

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2015

Thèse n°

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

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

présentée et soutenue publiquement
le 18 Septembre 2015 à NANTES
par Monsieur Grégoire POTIRON

Mise au point d'une méthode de détection quantitative par PCR en temps réel du
polyomavirus humain de type 9, et application à une cohorte de patients
transplantés rénaux.

Composition du jury :

Président : Pr N. LEVEQUE
Membres : Pr M. HOURMANT
Pr B.M. IMBERT

Directeur de thèse : Dr C. BRESSOLLETTE

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2015

Thèse n°

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

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

présentée et soutenue publiquement
le 18 Septembre 2015 à NANTES
par Monsieur Grégoire POTIRON

Mise au point d'une méthode de détection quantitative par PCR en temps réel du
polyomavirus humain de type 9, et application à une cohorte de patients
transplantés rénaux.

Composition du jury :

Président : Pr N. LEVEQUE
Membres : Pr M. HOURMANT
Pr B.M. IMBERT

Directeur de thèse : Dr C. BRESSOLLETTE



PHARMACIE

Professeurs

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

Maîtres de Conférences

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

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

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- PERKINS Marguerite,

Le Doyen,

Année universitaire 2014 - 2015

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- | | |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. AGIUS Gérard, bactériologie-virologie2. ALLAL Joseph, thérapeutique3. BATAILLE Benoît, neurochirurgie4. BENSADOUN René-Jean, cancérologie – radiothérapie (en disponibilité 1 an à compter de janvier 2014)5. BRIDOUX Frank, néphrologie6. BURUCOA Christophe, bactériologie - virologie7. CARRETIER Michel, chirurgie générale8. CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire9. CHRISTIAENS Luc, cardiologie10. CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire11. DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation12. DEBIAIS Françoise, rhumatologie13. DROUOT Xavier, physiologie14. DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie15. EUGENE Michel, physiologie (surnombre jusqu'en 08/2016)16. FAURE Jean-Pierre, anatomie17. FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique18. GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique19. GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie20. GILBERT Brigitte, génétique21. GOMBERT Jean-Marc, immunologie22. GOJJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques23. GUILHOT-GAUDEFROY François, hématologie et transfusion24. GUILLET Gérard, dermatologie25. GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale26. HADJADJ Samy, endocrinologie et maladies métaboliques27. HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire28. HERPIN Daniel, cardiologie29. HOUETO Jean-Luc, neurologie30. INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale31. IRANI Jacques, urologie32. JABER Mohamed, cytologie et histologie33. JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes34. JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire35. KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie36. KEMOUN Gilles, médecine physique et réadaptation (en détachement 2 ans à compter de janvier 2014)37. KITZIS Alain, biologie cellulaire38. KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale39. LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire40. LEVARD Guillaume, chirurgie infantile41. LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie42. LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques43. MACCHI Laurent, hématologie44. MARECHAUD Richard, médecine interne45. MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire46. MEURICE Jean-Claude, pneumologie47. MIGEOT Virginie, santé publique48. MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique49. MIMOZ Olivier, anesthésiologie - réanimation50. MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie51. NEAU Jean-Philippe, neurologie52. ORIOT Denis, pédiatrie53. PACCALIN Marc, gériatrie54. PAQUEREAU Joël, physiologie | <ol style="list-style-type: none">55. PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique56. PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire57. PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique58. POURRAT Olivier, médecine interne59. PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique60. RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire61. RICHER Jean-Pierre, anatomie62. RIGORD Philippe, neurochirurgie63. ROBERT René, réanimation64. ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales65. ROBLOT Pascal, médecine interne66. RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie67. SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (surnombre jusqu'en 08/2017)68. SILVAIN Christine, hépato-gastro- entérologie69. SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie70. TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale71. TOUCHARD Guy, néphrologie72. TOURANI Jean-Marc, cancérologie73. WAGER Michel, neurochirurgie |
|--|---|

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

1. ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
2. ARIES Jacques, anesthésiologie - réanimation
3. BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie - virologie
4. BEN-BRIK Eric, médecine du travail
5. BILAN Frédéric, génétique
6. BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
7. CASTEL Olivier, bactériologie - virologie - hygiène
8. CATEAU Estelle, parasitologie et mycologie
9. CREMNITER Julie, bactériologie - virologie
10. DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie - réanimation
11. DIAZ Véronique, physiologie
12. FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
13. FRASCA Denis, anesthésiologie - réanimation
14. HURET Jean-Loup, génétique
15. LAFAY Claire, pharmacologie clinique
16. SAPANET Michel, médecine légale
17. SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
18. THILLE Arnaud, réanimation
19. TOUGERON David, hépato-gastro-entérologie

Professeur des universités de médecine générale

GOMES DA CUNHA José

Professeurs associés de médecine générale

BINDER Philippe
VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

BIRAULT François
BOUSSAGEON Rémy
FRECHE Bernard
GIRARDEAU Stéphane
GRANDCOLIN Stéphanie
PARTHENAY Pascal
VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

DEBAIL Didier, professeur certifié
PERKINS Marguerite, maître de langue étrangère

Professeurs émérites

1. DORE Bertrand, urologie (08/2016)
2. FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie – virologie (08/2015)
3. GIL Roger, neurologie (08/2017)
4. MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (08/2016)
5. MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
6. MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

1. ALCALAY Michel, rhumatologie
2. BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
3. BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
4. BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
5. BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
6. BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
7. BEGON François, biophysique, Médecine nucléaire
8. BOINOT Catherine, hématologie - transfusion
9. BONToux Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
10. BURIN Pierre, histologie
11. CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
12. CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
13. CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
14. CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
15. DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
16. DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
17. DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
18. DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
19. FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino-Laryngologie (ex-émérite)
20. GOMBERT Jacques, biochimie
21. GRIGNON Bernadette, bactériologie
22. GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
23. JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
24. KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
25. KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
26. LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
27. LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
28. MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
29. MARILLAUD Albert, physiologie
30. MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
31. POINTREAU Philippe, biochimie
32. REISS Daniel, biochimie
33. RIDEAU Yves, anatomie
34. SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
35. TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
36. TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
37. VANDERMARCQ Guy, radiologie et imagerie médicale

REMERCIEMENTS

Au Président du jury,

Monsieur le Professeur Nicolas Lévêque,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

A la directrice de thèse,

Madame le Docteur Céline Bressollette,

Pour avoir accepté de m'accompagner au cours de ce travail.

