires d'anatomopathologie, avec observation de cellules « en œil de hibou » après coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E), reflétant l'effet cytopathogène *in vivo* de CMV et qui sont pathognomoniques de l'infection. Afin d'augmenter la sensibilité de cette simple coloration H&E, les cellules exprimant des antigènes très précoces (IE) et précoces (E) du virus peuvent être révélées par immunohistochimie (IHC) ; cette technique permet également une semi-quantification de la charge virale tissulaire après dénombrement du nombre de noyaux colorés par champs au microscope optique [29].

Cette technique reste le « gold standard » du diagnostic d'une colite à CMV. Au laboratoire de virologie, ce sont plutôt les méthodes moléculaires qui sont effectuées sur les biopsies tissulaires, avec notamment la mesure de la charge virale tissulaire par qPCR. Les techniques quantitatives avec mesure de la charge virale tissulaire doivent être préférées aux méthodes qualitatives ; la PCR nichée doit être proscrite en raison du risque important de contaminations générant des résultats faussement positifs.

Les recommandations internationales n'ont pas tranché entre IHC et qPCR [28] qui sont utilisées actuellement par les différentes équipes. La qPCR est cependant plus sensible que l'IHC [29-31], pouvant même être à l'origine de résultats faussement positifs en cas de charge virale faible ; elle ne permet pas d'affirmer le caractère infectieux du génome détecté contrairement à l'observation de cellules infectées exprimant des antigènes viraux. Afin d'analyser le rôle

Tableau 2 Évaluation de la gravité de la rectocolite hémorragique par le score de Mayo. Le score de Mayo est compris entre 0 et 12 points. L'activité est considérée comme minimale à modérée pour un score de Mayo compris entre 2 et 5 points ; elle est modérée à sévère pour un score de Mayo supérieur à 6 points.

Critères	Nombre de points attribués
Nombre de selles par jour	0 : 0 selle 1 : 1 à 2 selles 2 : 3 à 4 selles 3 : plus de 5 selles
Saignement rectal	0 : aucun 1 : présence de sang dans les selles la moitié du temps 2 : présence de sang dans les selles dans la majorité des cas 3 : saignement en dehors des selles
Observation endoscopique de la muqueuse intestinale (sous-score endoscopique de Mayo)	0 : muqueuse normale, maladie inactive 1 : colite légère (érythème, friabilité légère, muqueuse sèche) 2 : colite modérée (érythème, friabilité modérée, absence d'atteinte vasculaire) 3 : colite sévère (ulcération, saignement spontané)
Évaluation médicale globale	0 : normale 1 : légère 2 : modérée 3 : sévère

pronostique de ces deux marqueurs, les recherches s'orientent vers la définition de seuils de charge virale pour la prise en charge thérapeutique des patients [19, 32-34] ; dans le cas de la qPCR, un consensus sur l'expression des résultats doit aussi être instauré car chaque équipe utilise des unités différentes, ce qui rend difficile la comparaison des résultats [26, 29, 35, 36].

Se pose également la question du site de la biopsie. Les marqueurs d'infection à CMV ne sont pas détectés dans le tissu sain ; on les retrouve uniquement dans le tissu inflammatoire [26, 29, 35]. Comme l'inflammation est répartie de façon hétérogène dans la muqueuse, que l'analyse est effectuée sur un échantillon minuscule (5 mg de muqueuse en général) et qu'il n'est pas toujours facile d'apprécier le caractère inflammatoire de la muqueuse au moment de l'observation endoscopique, différents auteurs recommandent d'analyser plusieurs biopsies [29, 36-38]. La présence d'ulcères, zones particulièrement inflammatoires de la muqueuse digestive, est corrélée à l'infection tissulaire à CMV [39] ; la charge virale CMV est également plus élevée dans les zones ulcérées [29]. Ces sites sont donc à privilégier pour rechercher les marqueurs d'infection à CMV [3, 19, 29].

Inflammation et traitements immunosuppresseurs participant à la réactivation colique de l'infection à CMV au cours de la RCH

Dans cette affection, la muqueuse est fragile, avec des érosions, des saignements voire des ulcères superficiels

ou profonds au niveau des zones les plus inflammatoires. L'activité de la maladie est évaluée par un score clinique de Mayo (*tableau 2*) associé à l'analyse de l'état inflammatoire de la muqueuse lors de l'endoscopie par un sous-score endoscopique de Mayo (*tableau 2*). Ces scores permettent également de suivre l'efficacité des traitements médicamenteux. La réactivation de CMV dans la muqueuse intestinale au cours de la RCH est reliée au degré d'inflammation de la muqueuse et est observée prioritairement dans les zones inflammatoires ou ulcérées. Les patients atteints de RCH présentent une altération de leur muqueuse digestive avec une inflammation importante, voire des ulcérations, et reçoivent souvent des traitements immunosuppresseurs ; ils cumulent ainsi deux facteurs favorisants majeurs de la réactivation de CMV.

Rôle de l'inflammation

La maladie inflammatoire des patients atteints de RCH affecte plus particulièrement la muqueuse digestive, avec une altération de la barrière intestinale et du microbiote, une réaction exacerbée contre des antigènes du tube digestif, notamment des bactéries commensales non pathogènes, et une altération des réponses immunitaires innées et adaptatives entraînant la production locale de nombreuses cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-12, l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-23 (*figure 3*). Dans un environnement inflammatoire (présence de TNF- α , IL-1 β , IL-6), les chimiokines telles que CCL3 et CCL4 sont susceptibles de recruter des cellules réservoirs hébergeant du virus latent comme les monocytes qui, sous l'action du TNF- α , se

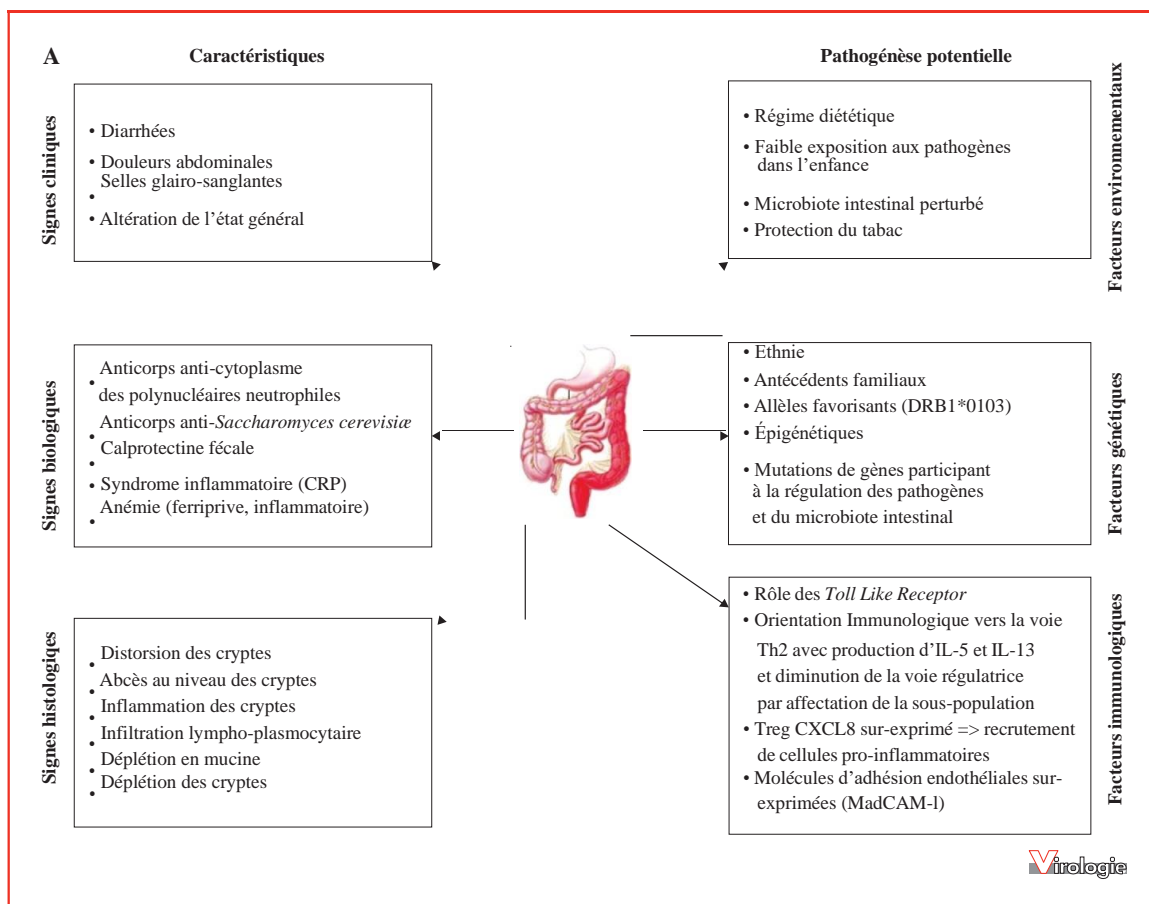


Figure 3. Principales caractéristiques cliniques, biologiques, histologiques (A) et physiopathologiques (B) de la rectocolite hémorragique (adapté de [40, 41]).

Explication du schéma B. La rupture des jonctions épithéliales augmente la perméabilité intestinale et facilite le passage des micro-organismes de la lumière intestinale vers la *lamina propria*. Les micro-organismes sont captés par les cellules dendritiques et les macrophages par le biais de *Toll Like Receptor* (TLR) puis les antigènes sont apprêtés par le *human leucocyte antigen* (HLA) de type II afin d'être présentés au récepteur T (TCR) des lymphocytes T CD4⁺. Dans un environnement pro-inflammatoire et suite à leur activation, les lymphocytes T s'orientent vers une voie T_H (Lymphocyte T *helper*) de type 2 avec sécrétion d'interleukine (IL)-5, IL-6 et IL-13. Les macrophages activés sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que le *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α et l'IL-6. Les lymphocytes T_H9 participent directement à l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale *via* la sécrétion d'IL-9. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont une fonctionnalité diminuée ne leur permettant pas de contrecarrer l'état inflammatoire local. Le recrutement de leucocytes circulants se fait du compartiment vasculaire vers la *lamina propria* par 2 molécules endothéliales dénommées *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1* (MadCAM-1) et intégrine $\alpha\beta_7$. Il est facilité par des chimiokines comme CXCL (*chemokine C-X-C motif ligand*) -1, -3, -8 et -10, amplifiant ainsi l'inflammation locale.

différencient en macrophages ou en cellules dendritiques qui produisent des particules virales. La fixation du TNF- α sur son récepteur active la protéine kinase C et le facteur NF- κ B qui stimulent la transcription des gènes *IE* et ainsi la réplication virale [2, 5]. D'autres médiateurs comme les prostaglandines pro-inflammatoires, les catécholamines de stress, l'épinéphrine et la norépinéphrine, activent également l'expression des gènes *IE* par augmentation de l'AMP

cyclique [5]. La réplication de CMV est ainsi particulièrement favorisée par l'inflammation chronique [7].

Rôle des traitements immunosuppresseurs

La réactivation de CMV est également favorisée par l'administration de médicaments aux propriétés immunosuppresseurs par voie systémique [42, 43]. Les corticoïdes, qui constituent la première ligne de traitement en cas de

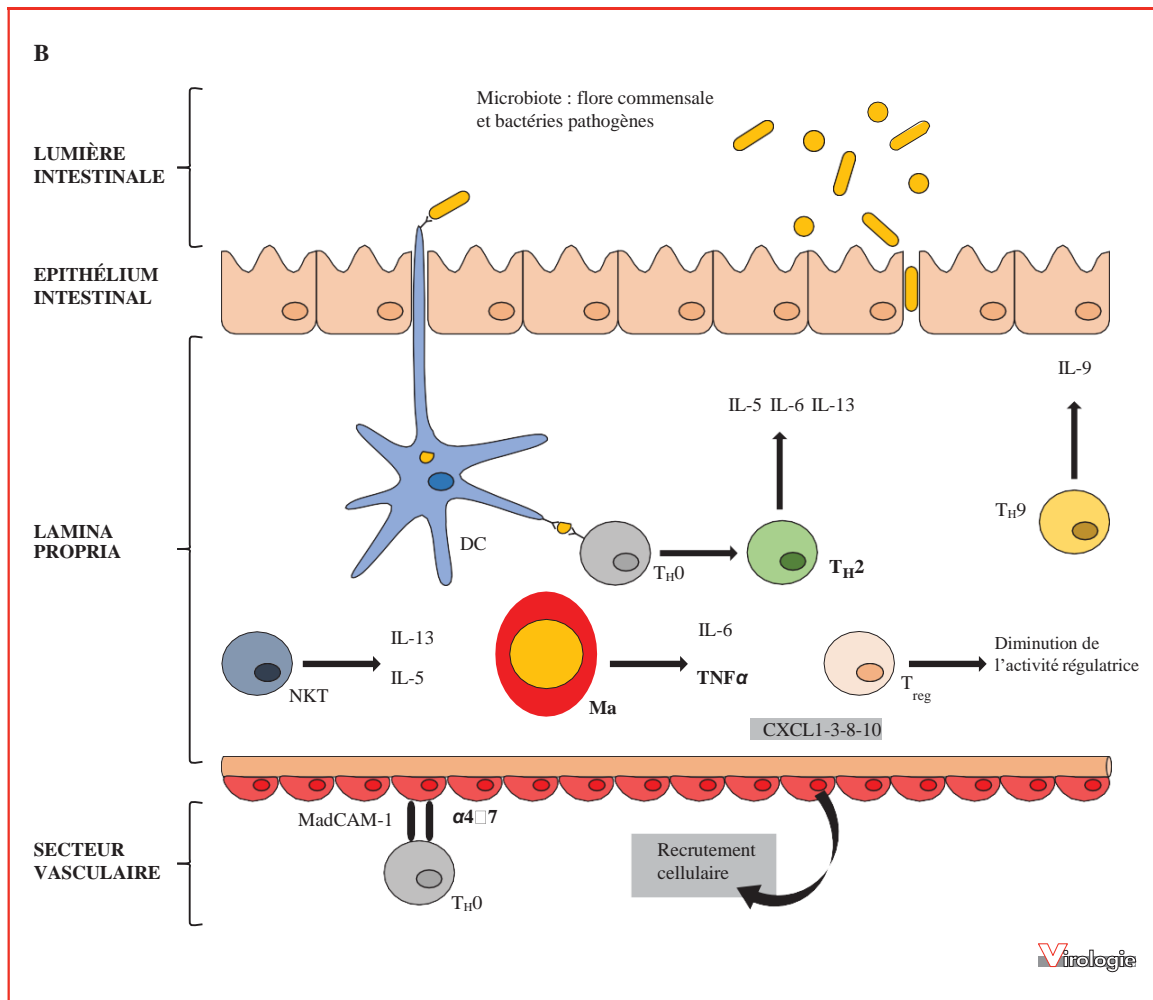


Figure 3. Principales caractéristiques cliniques, biologiques, histologiques (A) et physiopathologiques (B) de la rectocolite hémorragique (adapté de [40, 41]).

Explication du schéma B. La rupture des jonctions épithéliales augmente la perméabilité intestinale et facilite le passage des micro-organismes de la lumière intestinale vers la *lamina propria*. Les micro-organismes sont captés par les cellules dendritiques et les macrophages par le biais de *Toll Like Receptor* (TLR) puis les antigènes sont apprêtés par le *human leucocyte antigen* (HLA) de type II afin d'être présentés au récepteur T (TCR) des lymphocytes T CD4⁺. Dans un environnement pro-inflammatoire et suite à leur activation, les lymphocytes T s'orientent vers une voie T_H (Lymphocyte T *helper*) de type 2 avec sécrétion d'interleukine (IL)-5, IL-6 et IL-13. Les macrophages activés sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que le *Tumor Necrosis Factor* (TNF)-α et l'IL-6. Les lymphocytes T_H9 participent directement à l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale *via* la sécrétion d'IL-9. Les lymphocytes T régulateurs (T_{reg}) ont une fonctionnalité diminuée ne leur permettant pas de contrecarrer l'état inflammatoire local. Le recrutement de leucocytes circulants se fait du compartiment vasculaire vers la *lamina propria* par 2 molécules endothéliales dénommées *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1* (MadCAM-1) et intégrine α₄β₇. Il est facilité par des chimiokines comme CXCL (*chemokine C-X-C motif ligand*) -1, -3, -8 et -10, amplifiant ainsi l'inflammation locale.

poussée modérée à sévère de MICI (*tableau 3*), favorisent la réactivation de l'infection à CMV [9, 19, 22, 42, 43]. Dans une méta-analyse récente rassemblant 16 études observationnelles, l'exposition aux corticoïdes double le risque de réactivation tissulaire de CMV (OR = 2,10 ; IC

95 % = 1,31-3,37) [43]. Les corticoïdes favorisent, d'une manière générale, les infections en modulant les activités des monocytes et des lymphocytes T. Par ailleurs, les corticoïdes facilitent la transcription des gènes *IE* [44] et la réactivation du virus latent dans les cellules infectées [45].