Merci pour l'ensemble de tes conseils, pour ton investissement permanent et le temps que tu m'as consacré. C'est peu dire compte tenu de l'éloignement et de ton emploi du temps...

A Madame le Professeur Maryvonne Hourmant,

Pour avoir accepté de faire partie du jury.

Veuillez trouver le témoignage de ma vive reconnaissance.

A Madame le Professeur Berthe-Marie Imbert,

Merci pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et m'avoir permis de réaliser ce travail. Soyez assurée de ma gratitude et de mon profond respect.

À mes parents, pour votre affection et votre soutien depuis toujours. Vous m'avez permis de bénéficier de conditions de travail idéales depuis de nombreuses années déjà,

À mon grand frère Julien, source d'inspiration pharmaceutique, pour les moments partagés et ceux à venir,

À toute ma famille et à ma grand-mère, Mamy Paulette, doyenne exemplaire,

À la belle-famille Loizeau, on aura désormais plus le temps de trinquer,

À Edouard, Pierre-Antoine, Yannick, François, Spreng, Antoine, Banban, Juju, Loic et les autres...Pourvu que ça dure...

Aux Nantais Michoc', Marc, Fabien, Micka, Mathieu, François, Pierrot, pour ces belles années Fac de Bristol à Hammamet, et celles qui arrivent...

À Claire, indéfectible soutien, pour le bonheur partagé au quotidien,

Je ne pourrais terminer sans avoir une pensée pour les différentes équipes que j'ai rencontrées, à Poitiers, Angers, Cholet et à Nantes, ainsi qu'aux différents co-internes que j'ai pu côtoyer au cours de ces quatre belles et courtes années,

Et bien sûr à l'ensemble du personnel du laboratoire de virologie, et tout particulièrement à Bernard, pour tes réponses à mes nombreuses questions, ta motivation permanente, ta constante disponibilité et ton expertise.

Votre bonne humeur quotidienne, saupoudrée de franches rigolades, donne un cocktail délicieux. **A consommer sans modération.**

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	10
GÉNÉRALITÉS.....	11
I – Les polyomavirus humains et leurs méthodes de découvertes	11
1) La découverte des premiers polyomavirus	11
2) La découverte des nouveaux polyomavirus humains.....	16
II – Principales caractéristiques virologiques des polyomavirus.....	26
1) Structure de la particule virale	26
2) Organisation génomique et transcription.....	26
3) Cycle de multiplication viral	30
III – Epidémiologie.....	33
1) Modes de transmission.....	33
2) Séroprévalence	33
3) Répartition géographique.....	35
IV – Pathogénicité virale, aspects cliniques et maladies associées.....	36
1) Le polyomavirus BK.....	36
2) Le JC polyomavirus.....	38
3) Le Karolinska Institute polyomavirus	39
4) Le Washington University polyomavirus	39
5) Le Merkel Cell polyomavirus	40
6) Le polyomavirus associé à la Trichodysplasie spinuleuse.....	41
7) Les autres polyomavirus humains	42
V – Le polyomavirus humain 9	43
OBJECTIFS	46
MATÉRIEL ET MÉTHODES	47
I – Matériel.....	47
1) Patients.....	47
2) Prélèvements biologiques.....	47
3) Amorces et sondes.....	48
4) Thermocycleur.....	49
5) Témoin positif	50
6) Témoin interne d'amplification	52
II – Méthodes.....	53
1) Extraction des acides nucléiques	53
2) Réactifs pour la PCR en temps réel	53
3) Interprétation des résultats de la PCR.....	54
RÉSULTATS.....	55
I – Mise au point de la PCR HPyV9 en temps réel.....	55
1) Conditions initiales de PCR pour l'amplification du témoin positif.....	55
2) Optimisation des conditions de la PCR en temps réel pour la détection de l'HPyV9.....	57

II – Recherche de l’HPyV9 dans des échantillons cliniques chez des patients transplantés de rein	63
1) Caractéristiques de la population et prélèvements étudiés	63
2) Recherche de l’HpyV9 dans les prélèvements de sang.....	66
3) Recherche de l’HPyV9 dans les prélèvements d’urine	66
DISCUSSION	69
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77
LISTE DES ABRÉVIATIONS	83
LISTE DES FIGURES	85
LISTE DES TABLEAUX.....	86
SERMENT DE GALIEN	87
RÉSUMÉ.....	88

INTRODUCTION

La transplantation rénale est la plus fréquente des transplantations réalisées en France, avec plus de 2500 reins greffés chaque année depuis dix ans. Environ 34 000 personnes vivent ainsi avec un greffon rénal fonctionnel en France. Parmi les complications post-greffe, outre le risque de rejet, ces patients transplantés présentent un risque infectieux accru, en partie lié à l'administration de traitements immunosuppresseurs au long cours.