Le risque d'infection à CMV chez les patients atteints de RCH et traités par thiopurines est également accru (OR = 1,76 ; IC 95 % = 1,21-2,57) [43]. L'administration de cyclosporine A favorise aussi la réactivation de l'infection à CMV de façon significative, même si les deux séries ayant montré ces résultats portent sur des effectifs limités [22, 46]. En revanche, les anticorps monoclonaux anti-TNF- α de type infliximab ou adalimumab n'augmentent pas le risque de réactivation de CMV [43, 47, 48] et l'infection tissulaire à CMV n'est pas associée à la résistance à ces biothérapies [47]. Ces résultats bénéfiques des anti-TNF- α sur l'infection à CMV sont probablement en lien avec, d'une part, la réduction de l'effet pro-inflammatoire du TNF- α et, d'autre part, une baisse de la réplication virale favorisée par cette même cytokine [49]. Nous avons proposé récemment que ces biothérapies soient privilégiées dans le traitement des poussées modérées à sévères accompagnées d'infection colique à CMV [19].

Rôle péjoratif actif des réactivations à CMV dans les poussées de RCH

Après avoir éliminé les différents facteurs confondants, un consensus s'installe au sein de la communauté des gastroentérologues pour considérer que la réactivation colique à CMV est un facteur de mauvais pronostic chez les patients présentant une poussée modérée à sévère de RCH [19]. D'ailleurs, les recommandations internationales mentionnent depuis plusieurs années la nécessité de la détection des marqueurs viraux en cas de résistance aux immunosuppresseurs ainsi que la mise en place possible d'un traitement antiviral sans interrompre le traitement immunosuppresseur [28].

Association de l'infection à CMV à une évolution péjorative de la RCH

L'infection à CMV dans les poussées de RCH est un facteur majeur de non réponse au traitement immunosuppresseur, en particulier aux corticoïdes. Elle est également associée à un taux de colectomie plus important [22, 34, 50] et à un risque de surinfection par *Clostridium difficile* [51]. Ces risques chirurgicaux et infectieux ainsi que l'optimisation nécessaire de la thérapeutique avec l'utilisation de traitements intraveineux augmentent la durée d'hospitalisation des patients [38, 52].

Association à la corticorésistance et à la résistance aux traitements immunosuppresseurs

Comme discuté précédemment, l'administration de traitements immunosuppresseurs favorise la réactivation de

CMV. La prise de corticoïdes est considérée, par l'ensemble de la communauté, comme un facteur de risque majeur [19, 43]. En retour, l'infection à CMV est très fortement associée à la résistance de la poussée inflammatoire aux corticoïdes. La *figure 4* présente une méta-analyse portant sur 9 études publiées entre 2001 et 2016 [22, 26, 36, 53-58] et ayant évalué de façon prospective la corticorésistance chez des patients en poussées de RCH en fonction de l'existence ou non d'une infection colique à CMV diagnostiquée selon les critères définis au paragraphe précédent. Le risque de corticorésistance est considérablement augmenté (*odds ratio* supérieur à 20) en cas de colite à CMV. Dans les études utilisant des techniques de détection de CMV moins sensibles comme l'IHC, il est probable qu'un pourcentage de cas étiquetés comme indemnes de colite à CMV correspond à des faux-négatifs. En ce qui concerne la recherche de colite à CMV par qPCR, nous avons établi un seuil de charge virale associé à la corticorésistance de 10 copies/mg de tissu [26] ou de 5 unités internationales (UI) pour 100 000 cellules [36].

Nous avons par ailleurs montré que la charge virale CMV tissulaire permet de prédire la réponse à plusieurs lignes de traitement immunosuppresseur : une charge virale supérieure à 250 copies/mg de tissu ou à 370 UI/100 000 cellules (sensibilité de 95,2 % [IC 95 % : 88,1-100 %] et spécificité de 97,2 % [IC 95 % : 93,5-100 %]) est associée à la résistance à plus de 2 lignes successives de traitement [26, 36]. En revanche, comme rappelé plus haut, l'infection tissulaire par CMV n'altère pas l'efficacité des anti-TNF- α , et ce même si la charge virale est élevée [47].

Indications de la mesure de la charge virale au cours des poussées de RCH

Plusieurs auteurs proposent la mesure de la charge virale par IHC ou par qPCR afin d'ajuster le traitement anti-inflammatoire et d'envisager la mise en place d'un traitement antiviral [3, 19, 59, 60]. Actuellement, l'hétérogénéité des méthodes et des seuils obtenus ne permet pas d'établir de valeurs consensuelles pour l'ajustement thérapeutique. De plus, il a été souligné l'importance de l'analyse de plusieurs biopsies afin d'éviter les résultats faux négatifs, notamment lorsque l'évaluation de l'état inflammatoire de la muqueuse est difficile [36]. Malgré ces difficultés techniques, il est clair que les patients qui ont une charge virale tissulaire élevée présentent un risque de colectomie plus important [33, 50] et devraient bénéficier d'un traitement antiviral.

Cependant, il n'est pas envisageable de proposer une recto-sigmoidoscopie avec prélèvement de tissu inflammatoire à tous les patients présentant une poussée de RCH, notamment pour des raisons économiques. Les études actuelles s'orientent donc sur la définition de facteurs prédictifs

Tableau 3 Traitements médicaux utilisés dans la rectocolite hémorragique selon le consensus national français de 2016 (adapté de [1]).

Médicaments	Voie(s) d'administration	Mécanisme(s) d'action	Indications selon les recommandations françaises
Salicylates			
Acide 5-aminosalicylique (5 ASA)	Orale Locale	Diminution de l'inflammation en bloquant la cyclo-oxygénase et en inhibant la production de prostaglandines. Inhibition de la voie NFκB (diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires).	Traitement oral d'entretien pour les colites modérées (1,6 à 2 g/j) lors du diagnostic ou lors d'une période de rémission de 1 à 2 ans dont la poussée était traitée par corticoïde. Traitement par 4 g/jour par voie orale en cas de rechute avec ajout d'un traitement local.
Corticoïdes			
	Orale Intra-veineuse (IV)	Diminution du chimiotactisme vers les sites inflammatoires. Inhibition des fonctions microbicides et de phagocytose et, inhibition des fonctions lymphocytaires T.	Traitement oral en cas de poussée de rectocolite hémorragique modérée et échec du traitement par 5-ASA. Traitement oral d'emblée en cas de poussée de rectocolite hémorragique sévère. Discussion d'un traitement IV en cas de rectocolite sévère non maîtrisée.
Thiopurines			
Azathioprine	Orale	Inhibition de la prolifération des lymphocytes T et B. Diminution de la production d'anticorps. Myélosuppression.	Traitement d'entretien par azathioprine (2,5 mg/kg/j) en cas de rectocolites modérées à sévères corticodépendantes avec arrêt des corticoïdes. Association à infliximab en cas d'échec de l'azathioprine seule.
Biothérapies par anticorps monoclonaux			
Anticorps anti-TNF-α		Altère la différenciation des monocytes en macrophages, l'activation des macrophages, le recrutement des macrophages et des neutrophiles ainsi que la formation de granulomes.	Rectocolite intolérante aux traitements par corticoïdes en cas de poussée non maîtrisée par 5-ASA. Rectocolite modérée à sévère résistante aux traitements par corticoïdes.
Infliximab	IV	Anticorps monoclonal chimérique anti-TNF-α.	Traitement par infliximab utilisé en association avec l'azathioprine.
Adalimumab	Sous-cutanée (SC)	Anticorps monoclonal humain anti-TNF-α.	Traitement en monothérapie.
Golimumab	SC	Anticorps monoclonal humain anti-TNF-α.	Traitement en monothérapie.
Anticorps anti-intégrine		Inhibition de l'adhésion des lymphocytes T exprimant l'α4β7 à la molécule-1 d'adhérence cellulaire d'adressine de muqueuse (MAdCAM-1) principalement exprimée sur les cellules endothéliales intestinales entraînant une diminution du recrutement intestinal des lymphocytes T.	Intolérance aux traitements par corticoïdes en cas de poussée non maîtrisée par 5-ASA, et échecs ou effets secondaires des anti-TNF-α.
Vedolizumab	IV	Anticorps monoclonal humain anti-α4β7 (anti-intégrine)	Traitement en monothérapie.
Cyclosporine			
	IV	Inhibition de la production d'IL-2 et d'autres cytokines produites par les lymphocytes T CD4+.	Colite aiguë grave ne répondant pas aux corticoïdes IV.

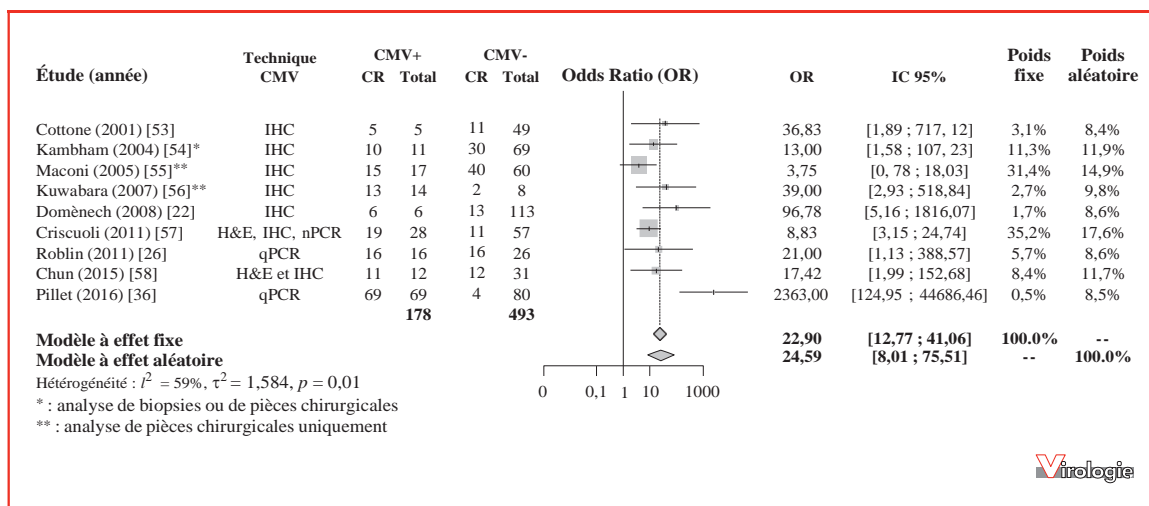


Figure 4. Méta-analyse sous forme de graphique « en forêt » concernant l'association entre corticorésistance et colite à CMV. Ont été incluses les études qui ont détecté CMV dans le tissu intestinal chez des patients en poussée de RCH sous corticothérapie. CR : poussée de RCH corticorésistante ; H&E : coloration à l'hématoxyline et éosine ; IC : intervalle de confiance ; IHC : immunohistochimie ; nPCR : PCR nichée ; OR : odds ratio ; qPCR : PCR quantitative en temps réel.

visant à cibler les patients pour lesquels une recherche de CMV dans le tissu inflammatoire aurait le meilleur rapport coût/bénéfice. Plusieurs définitions ont été proposées à partir d'études rétrospectives [38, 42, 48] mais aucune ne fait consensus actuellement ; la présence d'ulcères à l'endoscopie doit cependant inciter à la recherche des marqueurs viraux dans le tissu inflammatoire. Enfin, la mesure de la réponse immunitaire anti-CMV pourrait présenter un intérêt dans la prise en charge des poussées de RCH comme c'est le cas chez les patients immunodéprimés ; cette analyse pourrait également permettre de prédire le risque de réactivation de CMV et d'adapter le traitement immunosuppresseur.

Place du traitement antiviral

Il est présenté dans la littérature quelques cas isolés ou de petites séries de patients ayant présenté une poussée de RCH associée à une infection colique à CMV et chez qui a été instauré un traitement par ganciclovir (ou valganciclovir). L'intérêt d'un traitement antiviral se justifie surtout pour les poussées modérées à sévères et corticoréfractaires assorties d'une charge virale élevée [34]. Une méta-analyse a confirmé une diminution du risque de colectomie (OR 0,20 ; IC 95 % 0,08-0,49) sous l'effet d'un traitement antiviral en cas de poussée corticoréfractaire associée à une colite à CMV [59]. Nous avons montré que le traitement par ganciclovir de 8 patients en poussée de RCH et résistants à plusieurs lignes thérapeutiques

a permis de négativer la charge virale ADN dans le tissu inflammatoire et de restaurer la réponse aux traitements immunosuppresseurs [26]. Nous avons proposé un algorithme de prise en charge de ce type de patients qui tient compte de la charge virale CMV mesurée par IHC ou par qPCR dans le tissu inflammatoire (figure 5). Pour la plupart des auteurs, l'administration du traitement antiviral ne doit pas suspendre le traitement immunosuppresseur afin de maintenir un effet synergique sur l'inflammation et la réplication virale [49, 62], d'autant plus en cas de traitement par anti-TNF- α [47, 49]. L'European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) recommande la poursuite du traitement immunosuppresseur en cas de colite à CMV survenant sous traitement et son arrêt en cas d'infection systémique [28]. Un nouveau geste endoscopique peut être requis pour vérifier l'éradication de l'infection virale au niveau colique.

Conclusion et perspectives

La conduite thérapeutique à tenir au cours de la RCH est complexe et dépend de l'activité de la maladie, de sa localisation, de son évolution, des manifestations extra-intestinales et des effets secondaires des médicaments immunosuppresseurs administrés. Des algorithmes ont été récemment publiés par les gastroentérologues français pour mieux rationaliser cette prise en charge [1]. En complément de ces recommandations, nous suggérons avec d'autres

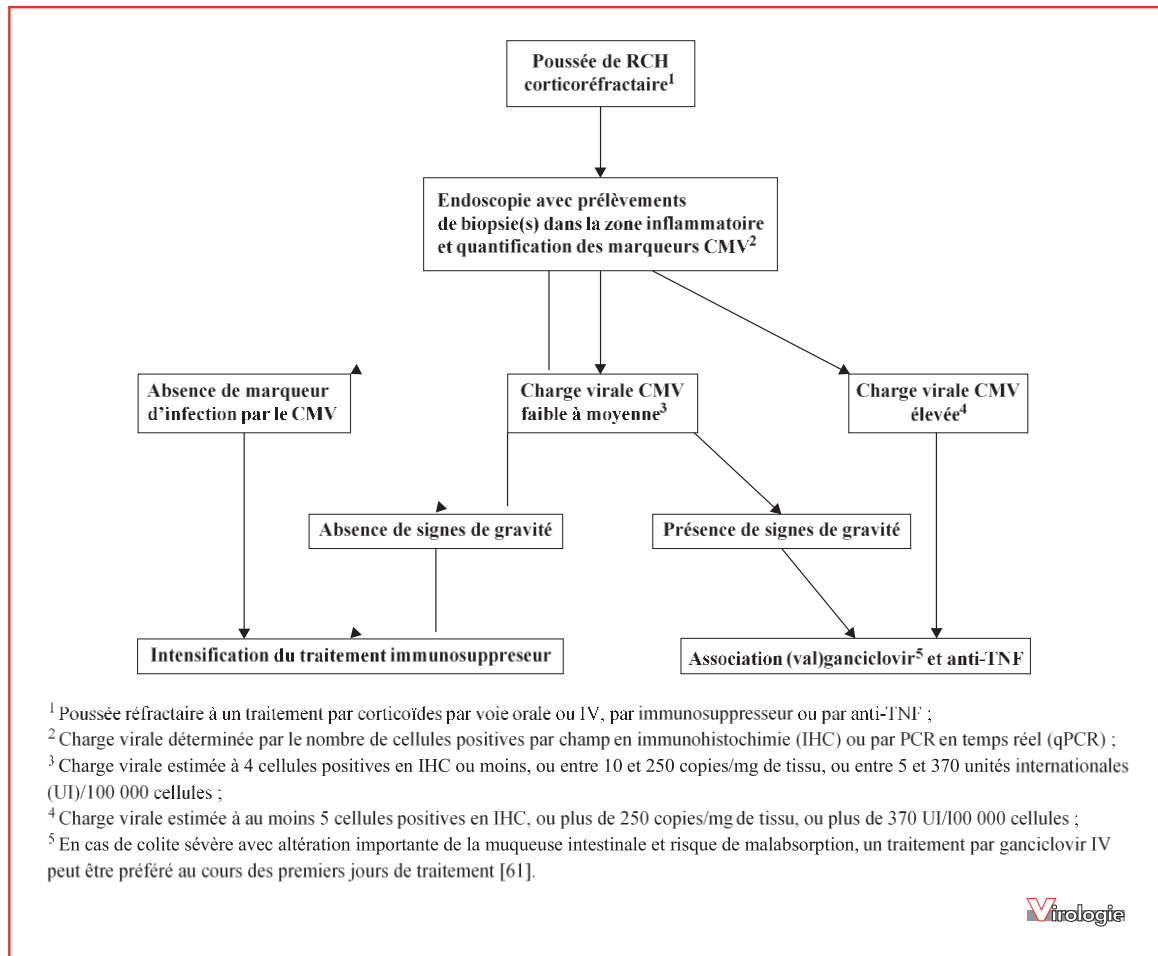


Figure 5. Algorithme de prise en charge des patients présentant une poussée de rectocolite hémorragique réfractaire aux corticoïdes ou immunosuppresseurs en fonction de la présence de CMV dans le tissu inflammatoire (adapté de [19]).

auteurs de prendre en compte, dans les formes modérées à sévères, l'infection colique par CMV [19] ; chez les sujets présentant une colite à CMV prouvée sur le plan virologique, nous proposons d'utiliser préférentiellement une biothérapie anti-TNF- α , associée à un antiviral de type ganciclovir en cas de charge virale élevée [61]. Même si la plupart des données récentes sont en faveur d'un rôle péjoratif de la colite à CMV dans les poussées de RCH et d'un impact favorable du traitement antiviral, cette stratégie de prise en charge mériterait d'être confirmée par un essai randomisé incluant des patients présentant une poussée de RCH corticoréfractaire associée à une colite à CMV.

La plupart des études se sont focalisées sur l'infection tissulaire à CMV. D'autres virus, en particulier de la famille

des *Herpesviridae*, pourraient également jouer un rôle dans les poussées de RCH, en association ou non avec CMV. Ainsi, des charges virales importantes pour EBV ont été retrouvées dans le tissu inflammatoire [35] ; il n'est pas exclu que l'on associe sa présence à des facteurs péjoratifs d'évolution, et notamment à celui de lymphome digestif. Pour en revenir à CMV, les mécanismes physiopathologiques de l'impact de l'infection virale sur la muqueuse intestinale sont encore largement méconnus : des modèles d'infection *in vitro* de cellules intestinales [63] et des modèles animaux ont été proposés [64-66] pour compléter les observations cliniques. La meilleure compréhension des interactions complexes entre le système immunitaire local et l'infection virale colique permettrait d'envisager

des stratégies thérapeutiques mieux ciblées et notamment une vaccination thérapeutique permettant de « guérir » le réservoir intestinal viral.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec leur article.

Références

- Peyrin-Biroulet L, Bouhnik Y, Roblin X, *et al.* Evolving treatment algorithms for ulcerative colitis: a French national consensus. *Hepato-Gastro Oncol Dig* 2016; 23: 32-42.
- Varani S, Landini MP. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae* 2011; 2: 6.
- Park SC, Jeon YM, Jeon YT. Approach to cytomegalovirus infections in patients with ulcerative colitis. *Korean J Intern Med* 2017; 32: 383-92.
- Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm and puzzle. *J Clin Invest* 2011; 121: 1673-80.
- Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 76-98.
- Rossini G, Cerboni C, Santoni A, *et al.* Interplay between human cytomegalovirus and intrinsic/innate host responses: a complex bidirectional relationship. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 607276.
- Söderberg-Nauclér C. Treatment of cytomegalovirus infections beyond acute disease to improve human health. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12: 211-22.
- Couzi L, Pitard V, Moreau J-F, Merville P, Déchanet-Merville J. Direct and indirect effects of cytomegalovirus-induced $\gamma\delta$ T cells after kidney transplantation. *Front Immunol* 2015; 6: 3.
- Xue M, Chen SJ, Wang LJ, Du Y, Si JM. Cytomegalovirus: a probable cause of steroid-refractory ulcerative colitis. *J Dig Dis* 2013; 14: 160-5.
- Goodman AL, Murray CD, Watkins J, Griffiths PD, Webster DP. CMV in the gut: a critical review of CMV detection in the immunocompetent host with colitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34: 13-8.
- Luisi K, Sharma M, Yu D. Development of a vaccine against cytomegalovirus infection and disease. *Curr Opin Virol* 2017; 23: 23-9.
- Antona D, Lepoutre A, Fonteneau L, *et al.* Seroprevalence of cytomegalovirus infection in France in 2010. *Epidemiol Infect* 2017; 145: 1471-8.
- Sinzger C, Grefte A, Plachter B, *et al.* Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 1995; 76: 741-50.
- You DM, Johnson MD. Cytomegalovirus infection and the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep* 2012; 14: 334-42.
- Hasegawa T, Aomatsu K, Nakamura M, Aomatsu N, Aomatsu K. Cytomegalovirus colitis followed by ischemic colitis in a non-immunocompromised adult: a case report. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 3750-4.
- Bernard S, Germe R, Lupo J, *et al.* Symptomatic cytomegalovirus gastrointestinal infection with positive quantitative real-time PCR findings in apparently immunocompetent patients: a case series. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21: 1121. e1-7.
- Chiba M, Abe T, Tsuda S, Ono I. Cytomegalovirus infection associated with onset of ulcerative colitis. *BMC Res Notes* 2013; 6: 40.
- Lawlor G, Moss AC. Cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: pathogen or innocent bystander? *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1620-7.
- Pillet S, Pozzetto B, Roblin X. Cytomegalovirus and ulcerative colitis: Place of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 2030-45.
- Criscuoli V, Rizzuto M-R, Cottone M. Cytomegalovirus and inflammatory bowel disease: is there a link? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4813-8.
- Matsuoka K, Iwao Y, Mori T, *et al.* Cytomegalovirus is frequently reactivated and disappears without antiviral agents in ulcerative colitis patients. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 331-7.
- Domènech E, Vega R, Ojanguren I, *et al.* Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis: a prospective, comparative study on prevalence and diagnostic strategy. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1373-9.
- Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1756-67.
- de Souza HSP, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13: 13-27.
- Roblin X, Pillet S, Berthelot P, *et al.* Prevalence of cytomegalovirus infection in steroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: E1396-7.
- Roblin X, Pillet S, Oussalah A, *et al.* Cytomegalovirus load in inflamed intestinal tissue is predictive of resistance to immunosuppressive therapy in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 2001-8.
- Tandon P, James P, Cordeiro E, *et al.* Diagnostic accuracy of blood-based tests and histopathology for cytomegalovirus reactivation in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2017; 23: 551-60.
- Rahier JF, Magro F, Abreu C, *et al.* Second European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2014; 8: 443-68.
- Zidar N, Ferkolj I, Tepes K, *et al.* Diagnosing cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease—by immunohistochemistry or polymerase chain reaction? *Virchows Arch Int J Pathol* 2015; 466: 533-9.
- McCoy MH, Post K, Sen JD, *et al.* qPCR increases sensitivity to detect cytomegalovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of gastrointestinal biopsies. *Hum Pathol* 2014; 45: 48-53.
- Burston J, van Hal S, Dubedat S, Lee A. Inclusions or bystanders? CMV PCR sensitivity and specificity in tissue samples. *J Clin Virol* 2017; 90: 38-9.
- Nakase H, Yoshino T, Matsumura K, *et al.* Positive finding of colonic polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA is not false positive but a warning for treating patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: E13-14.
- Nguyen M, Bradford K, Zhang X, Shih DQ. Cytomegalovirus reactivation in ulcerative colitis patients. *Ulcers* 2011; 2011. pii: 282507.
- Jones A, McCurdy JD, Loftus EV, *et al.* Effects of antiviral therapy for patients with inflammatory bowel disease and a positive intestinal biopsy for cytomegalovirus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 949-55.
- Ciccocioppo R, Racca F, Paolucci S, *et al.* Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in inflammatory bowel disease: need for mucosal viral load measurement. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 1915-26.
- Pillet S, Williet N, Pouvaret A, *et al.* Distribution of cytomegalovirus DNA load in the inflamed colon of ulcerative colitis patients. *Am J Gastroenterol* 2016; 111: 439-41.
- McCurdy JD, Enders FT, Jones A, *et al.* Detection of cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease: Where to biopsy and how many biopsies? *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21: 2833-8.
- Lee H-S, Park SH, Kim S-H, *et al.* Risk factors and clinical outcomes associated with cytomegalovirus colitis in patients with acute severe ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 22: 912-8.
- Suzuki H, Kato J, Kuriyama M, *et al.* Specific endoscopic features of ulcerative colitis complicated by cytomegalovirus infection. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1245-51.

1. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012; 380: 1606-19.
2. Low D, Nguyen DD, Mizoguchi E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Des Devel Ther* 2013;7: 1341-57.
3. Gauss A, Rosenstiel S, Schnitzler P, et al. Intestinal cytomegalovirus infection in patients hospitalized for exacerbation of inflammatory bowel disease: a 10-year tertiary referral center experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015; 27: 712-20.
4. Shukla T, Singh S, Tandon P, McCurdy JD. Corticosteroids and thiopurines, but not tumor necrosis factor antagonists, are associated with cytomegalovirus reactivation in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Gastroenterol*. Sous presse. doi: 10.1097/MCG.0000000000000758.
5. Inoue-Toyoda M, Kato K, Nagata K, Yoshikawa H. Glucocorticoids facilitate the transcription from the human cytomegalovirus major immediate early promoter in glucocorticoid receptor- and nuclear factor- κ B-like protein-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 458: 180-5.
6. Van Damme E, Sauviller S, Lau B, et al. Glucocorticosteroids trigger reactivation of human cytomegalovirus from latently infected myeloid cells and increase the risk for HCMV infection in D + R+ liver transplant patients. *J Gen Virol* 2015; 96: 131-43.
7. Minami M, Ohta M, Ohkura T, et al. Cytomegalovirus infection in severe ulcerative colitis patients undergoing continuous intravenous cyclosporine treatment in Japan. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 754-60.
8. Pillet S, Jarlot C, Courault M, et al. Infliximab does not worsen outcomes during flare-ups associated with cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21: 1580-6.
9. McCurdy JD, Jones A, Enders FT, et al. A model for identifying cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 131-7.
10. Nakase H, Honzawa Y, Toyonaga T, et al. Diagnosis and treatment of ulcerative colitis with cytomegalovirus infection: importance of controlling mucosal inflammation to prevent cytomegalovirus reactivation. *Intest Res* 2014; 12: 5-11.
11. Zagórowicz E, Bugajski M, Wieszczy P, et al. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis is related to severe inflammation and a high count of cytomegalovirus-positive cells in biopsy is a risk factor for colectomy. *J Crohns Colitis* 2016; 10: 1205-11.
12. McCurdy JD, Enders FT, Khanna S, et al. Increased rates of *Clostridium difficile* infection and poor outcomes in patients with IBD with cytomegalovirus. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 22: 2688-93.
13. Grossberg LB, Ezaz G, Grunwald D, et al. A national survey of the prevalence and impact of cytomegalovirus infection among hospitalized patients with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* sous presse. DOI : 10.1097/MCG.0000000000000736.
14. Cottone M, Pietrosi G, Martorana G, et al. Prevalence of cytomegalovirus infection in severe refractory ulcerative and Crohn's colitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 773-5.
15. Kambham N, Vij R, Cartwright CA, Longacre T. Cytomegalovirus infection in steroid-refractory ulcerative colitis: a case-control study. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 365-73.
16. Maconi G, Colombo E, Zerbi P, et al. Prevalence, detection rate and outcome of cytomegalovirus infection in ulcerative colitis patients requiring colonic resection. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 418-23.
17. Kuwabara A, Okamoto H, Suda T, Ajioka Y, Hatakeyama K. Clinicopathologic characteristics of clinically relevant cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2007; 42: 823-9.
18. Criscuolo V, Rizzuto MR, Montalbano L, Gallo E, Cottone M. Natural history of cytomegalovirus infection in a series of patients diagnosed with moderate-severe ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 633-8.
19. Chun J, Lee C, Kwon J-E, et al. Usefulness of the cytomegalovirus antigenemia assay in patients with ulcerative colitis. *Intest Res* 2015; 13: 50-9.
20. Shukla T, Singh S, Loftus EV, Bruining DH, McCurdy JD. Antiviral therapy in steroid-refractory ulcerative colitis with cytomegalovirus: Systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21: 2718-25.
21. Nakase H, Onodera K. Targeting cytomegalovirus during ulcerative colitis flare-ups. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2016: 1-7.
22. Siegmund B. Cytomegalovirus infection associated with inflammatory bowel disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2: 369-76.
23. Kopylov U, Papamichael K, Katsanos K, et al. Impact of infliximab and cyclosporine on the risk of colectomy in hospitalized patients with ulcerative colitis complicated by cytomegalovirus-A multicenter retrospective study. *Inflamm Bowel Dis* 2017; 23: 1605-13.
24. Esclatine A, Géniteau-Legendre M. Cytomégalovirus humain et cellules épithéliales intestinales. *Virologie* 2002;6: 267-77.
25. Onyeagocha C, Hossain MS, Kumar A, Jones RM, Roback J, Gewirtz AT. Latent cytomegalovirus infection exacerbates experimental colitis. *Am J Pathol* 2009; 175: 2034-42.
26. Matsumura K, Nakase H, Kosugi I, et al. Establishment of a novel mouse model of ulcerative colitis with concomitant cytomegalovirus infection: in vivo identification of cytomegalovirus persistent infected cells. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 1951-63.
27. Brunson JL, Becker F, Stokes KY. The impact of primary and persistent cytomegalovirus infection on the progression of acute colitis in a murine model. *Pathophysiol* 2015; 22: 31-7.

II. Appel d'offre à projet de recherche local : Place du test QuantiFERON-CMV dans la prédiction d'une réactivation colique à cytomégalo virus au cours de la rectocolite hémorragique

Place du test QuantiFERON-CMV dans la prédiction d'une réactivation colique à cytomégalo virus au cours de la rectocolite hémorragique
Etude prospective monocentrique

Version du 18/01/18

Investigateur-Coordonnateur :

Pr. Xavier Roblin
Service de Gastro-Entérologie
CHU de Saint-Etienne Hôpital Nord
42055 Saint-Etienne cedex 2
Tel : 04 77 82 81 19
Tel : 04 77 82 84 34

Co-investigateurs :

Alexandre Jentzer
Interne en biologie médicale
CHU de Saint-Etienne Hôpital Nord
42055 Saint-Etienne cedex 2

Dr Sylvie Pillet
Service des Agents infectieux et
d'Hygiène CHU de Saint-Etienne
Hôpital Nord
42055 Saint-Etienne cedex 2
Tel : 04 77 82 81 22

Dr Pauline Veyrard
Service de Gastro-Entérologie
CHU de Saint-Etienne Hôpital Nord
42055 Saint-Etienne cedex 2

Dr Emilie Del Tedesco
Service de Gastro-Entérologie

CHU de Saint-Etienne Hôpital Nord
42055 Saint-Etienne cedex 2

Pr. Stéphane Paul
Service
d'Immunologie
CHU de Saint-
Etienne Hôpital Nord
42055 Saint-Etienne
cedex 2

Pr. Bruno Pozzetto
Service des Agents infectieux et
d'Hygiène CHU de Saint-Etienne
Hôpital Nord
42055 Saint-Etienne cedex 2

Dr François Casteillo
Service d'Anatomie et de Cytologie
pathologiques CHU de Saint-Etienne
Hôpital Nord
42055 Saint-Etienne cedex 2

Dr Cyril Habougit
Service d'Anatomie et de Cytologie
pathologiques CHU de Saint-Etienne
Hôpital Nord
42055 Saint-Etienne cedex 2

Chef de projet URCIP :

M. Arnauld Garcin
Bâtiment Recherche – Hôpital
Nord 42055 Saint-Etienne cedex 2
Tel : 04 77 12 08 26 (secrétariat)

Promoteur :

CHU de Saint-Étienne
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2.

Représentant du promoteur :

M. Jocelyn Dutil
Direction des Affaires Médicales et de la
Recherche Pavillon 31 – Hôpital de Bellevue
1.1.1.1.1 CHU de Saint-Étienne
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2

CPP « nom du CPP »

Adresse du CPP

PAGE DE SIGNATURE DU PROTOCOLE

Titre de l'étude : Place du test QuantiFERON-CMV dans la prédiction d'une réactivation colique à cytomégalo virus au cours de la rectocolite hémorragique

Version du protocole et date : 18/01/18

N° interne :

Ce protocole a été lu et approuvé à la date notée ci-dessous
Les deux parties s'engagent à mener la recherche conformément au protocole et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

Représentant du promoteur :

M. Jocelyn DUTIL

Direction des Affaires Médicales et de la
Recherche

Bât 31 - Hôpital Bellevue

CHU de Saint-Étienne

42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2

Date :/...../201...

Signature

P/ Le Directeur Général et par délégation,
Le Directeur Adjoint des Affaires Médicales
Et de la Recherche,

Investigateur principal/coordonnateur

Pr. Xavier ROBLIN

Service de Gastro-Entérologie

CHU de Saint-Etienne

Hôpital Nord

42055 Saint-Etienne cedex 2

Date :/...../201...