Les infections virales post-transplantation sont notamment dues à des virus à ADN persistants, tels que les *Herpesviridae* parmi lesquels notamment le Cytomégalo virus (CMV) ou le virus Epstein Barr (EBV). Plus récemment, l'émergence de la Néphropathie à polyomavirus BK a renforcé l'intérêt porté au polyomavirus BK et à la famille des *Polyomaviridae*. Le rôle pathogène des polyomavirus découverts plus récemment, dont le polyomavirus humain 9 (HPyV9), reste encore à déterminer avec plus de précisions.

La première partie de ce travail est une revue bibliographique reprenant les données récentes de la littérature concernant les circonstances de découverte, les données épidémiologiques et le pouvoir pathogène des polyomavirus humains.

Dans un deuxième temps, les résultats d'une étude portant plus particulièrement sur le polyomavirus humain 9 seront présentés. Après avoir mis au point une technique de PCR quantitative en temps réel pour la détection et la quantification de l'HPyV9, nous avons recherché la présence du génome viral dans des prélèvements sanguins et urinaires de patients adultes transplantés de rein.

GÉNÉRALITÉS

I – Les polyomavirus humains et leurs méthodes de découvertes

1) La découverte des premiers polyomavirus

1.1) Les polyomavirus découverts à partir de modèles animaux

1.1.1) Le polyomavirus murin

En 1953, Gross et al. injectent des extraits de broyats de foies, de rates et de tumeurs lymphatiques issus de souris leucémiques de type AK Leukemic Mouse à 84 souris de lignée C3H. Quinze souris développent une tumeur bilatérale des glandes salivaires. Un agent filtrable, inactivable par la chaleur et inactif chez les souris leucémiques est alors mis en cause dans la survenue du carcinome des glandes salivaires.¹

En 1957, Stewart et al. effectuent une expérience similaire. Ils inoculent des extraits de tumeurs parotidiennes de souris sur des cellules de rein de singe et sur des cellules de membrane chorioallantoïdienne de poulet. Au bout de 15 jours, le surnageant des cultures cellulaires est injecté à des souris de lignée C3H. En plus du développement de tumeurs parotidiennes, Stewart et al. observent l'apparition de lésions rénales et d'autres tumeurs endocrines (glandes sous-maxillaires, glandes sublinguales, glandes mammaires, thymus).²

Cet agent filtrable, découvert par Gross et al. en 1953, est ainsi nommé «polyomavirus murin», en rapport avec sa capacité à entraîner des tumeurs («ome») de localisation multiple («poly»).

1.1.2) Le Simian Vacuolating virus 40 (SV40)

En 1960, Sweet et Hilleman réalisent des injections sous-cutanées et intracérébrales, d'extraits de cellules de rein de singes cynomolgus et rhésus, chez des hamsters. Ils observent l'apparition de fibrosarcomes au niveau du point d'injection, et concluent à la présence d'un contaminant dans les lignées cellulaires de rein de singe. Aucun effet cytopathogène (ECP) n'est observé sur les cellules de rein de singe cynomolgus et rhésus. Ces extraits sont alors inoculés sur cellules testiculaires de singe rhésus et sur cellules rénales de grand singe vert d'Afrique. Un ECP, caractérisé par l'apparition de grandes vacuoles et une nette ballonnisation des cellules, est alors observé.³

Ils nomment ce nouveau virus le SV40 : Simian Vacuolating virus 40 (Quarantième virus à être découvert chez le singe).

Les cellules de rein de singe rhésus et cynomolgus sont utilisées pour la préparation de vaccins anti-poliomyélite. Le SV40 a par la suite été retrouvé dans les différents vaccins de type Sabin et dans les premiers lots de vaccins de type Salk, malgré l'utilisation de formaldéhyde.

En 1962, l'utilisation d'anticorps anti-SV40 couplés à la fluorescéine permet de détecter des antigènes de SV40 sur des coupes de fibrosarcomes de hamsters. Il s'agit de la première démonstration du rôle oncogène d'un virus de primate sur un modèle animal expérimental.⁴

Depuis 1908, certains sarcomes, différents types de carcinomes, de leucémies et de lymphomes, décrits chez des poulets et des souris, avaient été attribués à des «agents filtrables» et transmissibles (Figure 1). Les expériences menant à la découverte du polyomavirus murin et du SV40 montrent que des virus à pouvoir oncogène peuvent être hébergés chez des hôtes *a priori* asymptomatiques. Ces mêmes virus ont la particularité de pouvoir entraîner le développement de tumeurs très spécifiques chez un hôte particulier.⁵

A ce jour, le caractère oncogène du SV40 n'a pas été mis en évidence chez l'homme, malgré l'exposition de nombreux individus via les différents lots de vaccins anti-poliomyélite.

SOME OF THE MORE IMPORTANT ONCOGENIC VIRUSES					
1908	Chicken leukaemia	..	..	..	Ellermann and Bang
1911	Chicken sarcoma	..	..	..	Rous
1932	Rabbit fibroma	..	..	..	Shope
1933	Rabbit papilloma	..	..	..	Shope
1934	Frog kidney carcinoma	..	..	..	Lucké
1936	Mouse mammary carcinoma	..	..	..	Bittner
1951	Mouse leukaemia	..	..	..	Gross
1953-57	Mouse parotid tumour (polyoma)	..	..	..	Gross-Stewart-Eddy
1960-61	Vacuolating simian virus 40 (oncogenic for hamsters)	..	..	..	Eddy and co-workers
1962	Human adenovirus Type 12 (oncogenic for hamsters)	..	..	..	Trentin and co-workers

Figure 1 : Liste des principaux virus oncogènes connus en 1963 avec l'année et l'auteur de leur découverte

(Gross et al., 1963)