Signature

Résumé de l'étude (à envoyer séparément à l'ANSM)

Titre de l'étude	Place du test QuantiFERON-CMV dans la prédiction d'une réactivation colique à cytomégalovirus au cours de la rectocolite hémorragique
Acronyme	ReCoH-Feron
N° version et date du protocole	18/01/18
n° EudraCT/IDRCB	
Référence promoteur	
Promoteur	CHU de Saint Etienne
Investigateur principal/coordonnateur	Pr. Xavier Roblin
Centres participants	CHU de Saint Etienne : étude monocentrique
Justification scientifique de l'étude	<p>La rectocolite hémorragique (RCH) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) qui se caractérise par une inflammation du tube digestif et se présente sous forme de poussées aiguës inflammatoires entrecoupées de phase de rémission de la maladie. La primo-infection par le cytomégalovirus (CMV), virus de la famille des <i>Herpesviridae</i>, est en général asymptomatique chez le sujet immunocompétent. Cependant chez le patient immunodéprimé, l'infection à CMV constitue un facteur de morbidité et de mortalité. Ainsi la réactivation de CMV a un rôle péjoratif dans les poussées de RCH (sévérité et résistance aux différentes lignes thérapeutiques). Actuellement, la réactivation de CMV au niveau colique est diagnostiquée par mesure de la charge virale (qPCR) CMV dans les biopsies de tissu inflammatoire, examen invasif et coûteux pour le système de santé. Notre étude envisage d'évaluer les performances d'un test biologique sanguin (le QuantiFERON-CMV, QF-CMV) qui permet de mesurer la réponse immunitaire cellulaire spécifique anti-CMV afin de prédire le risque de réactivation colique de CMV chez les patients atteints de RCH. Un nouvel algorithme de prise en charge, utilisable dans n'importe quel centre ou consultation, pourrait ainsi être proposé : si le test QF-CMV est positif, on peut estimer que la réponse immune du patient le protège d'une réactivation de CMV et la poussée doit être traitée par intensification des immunosuppresseurs (anti-TNF de façon préférentielle); un test QF-CMV négatif incitera à biopsier pour rechercher la réactivation virale au niveau colique et, si elle est confirmée, traiter le patient par ganciclovir. Cet algorithme permettrait d'éviter des biopsies invasives inutiles en cas d'absence de réactivation de CMV.</p>
Nom des techniques étudiées et de leur comparateur	<p>Test biologique : QuantiFERON-CMV (QF-CMV) Charge virale colique CMV : qPCR (comparateur « gold standard ») Marqueurs CMV par Immuno-histochimie (IHC)</p>

Objectifs	<p><u>Principal :</u> L'objectif principal est de déterminer le seuil de performance du test QF-CMV pour prédire la réactivation colique de CMV diagnostiquée par analyse en qPCR de biopsies inflammatoires coliques (« gold standard ») chez les patients présentant une poussée de RCH.</p> <p><u>Secondaires :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Déterminer la performance du test QF-CMV pour prédire la réactivation de CMV diagnostiquée par IHC chez les patients présentant une poussée de RCH. • Evaluer la concordance des résultats obtenus entre la technique « gold standard » d'analyse des biopsies coliques en qPCR et la détection des cellules infectées par IHC afin de diagnostiquer la réactivation colique de CMV chez les patients présentant une poussée de RCH. • Mesurer l'évolution de l'état immunitaire anti-CMV par test de QF-CMV 14 semaines après la survenue de la poussée inflammatoire (avec ou sans réactivation de CMV).
Critères d'évaluations ou variables étudiées	<p><u>Principal :</u> Les performances du test QF-CMV pour prédire la réactivation de CMV diagnostiquée par qPCR seront analysées par une courbe ROC. Le seuil du test QF-CMV donnant une spécificité de 80% sera sélectionné et, à ce seuil, seront estimées sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative. L'intervalle de confiance à 95% de chacun de ces indices sera également calculé. Les rapports de vraisemblance positive et négative seront également évalués.</p> <p><u>Secondaires :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Performance du test QF-CMV pour prédire la colite à CMV diagnostiquée par IHC avec détermination du seuil de positivité du test sanguin ; elle sera analysée avec les mêmes méthodes que celles utilisées pour le critère principal. • Concordance de l'IHC par rapport à la charge virale CMV par qPCR : un diagramme de Bland-Altman permettra de comparer les moyennes des mesures évaluées par les deux techniques représentées en abscisses, à leurs différences représentées en ordonnées. • Comparaison des valeurs du test QF-CMV au moment de la poussée et à 14 semaines par un test de Student pour données appariées après vérification de la distribution normale par un test de Shapiro-Wilk. Dans le cas où la normalité ne serait pas vérifiée, des tests de rangs pour données appariées seront préférés.

Méthodologie	Il s'agit d'une étude prospective monocentrique incluant 196 patients séropositifs pour CMV (IgG+) souffrant de poussées modérées à sévères (score Mayo > 5 avec un sous-score endoscopique ≥ 2) consécutives de RCH sur 2 ans et visant à évaluer l'intérêt d'un test sanguin, le test QF-CMV, qui évalue la réponse immunitaire cellulaire du patient contre CMV, dans l'appréciation du risque de réactivation colique du virus. Celle-ci sera évaluée par mesure de la charge virale CMV par qPCR dans 2 biopsies de tissu inflammatoire ; cette technique est maîtrisée et utilisée en routine pour la prise en charge des patients au CHU de Saint-Etienne. Cependant, d'autres équipes utilisent la technique d'IHC (les 2 étant validées par les recommandations internationales). On profitera donc de cette étude pour comparer notre technique de qPCR à l'IHC.
Nombre de patients et méthode d'analyse statistiques	<u>Nombre de patients : 196</u> <u>Méthode d'analyse statistiques:</u> Variables quantitatives : nombre de données disponibles, moyenne, écart-type, médiane, 1er et 3ème quartiles, minimum et maximum ; Variables qualitatives : fréquences absolues et relatives (exprimées en %).
Critères d'inclusion et de non-inclusion	<u>Critères d'inclusion :</u> Patient séropositif pour CMV (IgG+), Patient majeur nécessitant une hospitalisation pour une poussée de RCH avec score de Mayo > 5 et sous-score endoscopique ≥ 2, Patient affilié ou ayant droit à un régime de sécurité sociale, Patient ayant reçu une information éclairée sur l'étude et ayant co-signé, avec l'investigateur, un consentement de participation à l'étude. <u>Critères de non-inclusion :</u> Patient sous tutelle ou curatelle Patient incapable de comprendre ou de signer le protocole. Patient déjà inclus dans l'étude. Patient sous anticoagulants. Patient colectomisé (colectomie totale ou partielle).
Déroulement de l'étude	Le protocole sera proposé à l'ensemble des patients consultant dans le service de Gastro-Entérologie du CHU de Saint-Etienne pour poussée modérée à sévère de RCH nécessitant une rectosigmoïdoscopie et répondant aux critères d'inclusion. Cette étude ne comporte aucune intervention supplémentaire en dehors du prélèvement des fragments biopsiques surnuméraires en zone inflammatoire ainsi qu'une prise de sang. Le protocole sera présenté au patient éligible (explication orale du protocole et remise de la note d'information). Un délai de réflexion de 2 heures lui accordé avant recueil de son consentement éclairé et signé. Dans les 24h suivant l'inclusion, la rectosigmoïdoscopie sera réalisée par l'un des investigateurs du service de Gastro-Entérologie et les fragments biopsiques seront prélevés pour mesure de la charge virale par qPCR. Dans la pratique habituelle, 2 morceaux sont prélevés dans la zone

	<p>inflammatoire. Dans le cadre de l'étude, il sera proposé au patient de prélever en plus deux biopsies en zone inflammatoire pour l'analyse en IHC ainsi que 3 tubes de sang périphérique (total de 3 mL) pour le test QF-CMV.</p> <p>La durée de participation de l'étude pour un patient sera de 14 semaines à partir de l'inclusion. Ce délai a été choisi pour permettre d'évaluer l'efficacité des traitements immunosuppresseurs chez les patients par le calcul du score clinique de Mayo. Un second test QF-CMV (soit un nouveau prélèvement de 3 tubes de sang périphérique, soit un total de 3 mL) sera proposé au patient à 14 semaines.</p>
Bénéfices / Risques : Contraintes	<p>La prise en charge des patients ne sera pas modifiée par l'étude et se fera selon les pratiques des recommandations françaises et européennes. Le traitement par antiviral sera proposé en cas de charge virale CMV élevée mesurée par qPCR comme habituellement pratiqué au CHU de Saint-Etienne. Les résultats seront analysés à la fin de l'étude. Si le QF-CMV permet de prédire la réactivation de CMV avec de bonnes performances, il pourrait être utilisé dans l'algorithme de prise en charge des poussées de RCH.</p>
Enregistrement et notification des EIG	<p><u>EIG attendus et inattendus : aucun</u></p> <p><u>Délais et modalités de déclaration des EIG : non applicable</u></p> <p><u>Comité de surveillance indépendant</u> : <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non</p> <p>Si non, justifier : non applicable</p>
Calendrier	<p><u>Début prévisible du début des inclusions</u> : 3ème trimestre 2018</p> <p><u>Date de fin des inclusions</u> : 4ème trimestre 2020</p> <p><u>Date de fin du suivi</u> : 14 semaines pour chaque patient</p>

TABLE DES MATIERES

1	JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE DE LA RECHERCHE
1.1	Rôle du cytomégalo virus dans les poussées de la rectocolite hémorragique
1.2	Données de la littérature concernant le QuantiFERON®-CMV (QF-CMV)
1.2.1	Mesure de la réponse immune cellulaire anti-CMV
1.2.2	Argumentaire pour le choix du test QF-CMV
1.2.3	Données sur l'utilisation du test QF-CMV pour la prise en charge clinique des patients à risque d'infection grave à CMV
1.3	Objectifs du projet proposé
2	OBJECTIFS
2.1	Objectif principal.
2.2	Objectif(s) secondaire(s)
3	CONCEPTION DE LA RECHERCHE
3.1	Critères d'évaluation
3.2	Méthodologie de la recherche
3.3	Mesures prises pour réduire et éviter les biais
3.4	Déroulement
3.5	Description des règles d'arrêt définitif ou temporaire
3.6	Description des règles d'arrêt ou « critère d'abandon » pour le sujet, pour une partie de l'essai, pour l'essai en entier »
3.7	Maintien de l'insu et Procédures de levée de l'insu
4	SELECTION ET EXCLUSION DES PERSONNES DE LA RECHERCHE
4.1	Critères d'inclusion
4.2	Critères de non-inclusion
4.3	Justification de la participation de personne incapable de donner leur consentement éclairé ou d'autres populations spéciales et la description
4.4	Détailler les critères de sortie d'essai (arrêt de l'essai) et les procédures spécifiques
5	PRODUIT ADMINISTRE/TECHNIQUE ETUDIEE DANS LE CADRE DE LA RECHERCHE
6	EVALUATION de l'EFFICACITE
7	EVALUATION DE LA SECURITE
7.1	Description des paramètres d'évaluation de la sécurité
7.2	Méthodes et calendrier prévus pour mesurer, recueillir et analyser les paramètres d'évaluation de sécurité
7.3	Procédures mises en place en vue de l'enregistrement et de la notification des événements indésirables
7.3.1	Définition des événements/effets indésirables (EI)
7.3.2	Définition des événements indésirables graves (EIG)
7.3.3	Caractère attendu/inattendu d'un événement indésirable grave.
7.3.4	Durée de la période de déclaration des EIG au promoteur
7.3.5	Déclaration de l'investigateur au promoteur
7.3.6	Déclaration du promoteur au CPP et aux autorités de santé
7.4	Modalités et durée du suivi des personnes suite à la survenue d'événements indésirables
8	ANALYSE STATISTIQUE
8.1	Nombre de sujets nécessaire
8.2	Description des méthodes statistiques
8.3	Degré de signification statistique
8.4	Méthodes de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non valides
8.5	Gestion des modifications apportées au plan d'analyse de la stratégie initiale
8.6	Choix des personnes à inclure dans les analyses
9	DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCES
9.1	Droit d'accès aux données
9.2	Description des variables recueillies
9.3	Identification des données sources
10	CONTRÔLE ET ASSURANCE QUALITE
11	FAISABILITE ET CALENDRIER DE L'ETUDE
12	ORGANISATION DE L'ETUDE
13	CONSIDERATIONS ETHIQUES
13.1	Déclaration indiquant que la recherche sera conduite conformément au protocole, aux bonnes pratiques et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur
13.2	Protection des personnes
13.3	Assurance
13.4	Rapport Bénéfice/Risque

14 TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE

14.1. Circuit des données

14.2. Modalités de traitement, vérification et validation des données (data management)

14.3. Archivage des documents de l'essai

15 PROPRIETES DES DONNEES – REGLES DE PUBLICATION

16 Références bibliographiques

Annexe 1 : Présentation des scores cliniques et endoscopiques utilisés pour apprécier l'activité inflammatoire de la RCH

Annexe 2 : Expression des antigènes viraux au cours du cycle répliatif

Annexe 3 : Présentation des tests utilisés pour mesurer la réponse immunitaire cellulaire anti-CMV.

Annexe 4 : Schéma de l'étude.

Annexe 5 : Notice d'information et consentement du patient

Annexe 6 : Finances (dans un document joint pour l'ANSM)

1. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET DESCRIPTION GENERALE DE LA RECHERCHE

1.1. Rôle du cytomegalovirus dans les poussées de la rectocolite hémorragique

La rectocolite hémorragique (RCH) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) qui se caractérise par une inflammation du tube digestif et se présente sous forme de poussées aiguës inflammatoires entrecoupées de phase de rémission de la maladie. L'administration de médicaments anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs permet le plus souvent de juguler la phase aiguë et d'allonger les périodes de rémission¹. L'inflammation aiguë peut cependant se compliquer, et ce malgré les différentes thérapeutiques, par la nécrose tissulaire nécessitant la résection partielle ou totale du colon et impacte directement la qualité de vie des patients, le plus souvent jeunes et actifs. La sévérité des poussées de RCH est évaluée par le score Mayo qui regroupe des critères cliniques et endoscopiques (Annexe 1)².

La primo-infection par le cytomegalovirus (CMV), virus de la famille des *Herpesviridae*, est en général asymptomatique chez le sujet immunocompétent. Environ 40% de la population française est séropositive³. Chez le patient immunodéprimé, l'infection à CMV constitue un facteur de morbidité et de mortalité⁴.

Après la phase de primo-infection, le CMV persiste à vie sous forme latente (sans production de particules virales) dans différents tissus, dont le colon. Sous l'action de facteurs dont l'inflammation tissulaire et l'immunosuppression, le virus latent peut se réactiver avec production de nouvelles particules virales⁵.

Les travaux de notre équipe ont contribué à montrer le rôle péjoratif de CMV dans les poussées de RCH :

- la réactivation de CMV est plus fréquente dans la RCH que dans la maladie de Crohn^{6,7} ;
- CMV doit être recherché dans le tissu colique inflammatoire⁶ ;
- la charge virale CMV mesurée par PCR quantitative (qPCR) dans le tissu inflammatoire permet de prédire la résistance de la poussée aux corticoïdes et autres lignes d'immunosuppresseurs⁶ ; des seuils de charge virale associés à la corticorésistance et la résistance à plusieurs lignes thérapeutiques ont été établis^{6,8};
- le traitement par ganciclovir, antiviral anti-CMV, permet de réduire la charge virale tissulaire et de restaurer la sensibilité aux immunosuppresseurs^{6,9} ;
- l'administration d'anticorps monoclonaux anti-TNF- α ne majorant pas le risque de réactivation ni la charge virale CMV tissulaire¹⁰, ces médicaments, associés ou non au ganciclovir, sont à privilégier dans le traitement de la poussée de RCH CMV positive⁹.

Tous ces résultats sont en faveur du rôle actif de CMV dans les poussées de RCH. La réactivation colique de CMV est objectivée par la détection du génome viral par qPCR^{4,6,8}, technique reconnue à l'échelle internationale^{5,9,11-16}. L'analyse en immuno-histochimie (IHC) repose sur la détection de protéines virales dans les cellules infectées au sein du tissu, avec possibilité de quantification du nombre de cellules infectées par mm². La technique de qPCR est cependant plus sensible^{12,13,17,18} et permet de détecter la réactivation virale plus précocement. Les sociétés savantes n'ont pas tranché entre les 2 techniques pour diagnostiquer la réactivation colique de CMV en cas de poussées de RCH¹⁹.

Les biopsies sont prélevées lors d'une recto-sigmoïdoscopie. Cet acte est invasif pour le patient et coûteux pour le système de santé. De plus, seules 30% des poussées de RCH ne répondant pas à la corticothérapie (cortico-réfractaires) se compliquent d'une réactivation de CMV^{6,8} ; de nombreuses biopsies sont donc analysées en excès. Quelques équipes ont identifié des facteurs prédictifs d'une réactivation virale chez ces patients²⁰⁻²² mais certains ne sont évaluables qu'au moment du geste chirurgical et aucun n'a été validé sur des cohortes prospectives. Nous envisageons d'utiliser un test sanguin mesurant la réponse immunitaire anti-CMV qui permettrait d'apprécier le risque de réactivation virale.

1.2. Données de la littérature concernant le QuantiFERON®-CMV (QF-CMV)

1.2.1. Mesure de la réponse immune cellulaire anti-CMV

L'essentiel de la protection de l'hôte contre les réactivations de CMV est assuré par les lymphocytes T et les cellules NK qui vont lyser les cellules infectées^{23,24}. Plusieurs antigènes viraux sont la cible de la

réponse cellulaire ; ils sont soit d'expression précoce ou très précoce, soit d'expression tardive au cours du cycle répliatif du virus (Annexe 2). Les techniques disponibles pour mesurer la réponse cellulaire anti-CMV ainsi que leurs avantages et inconvénients respectifs sont brièvement présentés en Annexe 3. Elles restent peu utilisées en routine et leur intérêt pour la prise en charge des patients à risque de réactivation de CMV reste à démontrer.

1.2.2. Argumentaire pour le choix du test QF-CMV

Il existe deux techniques basées l'une et l'autre sur la mesure d'IFN- γ en réponse à la stimulation *ex vivo* par CMV des cellules immunitaires du patient (Annexe 3) : l'ELISPOT et le test QuantiFERON- CMV (QF-CMV) ; elles présentent des résultats équivalents^{25,26}. Le test QF-CMV, commercialisé par QIAGEN, est facile à mettre en place : les prélèvements peuvent être acheminés et pris en charge 24h sur 24 et 7 jours sur 7, et le dosage d'IFN- γ peut être différé. Contrairement à la technique d'ELISPOT, le test QF-CMV a un délai de réalisation plus court, et ne demande pas de mise au point technique particulière. Un test biologique similaire (QF-TB) est utilisé en routine pour évaluer le risque de réactivation tuberculeuse (TB). De plus, le test QF-CMV mesure la réponse immune contre une plus grande variété d'antigènes viraux et renseigne sur l'état global de la réponse immune du patient²⁷ (Annexe 3). Les principales limites du test QF-CMV sont : i) la sélection des peptides viraux dont la présentation est dépendante des récepteurs du CMH de classe I reconnus par les lymphocytes T CD8, même s'ils ont été choisis pour représenter ceux de plus de 98% de la population humaine, et ii) l'absence d'exploration de l'immunité cellulaire T CD4, qui reste néanmoins négligeable devant l'importance de la réponse immunitaire T CD8 anti-CMV.

1.2.3. Données sur l'utilisation du test QF-CMV pour la prise en charge clinique des patients à risque d'infection grave à CMV

Plusieurs études menées chez les patients transplantés (greffes d'organe^{28,29} ou de cellules souches hématopoïétiques³⁰) et les patients en unité de soins intensifs³¹ montrent qu'un test QF-CMV positif rendrait compte d'une bonne immunité cellulaire spécifique anti-CMV par rapport à un test QF-CMV négatif, permettant de définir des populations à fort ou à faible risque de réactivation virale et d'adapter la prophylaxie anti-CMV les patients greffés^{32,33}.

Il n'existe aucune publication dans laquelle le test QF-CMV a été utilisé au cours de MICI. Les patients atteints de RCH sont considérés comme immunodéprimés en raison de leur pathologie et des traitements immunosuppresseurs qu'ils reçoivent. Le risque de réactivation de CMV est ainsi majoré. Notre hypothèse est que les patients atteints de RCH, séropositifs pour CMV et présentant une réponse immune cellulaire anti-CMV inefficace ou insuffisante, sont à risque de réactiver le virus CMV, hébergé de façon latente au niveau du colon, au moment de la poussée inflammatoire de leur maladie. Le test QF-CMV permettrait de mesurer la réponse immune du patient avec un risque de réactivation de CMV en cas de protection immunitaire insuffisante ; en corolaire, il permettrait d'éviter des biopsies coliques pour l'analyse des marqueurs viraux, acte invalidant et coûteux, chez les patients présentant une réponse cellulaire anti-CMV efficace.

Dans toutes les études menées dans les populations d'immunodéprimés, le seuil de positivité du test QF-CMV était de 0,2 unités internationales (UI)/mL. Cette valeur a été déterminée par le fabricant par une étude interne sur une population saine et immunocompétente : le test QF-CMV était positif chez 90 % des 161 individus séropositifs pour CMV (IgG+), aucun des 149 donneurs séronégatifs n'affichant la moindre réactivité avec le test QF-CMV. Une étude publiée a validé ce seuil de positivité chez des personnes saines³⁴. Cependant, ce seuil souffre d'un manque de discussion. La mise en place d'une étude nous semble indispensable pour déterminer le seuil le plus performant chez les immunodéprimés, et particulièrement dans notre population d'intérêt, les patients atteints de poussées de RCH ne recevant pas les mêmes traitements immunosuppresseurs que les greffés.

1.3. Objectifs du projet proposé

Nous proposons d'étudier la pertinence d'un test sanguin, le test QF-CMV, pour apprécier le risque de réactivation de CMV en cas de poussée inflammatoire chez des patients atteints de RCH et séropositifs pour CMV. Le diagnostic de réactivation colique de CMV sera effectué sur des biopsies de tissu inflammatoire prélevées lors d'une recto-sigmoïdoscopie par qPCR, technique qui a montré son intérêt dans la prise en charge des patients atteints de poussées de RCH. Elle constituera le « gold standard ».

Nous envisageons d'inclure un total de 196 patients. S'agissant d'une étude exploratoire, il n'y aura aucune modification de la prise en charge ni du traitement du patient du fait de sa participation à cette étude. Les patients seront suivis au CHU de Saint-Etienne et pris en charge selon les recommandations françaises¹ et européennes³⁵ et en fonction de la valeur la plus élevée de charge virale CMV déterminée par qPCR sur 2 biopsies de tissu inflammatoire⁸. Cette technique effectuée en routine au CHU de Saint Etienne avait donné localement de meilleurs résultats que l'IHC⁶. Afin d'améliorer le test d'IHC, nous utiliserons un mélange d'anticorps dirigés contre 2 antigènes d'expression précoce (clones CCH2 + DDG9, Dako) et validé dans la littérature¹³ associé à une technique automatisée de préparation des tissus et une appréciation du nombre de cellules positives par mm².

Les résultats des tests d'IHC et de QF-CMV ne seront analysés qu'en fin d'étude (Annexe 4). Puisque le seuil de positivité du test utilisé dans la littérature n'a pas été validé dans notre population, nous envisageons de déterminer le seuil du test QF-CMV associé à une réactivation de CMV objectivée par une charge virale (qPCR) positive chez le patient en poussée de RCH. Le test sanguin devra présenter une spécificité d'au moins 80%. Nous comparerons également les performances des 2 techniques (IHC et qPCR) pour définir la réactivation colique de CMV. Lors du suivi habituel du patient, un second test QF-CMV sera proposé 14 semaines après la poussée afin d'évaluer l'évolution de la réponse immune à distance de la poussée.

Cette étude pourra nous permettre d'utiliser un test biologique simple ne nécessitant qu'une prise de sang afin d'évaluer la réponse anti-CMV des patients au moment de la poussée. Un nouvel algorithme de prise en charge, utilisable dans n'importe quel centre ou consultation, pourrait être proposé : si le test QF-CMV est positif, on peut estimer que la réponse immune du patient le protège d'une réactivation de CMV et la poussée doit être traitée par intensification des immunosuppresseurs (anti-TNF de façon préférentielle) ; un test QF-CMV négatif incitera à biopsier pour rechercher la réactivation virale au niveau colique et, si elle est confirmée, traiter le patient par ganciclovir. Cet algorithme permettrait d'éviter des biopsies invasives inutiles en cas d'absence de réactivation de CMV. Le test QF-CMV rendrait compte de l'état immunitaire cellulaire anti-CMV, avec une classification des patients à fort risque ou à faible risque de réactivation virale. Ainsi, une surveillance personnalisée des patients et une prophylaxie anti-CMV pourraient être mises en place.

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif principal

L'objectif principal est de déterminer le seuil de performance du test QF-CMV pour prédire la réactivation colique de CMV diagnostiquée par analyse en qPCR de biopsies inflammatoires coliques (« gold standard ») chez les patients présentant une poussée de RCH.

2.2. Objectif(s) secondaire(s)

Les objectifs secondaires sont :

- de déterminer la performance du test QF-CMV pour prédire la réactivation de CMV diagnostiquée par IHC chez les patients présentant une poussée de RCH,
- d'évaluer la concordance des résultats obtenus entre la technique « gold standard » d'analyse des biopsies coliques en qPCR et la détection des cellules infectées par IHC afin de

- diagnostiquer la réactivation colique de CMV chez les patients présentant une poussée de RCH, de mesurer l'évolution de l'état immunitaire anti-CMV par test de QF-CMV 14 semaines après la survenue de la poussée inflammatoire (avec ou sans réactivation de CMV).

3. CONCEPTION DE LA RECHERCHE

3.1. Critères d'évaluation

Critère d'évaluation principal

Les performances du test QF-CMV pour prédire la réactivation de CMV diagnostiquée par qPCR seront analysées par une courbe ROC. Le seuil du test QF-CMV donnant une spécificité de 80% sera sélectionné et, à ce seuil, seront estimées sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative. L'intervalle de confiance à 95% de chacun de ces indices sera également calculé. Les rapports de vraisemblance positif et négatif seront également évalués.

Critère d'évaluation secondaire

- Performance du test QF-CMV pour prédire la colite à CMV diagnostiquée par IHC avec détermination du seuil de positivité du test sanguin ; elle sera analysée avec les mêmes méthodes que celles utilisées pour le critère principal.
- Concordance de l'IHC par rapport à la charge virale CMV par qPCR : un diagramme de Bland-Altman permettra de comparer les moyennes des mesures évaluées par les deux techniques représentées en abscisses, à leurs différences représentées en ordonnées.
- Comparaison des valeurs du test QF-CMV au moment de la poussée et à 14 semaines par un test de Student pour données appariées après vérification de la distribution normale par un test de Shapiro-Wilk. Dans le cas où la normalité ne serait pas vérifiée, des tests de rangs pour données appariées seront préférés.

3.2. Méthodologie de la recherche

Un schéma de l'étude est présenté en Annexe 4. Il s'agit d'une étude prospective monocentrique incluant 196 patients séropositifs pour CMV (IgG+) souffrant de poussées modérées à sévères (score Mayo > 5 avec un sous-score endoscopique ≥ 2) consécutives de RCH sur 2 ans et visant à évaluer l'intérêt d'un test sanguin, le test QF-CMV, qui évalue la réponse immunitaire cellulaire du patient contre CMV, dans l'appréciation du risque de réactivation colique du virus. Celle-ci sera évaluée par mesure de la charge virale CMV par qPCR dans 2 biopsies de tissu inflammatoire ; cette technique est maîtrisée et utilisée en routine pour la prise en charge des patients au CHU de Saint-Etienne. Cependant, d'autres équipes utilisent la technique d'IHC (les 2 étant validées par les recommandations internationales). On profitera donc de cette étude pour comparer notre technique de qPCR à l'IHC.

Les 2 biopsies de tissu inflammatoire seront acheminées rapidement dans le service des Agents infectieux et d'Hygiène et congelées à -80°C . La charge virale CMV ainsi que le nombre de cellules seront quantifiés par technique de qPCR en séries bihebdomadaires. Les charges virales seront exprimées en unités internationales pour 100 000 cellules pour CMV après mesure du nombre de cellules. La valeur la plus élevée de la charge virale tissulaire entre les 2 biopsies prélevées dans la même zone sera prise en considération.

Deux biopsies supplémentaires seront prélevées et envoyées au service d'Anatomie et Cytologie pathologiques après fixation immédiate dans le formol tamponné à 4%. L'inclusion sera réalisée en paraffine. Une étude histopathologique (coloration hématoxyline-éosine-safran, HES) sera réalisée afin de déterminer l'aspect inflammatoire du tissu et l'éventuelle présence de stigmates de réactivation virale (corps d'inclusion, cellules en œil de hibou). L'IHC sera effectuée sur coupes en paraffine de $4\ \mu\text{m}$ d'épaisseur (Automate OMNIS Dako-Agilent, révélation EnVision FLEX) à l'aide de l'anticorps anti-CMV (référence Dako-Agilent M085401-2 : mélange de clones d'anticorps de souris dirigés contre 2

antigènes d'expression précoce : Clones CCH2 + DDG9). L'évaluation sera réalisée par deux pathologistes en double aveugle. Elle consistera en une évaluation quantitative de cellules marquées par mm² et qualitative (type cellulaire marquées et localisation du marquage : nucléaire et /oucytoplasmique). Les 3 tubes de sang périphérique pour le test QF-CMV seront prélevés après l'endoscopie. Ils seront acheminés rapidement au laboratoire, incubés à 37°C pendant 16 à 24 heures dans le service d'Immunologie ; le plasma sera alors décanté après centrifugation et conservé à 4°C jusqu'au dosage d'INF γ par *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Des trousseaux de prélèvements regroupant l'ensemble des tubes nécessaires et un bon de demande spécifique pour le protocole seront disponibles dans le service de Gastro-Entérologie du CHU de Saint-Etienne.

Le traitement et la prise en charge des patients au CHU de Saint-Etienne ne seront pas modifiés par leur inclusion dans l'étude. Les patients recevront un traitement immunosuppresseur (éventuellement associé au ganciclovir en cas de charge virale CMV colique élevée) selon les recommandations françaises et européennes. Les modalités de prise en charge des patients seront celles de la pratique habituelle. Lors de chaque visite prévue dans le suivi, le score Mayo clinique sera rapporté. A 14 semaines, un second dosage de QF-CMV sera proposé au patient.

3.3. Mesures prises pour réduire et éviter les biais

L'étude sera proposée à tous les patients qui répondent aux critères d'inclusion, et ce de manière consécutive. La mesure de la charge virale sera effectuée par une méthode utilisée en routine dans le service des Agents infectieux et d'Hygiène. L'IHC des biopsies sera pratiquée au service d'Anatomie et de Cytologie pathologiques avec un anticorps validé dans la littérature et un système automatisé de préparation des tissus ; la lecture sera effectuée par 2 anatomopathologistes de façon indépendante et en aveugle des résultats de la qPCR. Le test QF-CMV sera mis en place dans le service d'Immunologie ayant l'expérience du dosage d'interféron- γ pour un test semblable : le test QF-TB ; les résultats seront lus en aveugle des résultats de la qPCR.

3.4. Déroulement

3.4.1. Déroulement pour un patient :

Sélection :

Le protocole sera proposé à l'ensemble des patients consultant dans le service de Gastro-Entérologie du CHU de Saint-Etienne pour poussée modérée à sévère de RCH nécessitant une rectosigmoïdoscopie et répondant aux critères d'inclusion, et séropositifs pour CMV. Un patient sera éligible en cas de score Mayo > 5 avec un sous score endoscopique \geq 2.

Inclusion :

- Les critères d'inclusion et de non inclusion seront vérifiés par l'un des investigateurs du service de Gastro-Entérologie. Cette étude ne comporte aucune intervention supplémentaire en dehors du prélèvement des fragments biopsiques surnuméraires en zone inflammatoire ainsi qu'une prise de sang.
- Le protocole sera présenté au patient éligible (explication orale du protocole et remise de la note d'information). Un délai de réflexion de 2 heures lui accordé avant recueil de son consentement éclairé et signé.
- Dans les 24h suivant l'inclusion, la rectosigmoïdoscopie sera réalisée par l'un des investigateurs du service de Gastro-Entérologie et les fragments biopsiques seront prélevés. Dans la pratique habituelle, 2 morceaux sont prélevés dans la zone inflammatoire. Dans le cadre de l'étude, il sera proposé au patient de prélever en plus deux biopsies en zone inflammatoire pour l'analyse en IHC

ainsi que 3 tubes de sang périphérique (total de 3 mL) pour le test QF-CMV.

- Aucun geste endoscopique supplémentaire, consultation ou examen complémentaire en plus de ceux décrits ci-dessus ne sera pratiqué.
- Les calculs des scores cliniques d'activité seront pratiqués tous les jours lors de chaque consultation classique dans le suivi thérapeutique prévu selon les bonnes pratiques.
- Seront enregistrées les caractéristiques du patient : âge, sexe, tabagisme ainsi que celles de la maladie : ancienneté, classification de Montréal, traitement associé, évolution clinique en fonction des différents traitements préalables

Suivi :

- La durée de participation de l'étude pour un patient sera de 14 semaines à partir de l'inclusion. Ce délai a été choisi pour permettre d'évaluer l'efficacité des traitements immunosuppresseurs chez les patients par le calcul du score clinique de Mayo. Une nouvelle rectosigmoïdoscopie ne sera pratiquée qu'en cas d'aggravation clinique selon la pratique habituelle. Un second test QF-CMV (soit un nouveau prélèvement de 3 tubes de sang périphérique, soit un total de 3 mL) sera proposé au patient à 14 semaines.

Fin d'étude :

La fin de l'étude correspond à la visite à 14 semaines.

Durée de participation à l'étude pour un patient : 14 semaines

Participation à une autre étude simultanément ou à la fin de celle-ci : le patient pourra participer simultanément à l'essai d'une nouvelle molécule thérapeutique durant l'étude.

3.5. Description des règles d'arrêt définitif ou temporaire

Si les inclusions n'ont pas commencé dans l'année qui suit l'obtention de l'autorisation du CPP et de l'ANSM, l'étude sera arrêtée. Si le taux d'inclusion paraît insuffisant et non justifié, le promoteur pourra décider de l'arrêt de l'étude.

3.6. Description des règles d'arrêt ou « critère d'abandon » pour le sujet, pour une partie de l'essai, pour l'essai en entier »

Non applicable.

3.7. Maintien de l'insu et Procédures de levée de l'insu

Non applicable.

4. SELECTION ET EXCLUSION DES PERSONNES DE LA RECHERCHE

4.1. Critères d'inclusion

Patient séropositif pour CMV (IgG+),

Patient majeur nécessitant une hospitalisation pour une poussée de RCH avec score de Mayo > 5 et sous-score endoscopique ≥ 2 ,

Patient affilié ou ayant droit à un régime de sécurité sociale,

Patient ayant reçu une information éclairée sur l'étude et ayant co-signé, avec l'investigateur, un consentement de participation à l'étude.

4.2. Critères de non-inclusion

Patient sous tutelle ou curatelle
Patient incapable de comprendre ou de signer le protocole.
Patient déjà inclus dans l'étude.
Patient sous anticoagulants.
Patient colectomisé (colectomie totale ou partielle).

4.3. Justification de la participation de personne incapable de donner leur consentement éclairé ou d'autres populations spéciales et la description

Non applicable.