1.2) Les premiers polyomavirus humains

1.2.1) Le polyomavirus BK (BKPyV)

Dès 1967, il est démontré que des virus capables de persister sous forme latente chez l'homme, tels que le Cytomégalovirus humain (CMV), peuvent être à l'origine d'infections symptomatiques chez des patients transplantés rénaux, traités par immunosuppresseurs.⁶

C'est dans ce contexte qu'en 1971, Gardner et al. effectuent une surveillance virologique et cytologique des urines d'une cohorte de patients transplantés rénaux. En microscopie électronique, ils observent des particules virales de 43,6 nm de diamètre dans les urines d'un patient transplanté le 24 juin 1970 (un homme de 39 ans d'origine soudanaise dont les initiales sont B.K.) (Figure 2).⁷

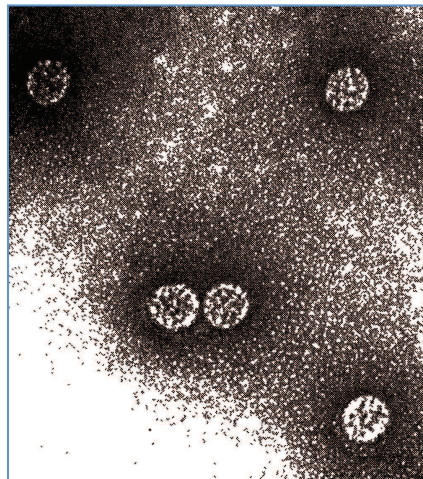


Figure 2 : Échantillon d'urine contenant des particules de BKPyV observé en microscopie électronique
(G x 180 000)(Gardner et al., 1971)

Cette observation est effectuée au décours d'une hospitalisation survenue dix semaines après la transplantation. Le patient présente une sténose urétérale caractérisée par une anurie associée à une élévation de la créatininémie. La mise en culture des urines du patient sur cellules de rein de singe et sur lignée continue de cellules de rein de grand singe vert d'Afrique entraîne l'apparition d'un ECP en respectivement 18 jours et trois mois. Les titres d'anticorps, mesurés par technique de fixation du complément et par inhibition d'hémagglutination, sont faibles chez le donneur et chez le receveur avant transplantation et jusqu'à dix semaines après transplantation.

Lors de l'épisode de sténose urétérale, l'élévation significative des titres d'anticorps est le reflet de l'excrétion virale urinaire au cours de cette réactivation. Gardner et al.

nomment ce virus le virus BK, en s'inspirant des initiales du patient. Il est désormais appelé le polyomavirus BK (BKPyV).

1.2.2) Le JC polyomavirus (JCPyV)

En cette même année 1971, dans le même numéro du Lancet, Padgett et al. rapportent un cas de LeucoEncéphalopathie Multifocale Progressive (LEMP), chez un patient de 38 ans, atteint d'un lymphome de Hodgkin depuis huit ans. La LEMP est une maladie rare caractérisée par une atteinte démyélinisante de la substance blanche. En avril 1970, le patient présente une paralysie faciale gauche progressive, une paralysie de l'hypoglosse et une paralysie du membre supérieur gauche. Sur la première biopsie cérébrale réalisée en mai 1970, l'examen anatomopathologique révèle l'existence de lésions de démyélinisation. Malheureusement, l'état du patient s'aggrave et son décès survient rapidement en juillet 1970. Une biopsie cérébrale post-mortem est ponctionnée. Son examen anatomopathologique révèle la présence d'oligodendrocytes d'aspect pathognomonique au niveau des aires de démyélinisation, associés à des plages de nécrose cavitaire au niveau des lobes frontaux, pariétaux et temporaux.

L'étude de l'ultrastructure de la substance blanche met en évidence des agrégats de particules virales au sein des noyaux des cellules gliales cérébrales (Figure 3).

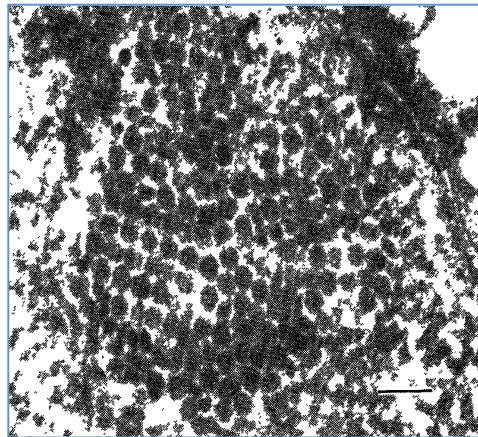


Figure 3 : Coupe fine de cellule gliale montrant des agrégats de particules virales chez un patient atteint de LEMP

(G x 85 000)(Padgett et al., 1971)

L'inoculation secondaire de cellules gliales fœtales, au moyen de broyats de biopsie cérébrale, entraîne l'apparition d'un ECP. Les cellules sont très élargies avec des noyaux lobulés voire multinucléés. Cela s'associe à la multiplication de virions observables en

microscopie. La recherche de virus simien 40 au moyen d'anticorps spécifiques marqués à la fluorescéine reste négative.

Sur le modèle du BKPyV, ce nouveau virus est nommé à partir des initiales du patient chez lequel il a été découvert, c'est à dire JC virus (maintenant dénommé JC polyomavirus).⁸ Il existe une large homologie de séquence entre le SV40, le BKPyV et le JCPyV. Ces trois virus partagent deux à deux plus de 65% d'homologie au niveau de leur séquences protéiques et génomiques (Figure 4).

	BKV-JCV	BKV-SV40	JCV-SV40
Proteins ^a			
VP1	87	88	85
VP2	88	86	83
VP3	84	81	78
T antigen	90	84	82
t antigen	86	78	76
DNA ^b	72	69	68

^aPercent amino acid homology.
^bPercent sequence identity.