4.4. Détailler les critères de sortie d'essai (arrêt de l'essai) et les procédures spécifiques :

Le patient peut à tout moment décider d'être retiré du protocole sans préjudice pour sa prise en charge. Il n'y a pas d'exclusion prévue en dehors de la volonté du patient.

5. PRODUIT ADMINISTRE/TECHNIQUE ETUDIEE DANS LE CADRE DE LA RECHERCHE

Les choix thérapeutiques seront faits selon les recommandations de bonne pratique des recommandations françaises et européennes^{1,35} pour la prise en charge de la RCH.

6. EVALUATION de l'EFFICACITE

Non applicable.

7. EVALUATION DE LA SECURITE

7.1. Description des paramètres d'évaluation de la sécurité

La recherche de CMV dans le tissu inflammatoire fait partie du bilan systématique devant toute poussée aiguë de RCH. Le prélèvement de biopsies supplémentaires dans la zone inflammatoire n'apporte pas de risque supplémentaire. Le risque hémorragique après biopsie est estimé à moins de 1 pour 10 000 patients ; les critères d'éligibilité, notamment l'exclusion des patients sous anticoagulant, permettent de considérer comme extrêmement faible le risque lié à ces prélèvements. Par ailleurs, l'endoscopie se faisant sous anesthésie générale, il n'y aura aucune douleur liée à ces biopsies.

La recherche de CMV dans les biopsies supplémentaires par IHC et la prise de sang n'ont aucun impact sur la santé du patient. Les différents traitements sont les traitements nécessaires aux patients en poussée selon les recommandations de bonne pratique française et européenne^{1,35}.

Au total, cette étude ne comportant que peu de risque. De ce fait, il n'y a pas de paramètres spécifiques d'évaluation de la sécurité.

7.2. Méthodes et calendrier prévus pour mesurer, recueillir et analyser les paramètres d'évaluation de sécurité

Aucune mesure de paramètre d'évaluation de la sécurité n'est prévue vu le risque extrêmement faible de ce projet.

7.3. Procédures mises en place en vue de l'enregistrement et de la notification des événements indésirables

7.3.1. Définition des événements/effets indésirables (EI)

Un événement indésirable est toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche impliquant la personne humaine que cette manifestation soit liée ou non à la recherche sur laquelle porte la recherche.

Les EI seront notifiés sur une page spécifique du cahier d'observation. Un EI sera considéré comme :
Léger s'il n'interfère pas avec les activités habituelles
Modéré s'il gêne les activités habituelles
Sévère s'il empêche les activités habituelles

Dans cette étude, les EI seront notifiés s'ils apparaissent entre la coloscopie (biopsies) et 24h après ce geste.

Cette étude étant une RIPH 2, Aucun EI ne sera déclaré au promoteur.

7.3.2. Définition des événements indésirables graves (EIG)

Un effet/événement indésirable grave est un effet/événement indésirable qui :

- entraîne la mort,
- met en danger la vie de la personne qui se prête à la recherche,
- nécessite une hospitalisation ou la prolongation de l'hospitalisation,
- provoque une incapacité ou un handicap important ou durable,
- se traduit par une anomalie ou une malformation congénitale.

Seuls les EIG susceptibles d'être en lien avec la procédure utilisée seront à déclarer à la direction de la qualité du CHU de Saint-Etienne via la plateforme NORMEA. Toutes les complications habituelles de ce type de patients, résultats biologiques anormaux en lien avec la pathologie et les traitements du patient ne seront pas déclarés.

7.3.3. Caractère attendu/inattendu d'un événement indésirable grave

Non applicable

7.3.4. Durée de la période de déclaration des EIG au promoteur

L'investigateur devra déclarer tous les EI et EIG survenant à compter de la date de la biopsie et 24h après ce geste.

7.3.5. Déclaration de l'investigateur au promoteur

L'investigateur devra déclarer à la direction de la qualité de son établissement (pour le CHU de Saint-Etienne, via la plateforme NORMEA, tout EIG susceptible d'être en lien avec la procédure utilisée.

7.3.6. Déclaration du promoteur au CPP et aux autorités de santé

Si nécessaire, la Direction concernée se chargera de faire une déclaration à l'ARS.

7.4. Modalités et durée du suivi des personnes suite à la survenue d'événements indésirables

Toute personne présentant un effet/événement indésirable (grave ou non) recevra la prise en charge adaptée à son état et sera suivie jusqu'à la résolution de l'événement ou jusqu'à la fin de la recherche. Si cela s'avère nécessaire, le produit/technique expérimentée/l'étude sera arrêté.

8. ANALYSE STATISTIQUE

8.1. Nombre de sujets nécessaire

Afin de déterminer le seuil de performance du test QF-CMV pour prédire la réactivation de CMV, l'aire sous la courbe ROC (AUC) sera déterminée. Il paraît cliniquement pertinent de détecter une AUC d'au minimum 0,70. Pour cela, et pour un risque alpha de 0,05 et une puissance statistique de 80%, il est nécessaire d'inclure 97 patients. Sachant que la prévalence de colite à CMV a été estimée à 30%^{6,8}, environ 29 cas de colites à CMV devraient être observés.

Cependant, ce nombre de patients ne permet pas de mettre en évidence une spécificité de 80% avec une bonne précision. Pour estimer une spécificité de 80% avec une précision absolue de 10% et une prévalence de colite à CMV de 30%, il est nécessaire d'inclure 186 patients évaluables (risque alpha à 0,05 et puissance à 80%). Ces calculs ont été réalisés sous le logiciel R version 3.4.1.

Pour tenir compte des dossiers incomplets (absence d'un des résultats de qPCR ou de QF-CMV en raison d'un problème technique) que nous estimons à 5%, il est nécessaire d'inclure 10 patients supplémentaires. **Le nombre total de patients inclus sera donc de 196.**

8.2. Description des méthodes statistiques

L'analyse statistique sera réalisée une fois la base de données gelée.

8.2.1. Analyse descriptive

La population incluse sera tout d'abord décrite grâce aux méthodes statistiques suivantes :

- variables quantitatives : nombre de données disponibles, moyenne, écart-type, médiane, 1^{er} et 3^{ème} quartiles, minimum et maximum ;
- variables qualitatives : fréquences absolues et relatives (exprimées en %).

8.2.2. Analyse du critère principal

Afin de déterminer le seuil de performance du test QF-CMV pour prédire la réactivation de CMV (analyse par qPCR), une courbe ROC sera utilisée. Il paraît pertinent de sélectionner le seuil donnant une spécificité de 80%. A ce seuil, pourront être estimés les indices suivants : sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative. L'intervalle de confiance à 95% de chacun de ces indices sera également calculé. Les rapports de vraisemblance positif et négatif seront également évalués.

8.2.3. Analyse des critères secondaires

Afin d'évaluer les performances du test QF-CMV (analyse par IHC) pour prédire la réactivation de CMV, des méthodes identiques à celles décrites pour l'analyse du critère principal seront employées.

La concordance entre les charges virales CMV mesurées par qPCR et celles mesurées par IHC sera évaluée par le diagramme de Bland-Altman. Ce graphique compare les moyennes des mesures évaluées par les deux techniques représentées en abscisses, à leurs différences représentées en ordonnées. Le biais est calculé comme étant la moyenne des différences entre les données mesurées par les deux techniques. Son écart-type sera également estimé afin d'évaluer les limites d'agrément.

Enfin, afin de comparer la charge virale mesurée au moment de la poussée à celle mesurée 14 semaines après la poussée inflammatoire, des tests t de Student pour données appariées seront utilisés si la variable testée suit une distribution normale. La normalité sera au préalable vérifiée par un test de Shapiro-Wilk. Dans le cas où la normalité ne serait pas vérifiée, des tests de rangs pour données appariées seront préférés.

8.3. Degré de signification statistique

Les résultats seront considérés comme significatifs au seuil de 5%.

8.4. Méthodes de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non valides

Aucune imputation des valeurs manquantes ne sera appliquée.

8.5. Gestion des modifications apportées au plan d'analyse de la stratégie initiale

Le plan d'analyse statistique sera rédigé à l'aveugle des données. Si des modifications doivent être apportées dans les méthodes décrites dans le paragraphe « analyse statistique » du présent protocole, elles seront validées par le statisticien de référence. Toutes déviations seront décrites et justifiées dans le protocole et/ou dans le rapport final.

8.6. Choix des personnes à inclure dans les analyses.

L'analyse portera sur tous les patients inclus dans l'étude et sur les données disponibles.

9. DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCES

9.1. Droit d'accès aux données

Les personnes participant à cette recherche seront informées de leur droit d'accès et de rectification aux données les concernant, ainsi que des modalités d'application de ce droit via la notice d'information et le formulaire de consentement de participation à l'étude. Le promoteur (par l'intermédiaire du TEC ou des investigateurs) s'engage à répondre à toute demande d'accès aux données dans un délai de 2 mois maximum. Par ailleurs, seuls le personnel habilité par le promoteur (investigateurs, ARC, TEC) et les représentants des autorités de santé pourront avoir accès à ces informations.

9.2. Description des variables recueillies

Les données de l'étude seront recueillies directement dans les cahiers d'observation, au fur et à mesure des visites de l'étude. Ces données seront validées par l'investigateur qui signera (manuellement ou électroniquement) les cahiers d'observation.

Les informations recueillies dans le cadre de cette étude sont les suivantes :

- données personnelles : âge, sexe, tabagisme
- données concernant la maladie : étendue, ancienneté de la maladie, activité clinique et

- endoscopique, traitements préalables, traitement administré
- lors de chaque consultation : activité clinique (score Mayo partiel)
- valeur de la charge virale CMV par qPCR
- valeur du test QF-CMV
- résultat de l'IHC

Les données manquantes devront être justifiées (par exemple dans un tableau des violations de protocole). Toute correction apportée dans le CRF devra être traçable (barrée, datée et paraphée par le correcteur sur un CRF « papier »).

9.3. Identification des données sources

Les documents sources seront constitués par l'ensemble des informations et résultats d'examens figurant dans le dossier médical des personnes participant à cette recherche. Les informations suivantes devront figurer dans le dossier médical :

- le titre de l'étude,
- la date d'information et d'inclusion du patient dans l'étude (signature du consentement),
- les différentes visites du patient dans le cadre du protocole,
- la survenue des complications.

L'investigateur s'engage à donner un accès direct à l'ensemble de ces documents aux personnes mandatées par le promoteur.

10. CONTRÔLE ET ASSURANCE QUALITE

Le contrôle de qualité sera réalisé par l'Attaché de Recherche Clinique de l'URCIP. Le promoteur ayant classé cette étude en niveau minimal de monitoring, l'ARC réalisera une visite de mise en place, le nombre de visites de monitoring nécessaire au contrôle de 100% des patients et une visite de fermeture. La présence de tous les consentements signés sera vérifiée. Ces visites seront réalisées selon les procédures opératoires standard du promoteur et donneront lieu à la rédaction de compte-rendu de visites qui seront transmis, dans un délai d'un mois maximum, à un chef de projet de l'URCIP qui les validera.

11. FAISABILITE ET CALENDRIER DE L'ETUDE

En tenant compte de la file active (estimées à plus de 600 patients atteints de RCH) du service de Gastro-Entérologie du CHU de Saint-Etienne, le recrutement des patients pour analyse des 196 patients devrait être possible sur une période de 2 ans.

Le recrutement des patients devrait se dérouler sur une période de 27 mois :

- durée de l'étude : environ 27 mois (24 mois pour l'inclusion des patients + 14 semaines desuivi des derniers patients)
- début prévisible de début des inclusions : 3^{ème} trimestre 2018
- date de fin des inclusions : 3^{ème} trimestre 2020
- date de fin du suivi : 4^{ème} trimestre 2020
- analyse et validation des résultats : 1^{er} trimestre 2021
- rapport final : 1^{er} semestre 2021.

12. ORGANISATION DE L'ETUDE

- Investigateur coordonnateur : Pr. X. Roblin
- Centre investigateur : CHU de Saint-Etienne

- Co-Investigateurs : Dr P. Veyrard et Dr E. Del Tedesco
- Les services concernés par la recherche :
 - Services de Gastro-Entérologie du CHU de Saint-Etienne (Pr. X. Roblin, Dr P. Veyrard et Dr E. Del Tedesco)
 - Service des Agents infectieux et d'Hygiène (Dr S. Pillet et Pr. B. Pozzetto)
 - Service d'Immunologie (A. Jentzer et Pr. S. Paul)
 - Service d'Anatomie et de Cytologie pathologiques (Dr F. Casteillo et Dr C. Habougit)
 - EA 3064 GIMAP, Université de Saint Etienne (Pr. X. Roblin, Dr S. Pillet, A. Jentzer, Pr. S. Paul et Pr. B. Pozzetto)
- Le(s) responsable(s) de la mesure du (des) critère(s) d'évaluation : Pr. X. Roblin, A. Jentzer, Dr S. Pillet, Dr F. Casteillo et Dr C. Habougit
- La personne chargée du contrôle de qualité de la recherche : ARC
- La personne chargée de la saisie des données : attaché de recherche clinique, A. Jentzer, Dr S. Pillet
- Le responsable de l'analyse statistique : Dr S. Pillet.

13. CONSIDERATIONS ETHIQUES

13.1. Déclaration indiquant que la recherche sera conduite conformément au protocole, aux bonnes pratiques et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur

Le protocole est en conformité avec les principes d'éthique établis par la 18^{ème} Assemblée Médicale Mondiale (Helsinki 1964) et par les amendements établis lors des 29^{ème} (Tokyo 1975), 35^{ème} (Venise 1983), 41^{ème} (Hong Kong 1989), 48^{ème} (Somerset West 1996), 52^{ème} (Edinburg 2000), 53^{ème} (Washington 2002), 55^{ème} (Tokyo), 59^{ème} (Seoul) et révisée lors de la 64^{ème} Assemblée Médicale Mondiale (Fortaleza, Brésil, Octobre 2013) . Il sera conduit conformément aux recommandations ICH de Bonnes Pratiques Cliniques.

13.2. Protection des personnes

Il s'agit d'une étude entrant dans le cadre de la catégorie 2 de la loi Jardé, du fait de la prise de sang et des biopsies supplémentaires conformes à l'arrêté du 3 mai 2017.

Le protocole sera soumis à l'avis d'un Comité de Protection des Personnes (CPP) avant de débiter les inclusions. Seul un résumé de la recherche sera envoyé à l'ANSM pour information.

Chaque patient se verra remettre une notice d'information lui expliquant l'étude et devra signer un formulaire de consentement éclairé avant de pouvoir participer à la recherche.

13.3. Assurance

Le promoteur de l'étude, le CHU de Saint-Étienne, contractera une police d'assurance en responsabilité civile (SHAM n°144.942).

13.4. Rapport Bénéfice/Risque

Le traitement et la prise en charge des patients au CHU de Saint-Etienne ne seront pas modifiés par leur inclusion dans l'étude. Les patients recevront un traitement immunosuppresseur (éventuellement associé au ganciclovir en cas de charge virale CMV colique élevée) selon les recommandations françaises et européennes. Les modalités de prise en charge des patients seront celles de la pratique habituelle.

Le prélèvement de biopsies supplémentaires dans la zone inflammatoire n'apporte pas de risque supplémentaire. Le risque hémorragique après biopsie est estimé à moins de 1 pour 10 000 patients ; les critères d'éligibilité, notamment l'exclusion des patients sous anticoagulant, permettent de considérer comme extrêmement faible le risque lié à ces prélèvements. Par ailleurs, l'endoscopie se faisant sous

anesthésie générale, il n’y aura aucune douleur liée à ces biopsies.

14. TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE

14.1. Circuit des données

Lors de leur recueil, les informations concernant les patients participant à cette étude seront anonymisées (identification par le monogramme et le n° d’inclusion) selon les recommandations établit par la CNIL dans la déclaration de conformité à la Méthodologie de référence MR001 enregistrée sous le n°1167710 pour le CHU de Saint-Étienne.

La saisie des données sera réalisée, sous la responsabilité de l’investigateur, par un membre de son équipe (TEC, infirmière,...) sur un fichier Access ou Excel, hébergé sur le réseau du CHU, dans le domaine réservé au service concerné. Ce fichier sera protégé par un mot de passe d’au moins 8 caractères alphanumériques. L’investigateur principal/coordonnateur s’engage à assurer la sauvegarde des données sur le réseau du CHU.

Une extraction des données sous forme ASCII, TXT, Access ou SAS sera demandée pour l’analyse, afin de pouvoir faire l’importation dans le logiciel d’analyse statistique adéquate.

14.2. Modalités de traitement, vérification et validation des données (data management)

Aucun contrôle des données n’est prévu au moment de la saisie. Le data-management sera réalisé avant l’analyse statistique de façon succincte et automatique pour les contrôles de bornes relatives (données à vérifier) et absolues (données aberrantes) et les données manquantes. Des demandes de correction seront établies par variable (avec la liste des patients).

En fonction du cahier des charges, une validation des données sera éventuellement réalisée pour l’analyse statistique, et des demandes de correction seront émises à l’investigateur ou au TEC de l’étude, qui s’engage à compéter et corriger les données en conséquence.

Le gel de base sera décidé d’un commun accord entre le statisticien de l’étude, l’investigateur principal et le chef de projet.