Figure 4 : Pourcentages d'homologie partagés entre les séquences protéiques et génomiques du SV40, du BKPyV et du JCPyV
 (Khalili et Stoner,2004)⁹

1.2.3) Historique de la taxonomie des polyomavirus

Le BKPyV et le JCPyV ont longtemps été classés dans le groupe des Papovavirus créé par J.L. Melnick en 1962.¹⁰ En effet, il remarque des similitudes entre les virus de type Papilloma, observés chez l'homme et les lapins, les Polyomavirus de la souris et les virus vacuolisants du singe. Ils partagent une taille d'environ 45 nm de diamètre, un génome à ADN double brin, une capside constituée de 42 capsomères, une thermorésistance, une multiplication nucléaire lente et la capacité à induire des tumeurs (Figure 5). Il invente ainsi le terme de pa'po'va' virus, constitué des deux premières lettres des virus cités précédemment, en respectant leur ordre de découverte.

Trait	Type 1 papilloma, rabbit	Type 2 papilloma, human wart	Type 3 polyoma	Type 4 vacuolating
Size (mμ)	40 to 50	40 to 50	40 to 50	40 to 50
Capsomeres (No.)	42	42	42	42
Filamentous forms occur	Yes	Yes	Yes	Yes
Nucleic acid: type	DNA	DNA	DNA	DNA
Nucleic acid: strandedness	Double	Double	Double	Double
Lipid	Nonessential		Nonessential	Nonessential
Buoyant density			1.30	1.30
Thermal stability at 50° C in H ₂ O	Relatively stable		Relatively stable	Relatively stable
Thermal stability at 50° C in MgCl ₂			Labile	Exceedingly labile
Antigenic varieties	One		One	One
Growth cycle (hr)			24	24
Multiplication site	Nucleus	Nucleus	Nucleus	Nucleus
Natural host	Rabbit	Man	Mouse	Monkey
Latent and chronic infections common	Yes	Yes	Yes	Yes
Tumorigenic	Yes	Yes	Yes	Yes

Figure 5 : Caractéristiques des virus membres du groupe des Papovavirus
(Melnick et al., 1962)

En 1999, l'International Committee on Virus Taxonomy procède à une révision de la classification et à l'individualisation de la famille des *Polyomaviridae*.¹¹

2) La découverte des nouveaux polyomavirus humains

Depuis 2007, onze polyomavirus ont été découverts chez l'homme et de nombreux autres à partir de modèles animaux. Ce grand nombre de découvertes, concentrées sur une courte période, s'explique en partie par le développement de nouvelles techniques de PCR et de séquençage.

Les treize polyomavirus humains connus à ce jour apparaissent en rouge sur la frise chronologique ci-dessous (Figure 6).

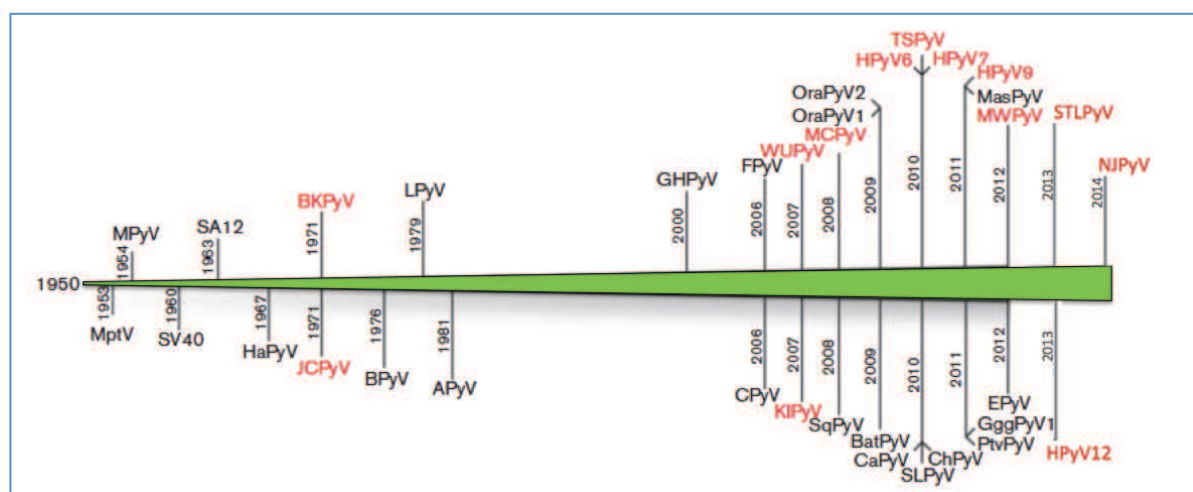


Figure 6 : Frise chronologique résumant l'ensemble des polyomavirus humains identifiés à ce jour
Les noms des polyomavirus humains figurent en rouge. Les noms inscrits en noir correspondent à des polyomavirus découverts chez l'animal.
(D'après Feltkamp et al., 2013)¹²

2.1) Le Karolinska Institute polyomavirus (KIPyV)

En 2007, plus de trente ans après les découvertes du BKPyV et du JCPyV, un nouveau polyomavirus humain est découvert à partir d'aspirations nasopharyngées : le Karolinska Institute polyomavirus (KIPyV). L'équipe d'Allander et al. adapte une méthode précédemment développée par Froussard et al., dans le but d'identifier de nouveaux pathogènes respiratoires. Ils parviennent à utiliser cette méthode à grande échelle, et à construire une bibliothèque d'ADN complémentaires (ADNc), non plus à partir d'un phage, mais à partir d'échantillons biologiques humains.¹³

Mise au point en 1992, la technique initiale dite de «PCR randomisée», permet la construction d'une banque d'ADNc à partir d'un phage à ARN de type MS2 (3600 pb).¹⁴ Pour cela, Froussard et al. utilisent une amorce universelle de 26 nucléotides, comprenant un «hexamère aléatoire» à son extrémité 3' :

Amorce Universelle dN₆ : 5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNNNNNN-3'

Ce type d'amorce peut se fixer sur de très nombreuses séquences, ce qui permet d'amplifier des fragments d'acides nucléiques sans connaître leur composition au préalable. L'amorce universelle dN₆ se fixe sur l'ARN phagique pour permettre l'action de la reverse transcriptase. Le brin d'ADN complémentaire est ensuite synthétisé. On obtient des doubles brins d'ADN dits «randomisés» qui sont amplifiés par une Taq polymérase. La migration sur gel d'agarose des amplicons terminaux montre une population hétérogène constituée de très nombreux fragments d'ADN de taille comprise entre 400 et 3000 pb.

La figure 7 représente le fonctionnement d'une amorce universelle.

En 2007, Allander et al. sélectionnent aléatoirement 20 aspirations nasopharyngées, prélevées chez des patients symptomatiques, au laboratoire du Karolinska Institute, à Stockholm. Pour construire une bibliothèque d'ADNc, les échantillons sont filtrés, ultracentrifugés, et traités par désoxyribonucléase (ADNase) avant une double extraction d'ARN et d'ADN.

Les ARN et ADN extraits sont amplifiés par PCR randomisée. Les fragments obtenus ont une taille comprise entre 600 et 1500 pb. Ils sont clonés puis exprimés par des bactéries (*Escherichia coli*). Une amplification par méthode de type «Rolling Circle Amplification»¹⁵ (RCA), permet d'obtenir les séquences de 384 clones dont la composition est déterminée par séquençage bidirectionnel. Une des séquences clonées

possède une taille de 4808 pb et partage 30% d'homologie avec celle codant pour la protéine VP1 du SV40. Le séquençage complet aboutit à une séquence circulaire de 5040 pb.¹⁶ Ce nouveau virus est intégré à la famille des *Polyomaviridae* d'après l'homologie avec le SV40 et en raison du caractère circulaire de ce génome de petite taille. Il s'agit du troisième polyomavirus découvert chez l'homme, plus de trente ans après le BKPyV et le JCPyV. Ce nouveau virus est appelé le KI polyomavirus (KIPyV), du nom du Karolinska Institute de Stockholm.

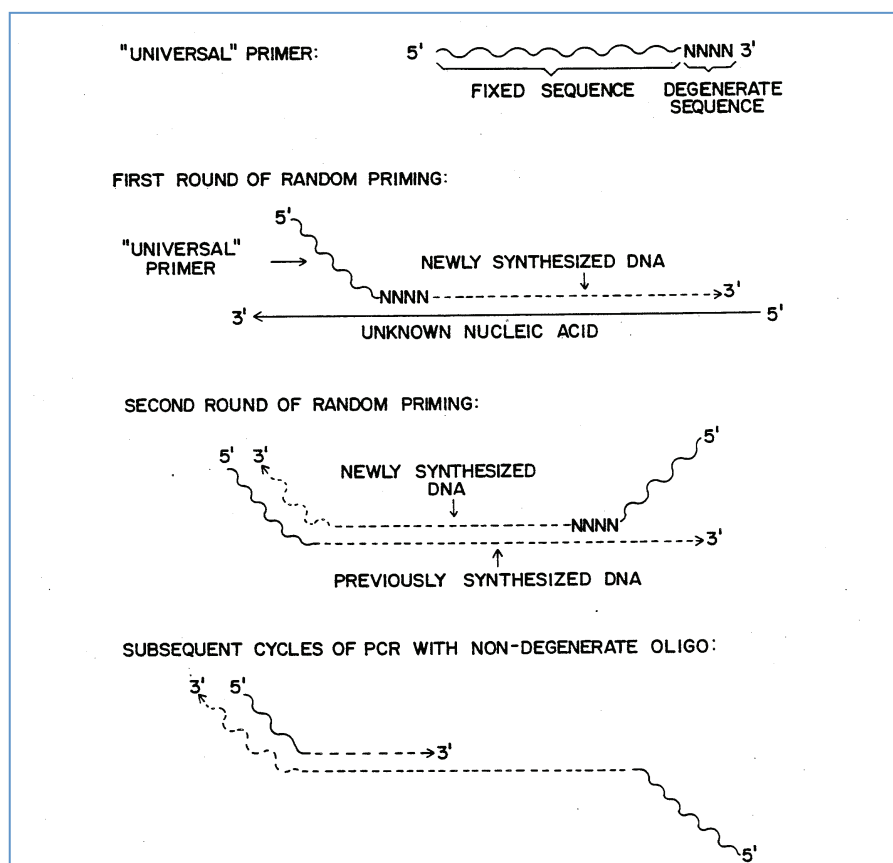


Figure 7 : Illustration du fonctionnement d'une amorce universelle
D'après <http://www.google.com/patents/US5104792>.