14.3. Archivage des documents de l’essai

A la fin de la recherche, l’ensemble des documents (différentes versions du protocole, cahiers d’observation, classeur investigateur, consentements, correspondances,...) figurant sur support papier seront archivés puis conservés, dans chaque centre, et chez le promoteur, durant 15 ans.

Une fois le rapport final de la recherche réalisé ou publié et, au maximum dans un délai de 5 ans après la fin de la recherche, les données figurant sur support informatique seront archivées sur CD/disque dur/clé USB et conservés pendant 15 ans dans une armoire fermée à clé du service concerné.

15. PROPRIETES DES DONNEES – REGLES DE PUBLICATION

- Les données seront la propriété du promoteur. Leur accès et leur utilisation seront sous la responsabilité de l’investigateur principal.
- Le Pr. Xavier ROBLIN sera responsable de la publication.
- Le CHU de Saint-Étienne sera cité en tant que promoteur de l’étude ainsi que le GIMAP.

16. Références bibliographiques

1. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Evolving treatment algorithms for ulcerative colitis: a French national consensus. *HépatogastroOncol. Dig.* **23**, 32–42 (2016).
2. Dignass, A. *et al.* Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part2: current management. *J. Crohns Colitis* **6**, 991–1030 (2012).
3. Antona, D. *et al.* Seroprevalence of cytomegalovirus infection in France in 2010. *Epidemiol. Infect.* **145**, 1471–1478(2017).
4. Pillet, S., Roblin, X., Cornillon, J., Mariat, C. & Pozzetto, B. Quantification of cytomegalovirus viral load. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **12**, 193–210 (2014).
5. Jentzer, A. *et al.* Cytomegalovirus and inflammatory bowel diseases, with a special focus on its role in ulcerative colitis. *Virologie* **21**, 287–302 (2017).
6. Roblin, X. *et al.* Cytomegalovirus Load in Inflamed Intestinal Tissue Is Predictive of Resistance to Immunosuppressive Therapy in Ulcerative Colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 2001–2008 (2011).
7. Roblin, X. *et al.* Prevalence of cytomegalovirus infection in steroid-refractory Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, E1396-1397 (2012).
8. Pillet, S. *et al.* Distribution of Cytomegalovirus DNA Load in the Inflamed Colon of Ulcerative Colitis Patients. *Am. J. Gastroenterol.* **111**, 439–441 (2016).
9. Pillet, S. Cytomegalovirus and ulcerative colitis: Place of antiviral therapy. *World J. Gastroenterol.* **22**, 2030 (2016).
10. Pillet, S. *et al.* Infliximab Does Not Worsen Outcomes During Flare-ups Associated with Cytomegalovirus Infection in Patients with Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 1580–1586 (2015).
11. Ciccocioppo, R. *et al.* Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in inflammatory bowel disease: need formucosal viral load measurement. *World J. Gastroenterol.* **21**, 1915–1926 (2015).
12. Roblin, X. *et al.* Cytomegalovirus load in inflamed intestinal tissue is predictive of resistance to immunosuppressivetherapy in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 2001–2008 (2011).
13. Zidar, N. *et al.* Diagnosing cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease--by immunohistochemistry orpolymerase chain reaction? *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **466**, 533–539 (2015).
14. Nakase, H. *et al.* Positive finding of colonic polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA is not false positive buta warning for treating patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**,E13-14 (2011).
15. Nakase, H. *et al.* Diagnosis and treatment of ulcerative colitis with cytomegalovirus infection: importance of controllingmucosal inflammation to prevent cytomegalovirus reactivation. *Intest. Res.* **12**, 5–11 (2014).
16. Zidar, N. & Tepeš, K. Cytomegalovirus Reactivation in Ulcerative Colitis: What Can We Learn From Pathology? *Am.J.Gastroenterol.* **111**, 1658 (2016).
17. McCoy, M. H. *et al.* qPCR increases sensitivity to detect cytomegalovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue ofgastrointestinal biopsies. *Hum. Pathol.* **45**, 48–53 (2014).
18. Burston, J., van Hal, S., Dubedat, S. & Lee, A. Inclusions or bystanders? CMV PCR sensitivity and specificity in tissuesamples. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **90**, 38–39 (2017).
19. Rahier, J. F. *et al.* Second European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management ofopportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis* **8**, 443–468 (2014).
20. Lee, H.-S. *et al.* Risk Factors and Clinical Outcomes Associated with Cytomegalovirus Colitis in Patients with AcuteSevere Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **22**, 912–918 (2016).
21. Gauss, A. *et al.* Intestinal cytomegalovirus infection in patients hospitalized for exacerbation of inflammatory boweldisease: a 10-year tertiary referral center experience. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **27**, 712–720 (2015).
22. McCurdy, J. D. *et al.* A model for identifying cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **13**, 131–137; quiz e7 (2015).
23. Boeckh, M. & Geballe, A. P. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J. Clin. Invest.* **121**, 1673–1680 (2011).
24. Crough, T. & Khanna, R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 76–98, Table of Contents (2009).
25. Forner, G. *et al.* Cytomegalovirus (CMV) Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay but Not CMV QuantiFERON Assay Is a Novel Biomarker To Determine Risk of Congenital CMV Infection in Pregnant Women. *J. Clin. Microbiol.* **54**,2149 (2016).
26. Banas, B. *et al.* Validation of T-Track® CMV to assess the functionality of cytomegalovirus-reactive cell-mediatedimmunity in hemodialysis patients. *BMC Immunol.* **18**, 15 (2017).
27. Tarasewicz, A., Dębska-Ślizieć, A. & Rutkowski, B. Clinical Utility of QuantiFERON-Cytomegalovirus Test inManagement of Kidney Transplant Recipients. *Transplant. Proc.* **48**, 1650–1653 (2016).
28. Kumar, D. *et al.* Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **9**, 1214–1222 (2009).
29. Manuel, O. *et al.* Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirusdisease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **56**, 817–824 (2013).

30. Yong, M. K. *et al.* Identifying Cytomegalovirus (CMV) complications using the Quantiferon-CMV assay after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J. Infect. Dis.* (2017). doi:10.1093/infdis/jix192
31. Castón, J. J. *et al.* Interferon- γ production by CMV-specific CD8+ T lymphocytes provides protection against cytomegalovirus reactivation in critically ill patients. *Intensive Care Med.* **42**, 46–53 (2016).
32. Weclawiak, H. *et al.* [Cytomegalovirus effects in solid organ transplantation and the role of antiviral prophylaxis]. *Nephrol. Ther.* **6**, 505–512 (2010).
33. Sood, S. *et al.* Targeted individual prophylaxis offers superior risk stratification for cytomegalovirus reactivation after liver transplantation. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **21**, 1478–1485 (2015).
34. Walker, S. *et al.* Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* **9**, 165–170 (2007).
35. Harbord, M. *et al.* Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *J. Crohns Colitis* **11**, 769–784 (2017).
36. Rutgeerts, P. *et al.* Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2462–2476 (2005).

Annexe 1 : Présentation des scores cliniques et endoscopiques utilisés pour apprécier l'activité inflammatoire de la RCH

Mayo-score UC-DAI (Ulcerative colitis Disease Activity Index) (À remplir par le médecin lors de la consultation et de l'endoscopie)		
Fréquence des selles	<input type="checkbox"/> 0 : Normale <input type="checkbox"/> 1 : 1 à 2 selles en plus du nombre habituel <input type="checkbox"/> 2 : 3 à 4 selles en plus du nombre habituel <input type="checkbox"/> 3 : >5 selles en plus du nombre habituel	_
Présence de sang dans les selles	<input type="checkbox"/> 0 : Absent <input type="checkbox"/> 1 : < 50% des émissions <input type="checkbox"/> 2 : > 50% des émissions <input type="checkbox"/> 3 : sang pur par l'anus	_
Appréciation globale de la gravité	<input type="checkbox"/> 0 : Quiescente <input type="checkbox"/> 1 : Activité légère <input type="checkbox"/> 2 : Activité modérée <input type="checkbox"/> 3 : Maladie sévère	_
Evaluation de la sévérité des lésions endoscopiques (lors d'une rectosigmoïdoscopie)	<input type="checkbox"/> 0 : Normal ou maladie inactive <input type="checkbox"/> 1 : Anomalies légères (érythème, diminution de la trame vasculaire, légère fragilité) <input type="checkbox"/> 2 : Anomalies modérées (érythème franc, disparition de la trame vasculaire, fragilité, érosions) <input type="checkbox"/> 3 : Anomalies sévères (saignement spontané, ulcérations)	_
Total Score		_

Figure 1 : Calcul du score Mayo à partir de critères cliniques et endoscopiques. La maladie est considérée comme inactive si le score est < 2, d'activité faible avec un score compris entre 3 et 5, d'activité modérée si le score est compris entre 6 et 10, et d'activité sévère si le score est > 11 (d'après³⁶). Le score Mayo endoscopique est calculé en fonction de l'aspect de la muqueuse colique observé lors de la recto-sigmoïdoscopie (dernier item du score total). Tous ces scores sont utilisés par les gastro-entérologues européens.

Annexe 2 : Expression des antigènes viraux au cours du cycle réplcatif

Après pénétration par voie muqueuse, CMV gagne la circulation sanguine et ses organes cibles. La réplication virale a lieu notamment dans les cellules mononucléées et les cellules endothéliales. Lorsque le virus pénètre dans la cellule, le génome viral gagne le noyau. L'expression des gènes viraux est séquentielle (Figure 2) avec d'abord l'expression de gènes très précoces (IE : *immediate early* ; le principal étant IE-1) qui codent essentiellement des facteurs de transcription impliqués dans l'activation de l'expression des gènes précoces (E : *early*) contrôlant la synthèse des enzymes impliquées dans la réplication du génome viral. Les gènes tardifs codent les protéines structurales du virus : protéines de capsid, du tégument (pp65) et de l'enveloppe virale (glycoprotéines de type gB par exemple).

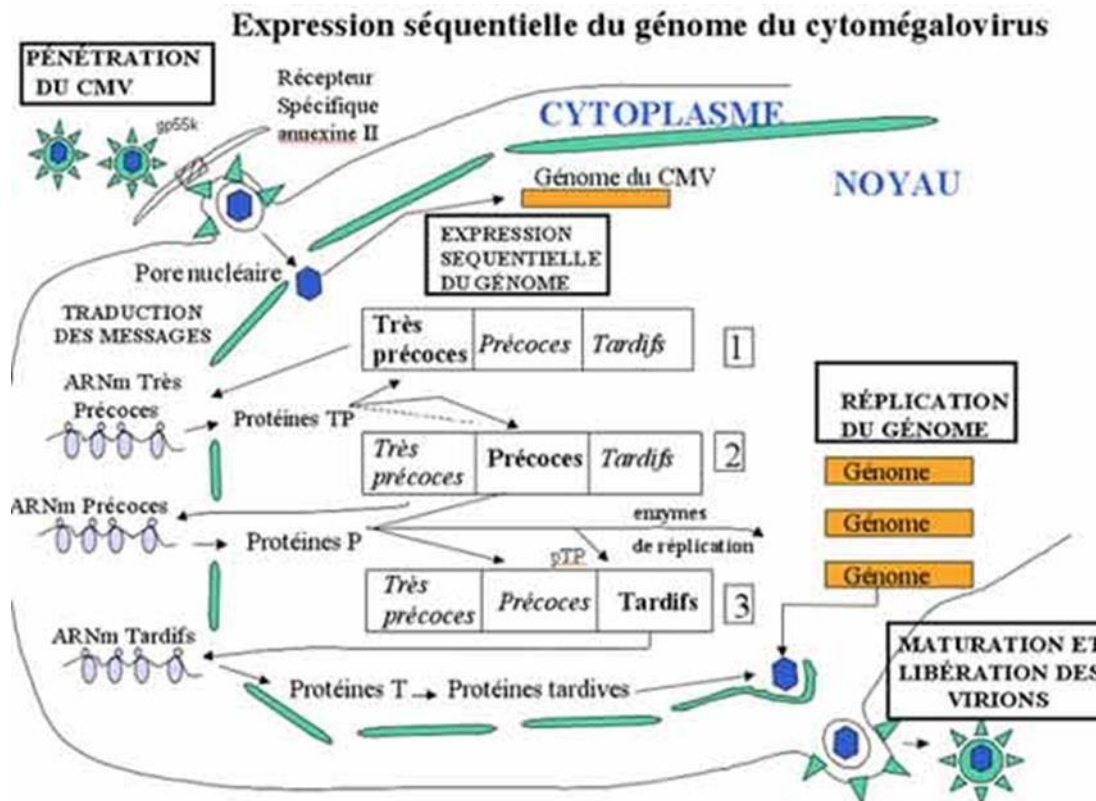


Figure 2 : Expression séquentielle des gènes du CMV dans la cellule infectée.

Annexe 3 : Présentation des tests utilisés pour mesurer la réponse immunitaire cellulaire anti- CMV

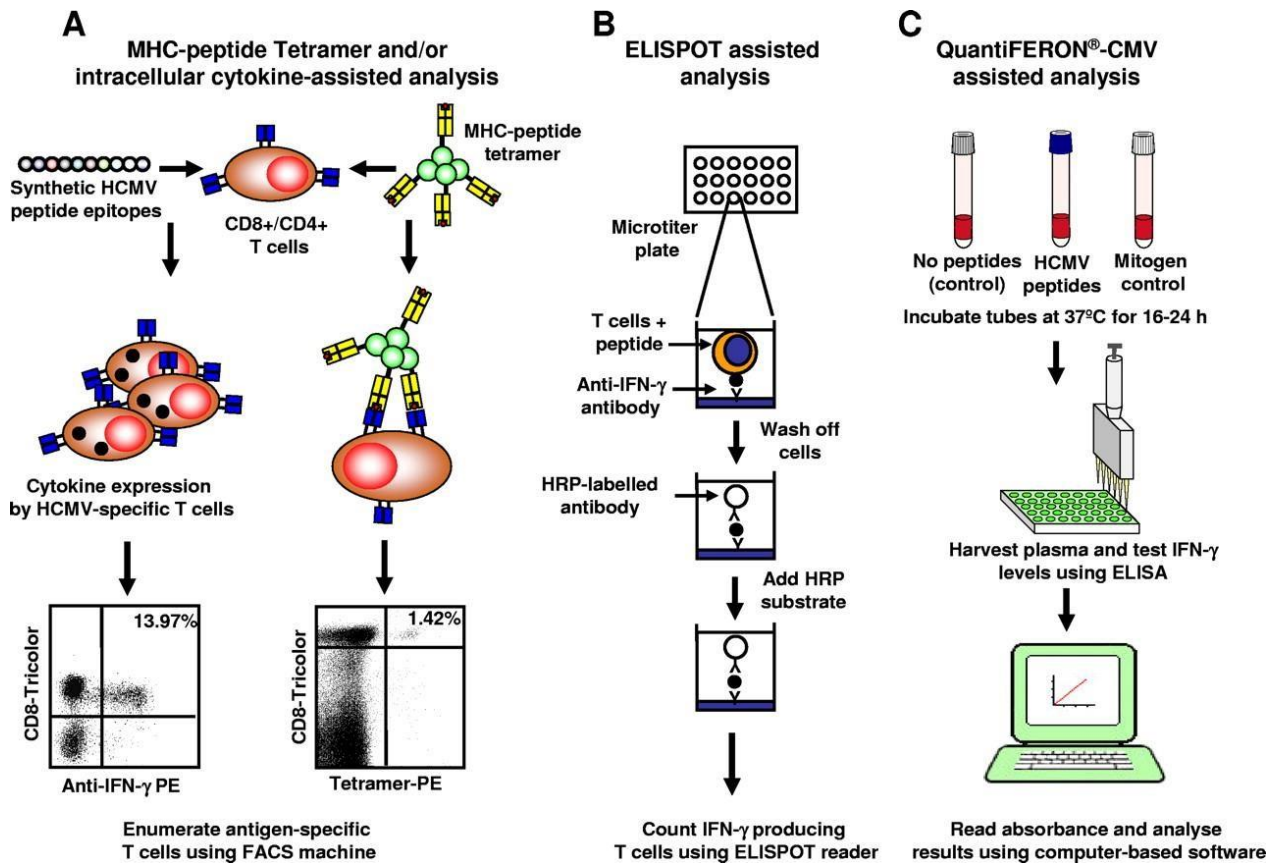


Figure 3 : Présentation des 3 principaux tests utilisés pour évaluer la réponse cellulaire anti-CMV (tiré de ²⁴).

A : Méthode par tétramères spécifiques du CMV : Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont activées par un tétramère de CMH (complexe d’histocompatibilité) de classe I couplé à un peptide synthétique spécifique de CMV. Ce tétramère doit être identique au groupe CMH du patient afin de permettre une bonne reconnaissance du peptide par les lymphocytes T (interaction du récepteur du lymphocyte T (TCR) avec le complexe CMH /peptide). Après incubation, les marqueurs d’activation (IFN- γ) des lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques de CMV sont mesurés par cytométrie en flux.

B : Méthode par ELISPOT : Les PBMC sont cultivées et stimulées *ex vivo* par des peptides synthétiques de CMV (IE-1 ou pp65). Après 1 à 3 jours de culture cellulaire, l’IFN- γ produit par les cellules stimulées est capté au fond de la microplaque par un anticorps spécifique et révélé par un anticorps secondaire marqué à la peroxydase de raifort (HRP). Chaque signal appelé « spot » correspond à un lymphocyte T spécifique anti-CMV. Le compte des « spot » rend la méthode quantitative.