2.2) Le Washington University polyomavirus (WUPyV)

Toujours en 2007, l'équipe américaine de Gaynor et al. découvre le Washington University polyomavirus.¹⁷ Ils sélectionnent des aspirations nasopharyngées prélevées chez des patients atteints d'infections respiratoires non documentées dans le but d'identifier de nouveaux agents pathogènes. L'objectif est de construire des bibliothèques d'ADNc pour effectuer du séquençage à haut niveau. L'étape de reverse transcription des ARN extraits utilise des amorces contenant un «nonamère randomisé» : 5'-GTTTCCAGTCACGATANNNNNNNNN-3'

Les acides nucléiques sont amplifiés par PCR randomisée. Une PCR d'amplification génère une bibliothèque d'ADNc à partir des amplicons, en utilisant l'amorce tronquée (5'-GTTTCCCAGTCACGATA-3'). Ces ADNc sont clonées dans des bactéries puis l'ADN est purifié et séquencé. Une séquence de 5229 pb obtenue à partir d'une aspiration nasopharyngée d'une enfant de trois ans, présentant un tableau de pneumonie, n'est pas référencée dans les bases de données. Il s'agit d'un nouveau polyomavirus humain, de nouveau découvert à partir d'un échantillon respiratoire, au moyen d'une technique de PCR randomisée : le Washington University polyomavirus (WUPyV).

2.3) Le Merkel Cell polyomavirus (MCPyV)

Décrit par Toker et al. en 1972, le carcinome cellulaire de Merkel (CCM) est une tumeur neuroendocrine à tropisme dermique, relativement rare mais agressive (taux de mortalité d'environ 30%).¹⁸ Cela fait suite à la description par Friedrich Sigmund Merkel, en 1875, de cellules cutanées non kératinisées jouant le rôle de récepteurs tactiles aux stimuli de l'environnement.¹⁹

C'est en 2008 que Feng et al. vont identifier un polyomavirus associé au CCM par la méthode de DTS : Digital Transcriptome Subtraction.²⁰ Cette technique consiste à soustraire les séquences correspondant à celles du génome humain, à partir de bibliothèques constituées de plusieurs milliers d'ADNc. Ainsi, seules les séquences non soustraites sont candidates à un séquençage ultérieur. Cette approche nécessite un haut niveau de discrimination entre les séquences humaines et non humaines.

La première étape est la construction de bibliothèques d'ADNc à partir d'ARNm issus de fragments de différents CCM, par une méthode de RT-PCR randomisée. Les bibliothèques constituées forment un ensemble de 395734 séquences, dont 382747 séquences de haute fidélité après élimination des séquences polluantes. La grande majorité des séquences de haute fidélité (99,4%) correspond à des séquences humaines publiées dans la banque de séquences du National Center for Biotechnology (NCBI). Ce qui ne laisse ainsi que 2395 séquences candidates pour le séquençage.

Un des produits de séquençage obtenus possède un fort degré d'homologie avec une séquence du Lymphotropic polyomavirus (LPyV) ou polyomavirus du grand singe vert d'Afrique, et avec une portion de la séquence codant pour le grand antigène T du BKPyV. Il s'agit là d'un nouveau polyomavirus humain : le Merkel Cell polyomavirus (MCPyV).²¹

2.4) Les polyomavirus humains 6 et 7 (HPyV6 et HPyV7)

En 2010, l'équipe de Schowalter et al. travaille sur des écouvillons cutanés prélevés chez 35 volontaires sains dans le but d'obtenir le génome complet du MCPyV. Après amplification par méthode de type RCA, les amplicons obtenus sont digérés par des enzymes de restriction telles que *BamHI* ou *EcoRI*, puis clonés dans des plasmides. Sans surprise, la majorité des séquences obtenues correspond à celles de papillomavirus à tropisme cutané déjà répertoriées. Un fragment de restriction de 1700 pb présente une homologie limitée (non chiffrée) avec la séquence de la protéine VP2 du WUPyV. La séquence complète obtenue ultérieurement est celle d'une nouvelle espèce virale appelée polyomavirus humain 6 (HPyV6).²²

Pour rechercher d'autres polyomavirus similaires à l'HPyV6, ils mettent au point une PCR dégénérée qui cible les régions conservées de l'HPyV6 et du WUPyV. Un produit d'amplification est séquencé. Le génome complet obtenu partage 68% d'homologie avec celui de l'HPyV6. Ils nomment ce nouveau virus le polyomavirus humain 7 (HPyV7).

2.5) Le polyomavirus associé à la Trichodysplasie Spinuleuse (TSPyV)

La Trichodysplasie spinuleuse ou folliculo-dystrophie est une atteinte cutanée rare. Elle se caractérise par le développement de papules folliculeuses et de spicules ou épines kératinisées typiquement au niveau de la face, et plus particulièrement au niveau du nez, des oreilles, ou des sourcils. Ces lésions apparaissent exclusivement chez l'immunodéprimé.

Cette maladie est décrite pour la première fois en 1999, chez un homme de 44 ans transplanté rein-pancréas depuis trois ans, traité par tacrolimus, azathioprine et prednisone.²³ L'examen anatomopathologique de biopsies cutanées réalisées au niveau du nez révèle la présence de particules virales de 38 nm de diamètre en microscopie électronique (Figure 8).

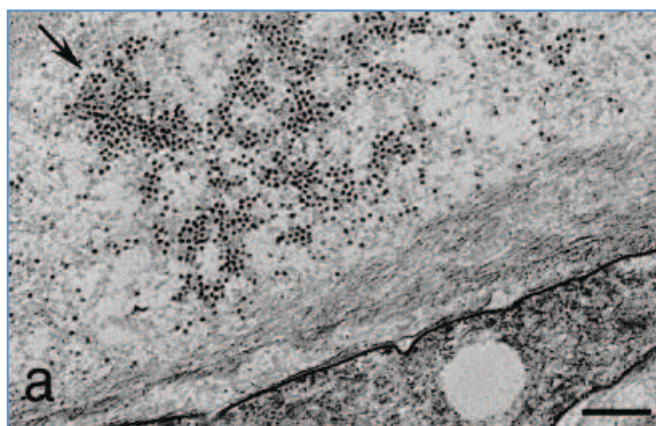


Figure 8 : Micrographie électronique de kératinocytes montrant des particules de TSPyV
(Echelle: 0,5 μ m) (Hay et al., 1999)