C : Méthode par QuantiFERON-CMV (QF-CMV) :

Le prélèvement sanguin du patient est réparti en 3 tubes :

un tube témoin négatif (cellules non stimulées),

un tube témoin positif constitué d’un mitogène (produit activant de manière aspécifique les lymphocytes T),
 un tube contenant des peptides de CMV : tube test permettant de mesurer la réponse des cellules du patient vis-à-vis de CMV. Les peptides ont été sélectionnés de manière à cibler les principaux haplotypes de classe I des lymphocytes T CD8+ (A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 et Cw6 (A30, B13), soit plus de 98 % de la population humaine). Ces peptides représentent la plupart des antigènes CMV reconnus par le système immunitaire : protéine de tégument phosphorylée 65 (pp65), glycoprotéine d’enveloppe B (gB), *immediate-early protein-1* (IE-1).

Après incubation des 3 tubes à 37°C pendant 16 à 24 heures, le plasma est récupéré après centrifugation pour dosage par *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) de l'IFN- γ produit en réponse aux 3 conditions de stimulation. Le plasma peut être stocké sans altération du résultat (28 jours entre 2°C et 8°C ; plus longtemps si congélation) avant le dosage d'IFN- γ .

La valeur correspondant à la réponse cellulaire anti-CMV est obtenue selon le calcul suivant : (concentration d'IFN- γ dans le plasma du tube contenant les antigènes du CMV) – (concentration d'IFN- γ dans le plasma du tube négatif). Un calcul similaire est effectué pour la réaction au mitogène ; cette valeur permet de valider l'activation globale non spécifique des lymphocytes T. Si le résultat patient et le témoin positif sont inférieurs au seuil de 0,2 UI/ml, le test est considéré comme indéterminé.

Tableau 1 : Comparaisons des 3 principaux tests utilisés pour mesurer la réponse immune cellulaire anti-CMV. CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

	Tétramères	ELISPOT	QuantiFERON
Spécificité	++	+++	+++
Présentation par le CMH	Dépendant de chaque patient	Dépendant du type I et II	Dépendant du type I
Choix des peptides anti-CMV	A choisir	pp65 et IE-1	Environ 20 peptides dont gB, pp65 et IE-1
Possibilité de résultats indéterminés	-	-	+
Renseignement sur l'état général d'immunodépression du patient	-	-	+(par mesure de la réponse au mitogène)
Coût	+++++	++	+
Faisabilité en routine en laboratoire	-	+	++
Kit commercial	-	T-Track®-CMV ELISpot kit (Lophius)	QuantiFERON®-CMV (Qiagen)

Annexe 4 : Schéma de l'étude.

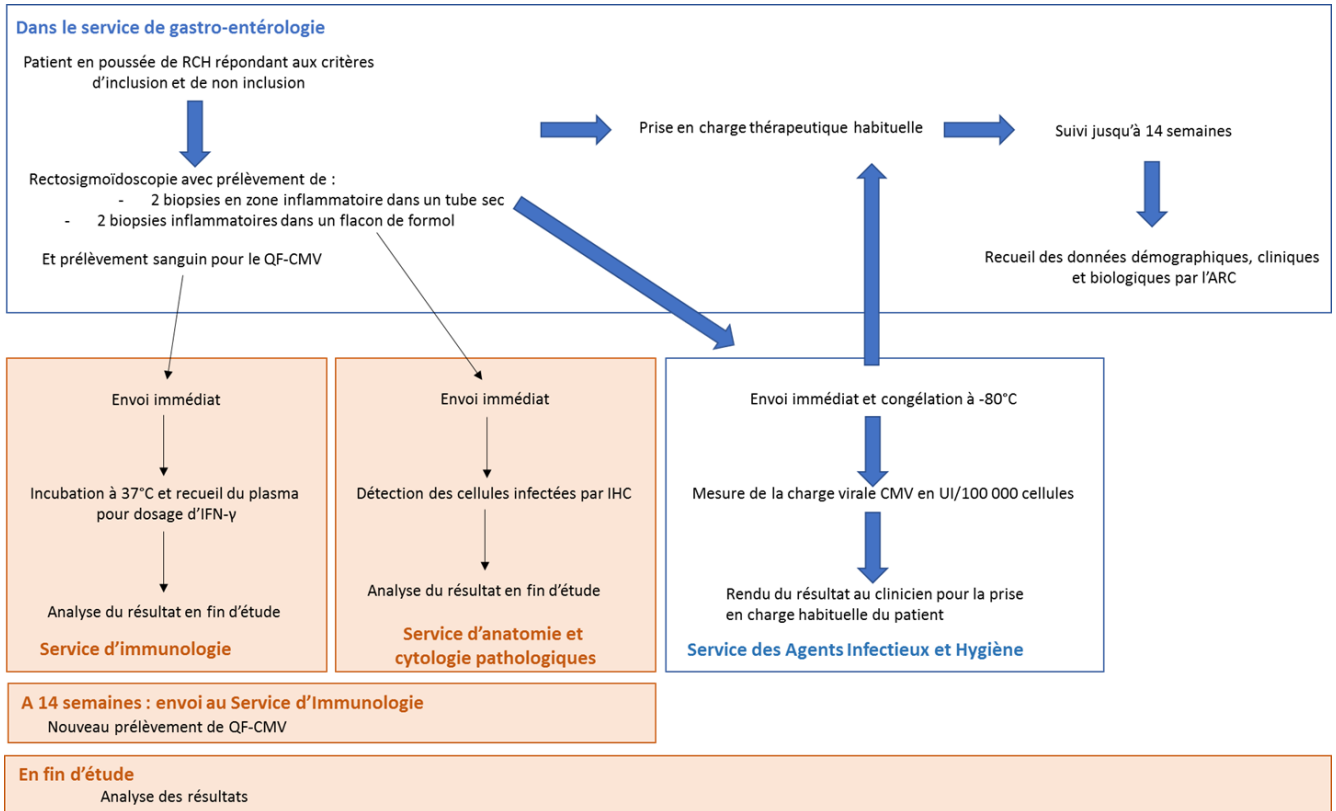


Figure 4 : Schéma de l'étude. Les parties en blanc représentent la prise en charge habituelle des patients qui ne sera pas changée par l'inclusion du patient dans l'étude. Les parties en orangé représentent les examens supplémentaires qui seront effectués dans l'étude. L'analyse des données sera réalisée en fin d'étude après recueil de l'ensemble des données. CMV : cytomégalovirus, IFN-γ : interféron gamma ; RCH : rectocolite hémorragique, UI : unités internationales.

**Place du test QuantiFERON-CMV dans la prédiction d'une réactivation colique à
cytomégalovirus au cours de la rectocolite hémorragique (RCH)
(étude descriptive monocentrique)
Version n° du 18/01/2018**

NOTICE D'INFORMATION POUR LE PATIENT

Madame, Monsieur,

- Vous êtes atteints d'une rectocolite hémorragique (RCH) nécessitant un diagnostic précoce et un suivi biologique pour adopter la prise en charge thérapeutique.

Objectif de l'étude

- Le cytomégalovirus, virus très commun dans la population générale, joue un rôle dans l'aggravation de votre maladie. La mesure de votre immunité vis-à-vis de ce virus par un test sanguin (QuantiFERON- CMV) et sa recherche par une autre technique que celle qui vous est faite habituellement pourrait permettre de mieux apprécier son rôle au cours de la RCH et d'envisager dans l'avenir un traitement antiviral spécifique. Le but de notre étude est d'évaluer si l'immunité contre le virus peut influencer la réponse que vous présentez aux différents traitements proposés dans le cadre de votre RCH. Nous espérons déterminer s'il est possible de définir une relation entre votre immunité et le risque d'infection virale pouvant expliquer une moindre réponse aux traitements destinés à lutter contre l'aggravation de cette maladie. Ces résultats permettraient de savoir dans quels cas il serait possible de ne pas avoir recours aux biopsies coliques comme elles sont pratiquées actuellement.

Déroulement

- Votre participation à cette étude nécessite lors de votre inclusion une prise de sang comprenant 3 tubes. Lors de l'endoscopie, deux biopsies coliques supplémentaires seront pratiquées afin de vérifier la présence de CMV dans les intestins par une seconde technique que nous évaluons également. Ce geste ne prolongera pas votre endoscopie, sera indolore et ne représente aucun danger supplémentaire. Lors de votre visite de suivi à 14 semaines, une nouvelle prise de sang de 3 tubes sera pratiquée afin de confirmer votre état immunitaire. Les seules contraintes de votre participation à l'étude sont la réalisation, lors de l'examen endoscopique nécessaire au suivi de votre RCH, de 2 prélèvements (biopsies) supplémentaires de tissu intestinal (correspondant à quelques milligrammes de muqueuse intestinale) pour la recherche de CMV par anatomopathologie et le prélèvement sanguin de 3 tubes de 1 mL nécessaire au test QuantiFERON-CMV.

Bénéfices et risques

- Les résultats de cette étude seront connus dans 2 ans et ne seront pas utilisés pour guider votre traitement qui sera conduit par votre médecin selon la pratique habituelle. A l'avenir, les résultats de cette étude sont susceptibles de modifier la prise en charge des malades présentant la même affection que vous.

Informations réglementaires.

- Vous disposez d'un délai de réflexion de quelques heures avant de donner votre réponse quant à la participation à cette recherche. Si vous le souhaitez, vos résultats personnels pourront vous être communiqués quand ils seront disponibles, de même que les conclusions générales de l'étude.
- Dans le cadre de la recherche biomédicale à laquelle le CHU de Saint-Etienne vous propose de

participer,
un traitement de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de cette dernière qui vous a été présenté. A cette fin, les données médicales vous concernant seront transmises au promoteur de la recherche ou aux personnes agissant pour son compte, en France ou à l'étranger. Ces données seront identifiées par un numéro de code et les deux premières lettres de votre nom et la première lettre de votre prénom. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises ou étrangères, ainsi qu'à d'autres entités du CHU de Saint-Etienne.

Conformément aux dispositions de loi relatives à l'informatique aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales en application des dispositions de l'article L1111-7 du Code de la Santé Publique. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de la recherche et qui connaît votre identité.

Vous êtes libre de refuser ou d'interrompre votre participation à cette étude à tout moment sans encourir aucune responsabilité ni aucun préjudice de ce fait. Cela n'altèrera pas la qualité des soins qui vous seront prodigués et ne modifiera pas vos relations avec l'ensemble de l'équipe soignante. En cas d'interruption de l'étude, les informations vous concernant seront conservées sauf opposition de votre part.

Cette étude a reçu l'accord du Comité de Protection des Personnes Sud-Est 1 le « date ». Elle est couverte par un contrat d'assurance souscrit par le CHU de Saint-Etienne (SHAM n°126814), qui est le promoteur de cette étude.

Place du test QuantiFERON-CMV dans la prédiction d'une réactivation colique à cytomégalovirus au cours de la rectocolite hémorragique (RCH)

(étude descriptive monocentrique)

Version n° du 18/01/2018

CONSENTEMENT DE PARTICIPATION DU PATIENT

Madame, Monsieur(Nom, Prénom)

Né(e) le/...../19.....

Adresse

Le Docteur m'a proposé de participer à une recherche organisée par le Pr. Xavier Roblin sur l'évaluation de l'immunité anti-CMV par réalisation d'un test sanguin : le QuantiFERON-CMV dans le cadre de poussée de rectocolite hémorragique (RCH).

Il m'a précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser. Cela ne changera pas nos relations pour mon traitement.

J'ai reçu et j'ai bien compris les informations suivantes :

- le but de cette recherche est d'évaluer l'état immunitaire anti-CMV par un test sanguin
- les examens comportent la réalisation d'un prélèvement sanguin de 3 tubes de 1 mL et de 2 biopsies supplémentaires lors de la rectosigmoïdoscopie

J'accepte de participer à cette recherche dans les conditions précisées dans la notice d'information.

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la loi. Si je le désire, je serai libre à tout moment d'arrêter ma participation sans justification ni préjudice de ce fait. J'en informerai alors le Docteur.....

J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche puissent faire l'objet d'un traitement automatisé par le promoteur pour son compte. J'ai bien noté que le droit d'accès prévu par la loi du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (article 39) s'exerce à tout moment auprès du médecin qui me suit dans le cadre de la recherche et qui connaît mon identité. Je pourrai exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès de ce même médecin qui contactera le promoteur de la recherche.

Je pourrai à tout moment demander toutes informations complémentaires au Dr en appelant le

Fait à, en trois exemplaires dont un est remis à l'intéressé(e)

Nom du médecin

Nom et prénom du patient

le/...../201...

le/...../201...

.....
Signature du médecin

.....
Signature du patient précédée de la mention « Lu et approuvé »

Annexe 6 : Finances (dans un document joint pour l'ANSM)

Cette partie a été calculée et validée avec Mr Arnaud Garcin.

NATURE DE LA DEPENSE	DETAIL	2018	2019	2020	Total
DEPENSES DE PERSONNEL					
Personnel médical					0
					0
Personnel paramédical					0
					0
Personnel non médical	TEC à 20% sur 2 ans	4 000,00	8 000,00	4 000,00	16000
	Temps technicien en Immunologie 5% sur 2 ans	700	1 400	700	2800
					0
					0
Sous-total (1)		4 700	9 400	4 700	18 800
DEPENSES MEDICALES					
Pharmacie					0
Petit matériel médical					0
Fournitures de laboratoires					0
Réactifs de laboratoire	Tests QF-CMV (tubes et plaques de dosage d'interféron par ELISA) soit 85,82 €TTC par patient (inclusion + S14)	4 205	8 410	4 205	16 821
Imagerie					0
	Analyse IHC dans le service d'Anatomieet Cytologie pathologiques comprenant les réactifs et le temps technicien (15 € TTC par patient)	735	1 470	735	2 940
Sous-traitance à caractère médical					0
Maintenance à caractère médical					0
Sous-total (2)		4 940	9 880	4 940	19 761
DEPENSES HOTELIERES ET GENERALES					
Petit hôtelier					0
Papeterie					0
Petit matériel					0
Fournitures de bureau et informatique					0
Crédit-bail (mat. informatique)					0
Location d'équipement					0
Maintenance et réparation					0
Assurances	sham (supprimer en cas d'étude hors lois)	1 800,00			1800
Documentation					0
Publications	Frais de publication			1 000	1000
Services extérieurs					0
Transport patients					0
Personnel ext. à l'établissement					0
Missions				0	0
Sous-total (3)		1 800	0	1 000	2 800
DEPENSES FINANCIERES					
Frais financiers (mat. médical)					0
Charges exceptionnelles					0
Amortissements					0
Sous-total (4)		0	0	0	0
TOTAL (1)+(2)+(3)+(4)		11 440	19 280	10 640	41 361
Cofinancement par AIRE					5 000
Collaboration industrielle	remise de 35% du prix du QF-CMV sur 380 tests et 20 tests gratuits				6 432
BUDGET DEMANDE A AOL					29 928

Impact de la colite à cytomégalo­virus sur les poussées de rectocolite hémorragique : approches expérimentales et études cliniques

RESUME :

La rectocolite hémorragique (RCH), une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, entraîne une inflammation intestinale qui participerait à la réactivation du réservoir latent du cytomégalo­virus (CMV). Les colites associées au CMV jouent un rôle péjoratif dans l'évolution clinique de la RCH avec des résistances aux traitements utilisés dans la RCH et une morbi-mortalité augmentée sans en comprendre la physiopathologie. La modélisation in vitro et in vivo de l'infection intestinale par le CMV permettrait d'améliorer la compréhension de cette relation complexe. Le modèle in vitro avait pour objectif la production de virion de HCMV à partir d'une souche virale Merlin permettant d'infecter une lignée cellulaire épithéliale intestinale « Caco-2 » afin de modaliser l'infection de HCMV au niveau de l'épithélium intestinal. Dans cette thèse, un modèle de colite chimique par le DSS de souris BALB/c infectées par le CMV murin (MCMV) a été développé afin d'induire la réactivation virale. Cependant, ce modèle n'a pas permis d'observer que le MCMV majore la colite chimique malgré une infection virale systémique et colique et la présence d'une forte inflammation induite par le DSS. Ces expérimentations ont été complétées par une approche épidémiologique de recherche de facteur prédictif de réactivation virale. Une étude rétrospective a été menée pour examiner les facteurs prédictifs d'absence de colite à CMV dans une cohorte de patients consultant à l'Hôpital Universitaire de Saint-Etienne. Les caractéristiques individuelles, l'activité de la maladie, les traitements immunosuppresseurs et la charge virale tissulaire de CMV n'ont pas été reconnus comme facteurs prédictifs de réactivation de CMV. L'étude d'une cohorte prospective au CHU de Saint- Etienne et de Lyon dont l'objectif est d'évaluer le test biologique QuantiFERON-CMV chez les patients atteints de poussée de RCH. Ce test évalue l'immunité cellulaire anti-CMV et pourrait permettre de classer les patients à fort ou à faible risque de réactivation virale ouvrant la porte à la thérapie personnalisée lors de poussées de RCH chez les patients séropositifs.

Mots clefs : cytomégalo­virus, rectocolite hémorragique, modèle murin, réactivation virale, colite associée au CMV