La taille, la forme et la localisation nucléaire font évoquer un petit virus à ADN non enveloppé, semblable à ceux de la famille des *Polyomaviridae*. Il faut attendre 2010 pour réussir à obtenir la séquence de ce virus. Chez un jeune homme de 15 ans, transplanté cardiaque en 2006, traité par tacrolimus, mycophénolate mofétil et méthylprednisone, l'apparition de papules indurées et de spicules sur le nez, les oreilles et le front entraîne la réalisation de biopsies. Une méthode de PCR de type RCA permet l'obtention d'amplicons d'environ 5000 pb à partir des biopsies. Une étape de clonage, suivie d'une étape de séquençage, génère un génome de 5232 pb de structure comparable à celui des autres polyomavirus humains.²⁴ Par corrélation aux atteintes cliniques décrites, il est appelé le polyomavirus associé à la Trichodysplasie Spinuleuse (TSPyV).

2.6) Le polyomavirus humain 9 (HPyV9)

Des études sérologiques montrent qu'il existe une réactivité croisée entre des sérums humains et des pseudoparticules virales ou Virus Like Particules (VLP) du polyomavirus du grand singe vert d'Afrique ou LPyV. Des tests ELISA détectent des anticorps anti-LPyV chez 15 à 25% des individus sains, sans que le génome du LPyV ne soit amplifié chez l'homme.²⁵ Ces résultats amènent à supposer l'existence d'un virus humain très proche du LPyV. En 2011, Scuda et al. s'appuient sur ces résultats et sur les récentes découvertes de polyomavirus pour rechercher de nouveaux virus chez l'homme. Les 597 échantillons biologiques qu'ils collectent sont pour la plupart issus d'une cohorte utilisée pour le diagnostic des infections à herpesvirus et à BKPyV. Les échantillons de plasma, de sérum, d'urine et de sang total proviennent de patients immunodéprimés (patients transplantés rénaux, patients séropositifs pour le VIH, patients atteints de néoplasies, patients greffés de cellules souches hématopoïétiques). Ils étudient

également des lavages bronchoalvéolaires prélevés chez des patients symptomatiques atteints de pneumonies, des liquides céphalo-rachidiens prélevés chez des patients atteints de sclérose en plaque et des échantillons de selles collectés chez des enfants diarrhéiques.

La PCR générique mise au point utilise des amorces déoxyinosines-substituées, qui ciblent les régions conservées du gène codant pour la protéine VP1 des polyomavirus (sauf celles du KIPyV, du WUPyV, de l'HPyV6 et de l'HPyV7). Une des séquences amplifiées est issue du sérum d'une patiente transplantée rénale, et partage 83% d'homologie avec celle de la protéine VP1 du LPyV.²⁶ Secondairement, pour amplifier une séquence de 950 pb, codant pour une partie des protéines VP1 et VP3, ils élaborent deux amorces sens dégénérées à partir de la séquence de la protéine VP3 du LPyV, et deux amorces antisens à partir de la séquence VP1 nouvellement identifiée.

L'utilisation d'une «PCR nichée» permet l'amplification du reste du génome, qui est ensuite séquencé (5026 pb). Ce nouveau polyomavirus est nommé le polyomavirus humain 9 (HPyV9). Les génomes de l'HPyV9 et du LPV partagent 76% d'homologie.

La mise au point secondaire d'une PCR spécifique permet la détection de quatre échantillons positifs supplémentaires (à partir des 597 échantillons initiaux). Le génome de l'HPyV9 parvient à être amplifié à partir d'un échantillon de plasma et d'un échantillon d'urine de deux autres patients transplantés rénaux, à partir d'un échantillon de sérum d'un patient atteint de LEMP, et à partir d'un prélèvement de sang total d'un patient atteint d'une leucémie aigue.

2.7) Le Malawi polyomavirus (MWPpyV)

En 2012, l'équipe de Siebrasse et al. découvre un nouveau polyomavirus à partir d'un échantillon de selles d'une enfant de 15 mois, totalement asymptomatique, originaire du Malawi. Cette découverte a lieu dans le cadre d'une étude débutée en 2008 visant à étudier la variabilité du microbiote fécal : des échantillons de selles sont collectés chez 531 sujets sains originaires de grandes métropoles américaines, de la partie amazonienne du Venezuela et de campagnes du Malawi.

Les échantillons de selles congelés sont remis en suspension, filtrés, et une extraction par du chloroforme est réalisée. La phase aqueuse obtenue est traitée par de l'ADNase, puis une fraction est incorporée dans un mélange réactionnel contenant la phi 29 polymérase, qui permet une amplification de type RCA. Les amplicons obtenus sont

séquencés. Une des séquences obtenues présente des similitudes avec celles d'autres polyomavirus (séquence du gène de l'agT du LPyV et séquences du gène VP1 du JCPyV et du TSPyV). Il s'agit d'un nouveau polyomavirus, nommé Malawi polyomavirus (MWPpyV), dont le génome complet comporte 4927 pb.²⁷ La mise au point ultérieure d'une PCR en temps réel spécifique à Saint Louis (USA) révèle la présence du MWPpyV dans douze échantillons de selles sur 514 échantillons collectés chez des enfants de 0 à 18 ans, présentant des diarrhées.

De manière concomitante, Lim et al. découvrent un autre polyomavirus chez un patient présentant une maladie génétique rare, un syndrome de WHIM (verrues, hypogammaglobulinémie, infections, myélokathexis). Ils utilisent une PCR avec une amplification de type RCA à partir de condylomes anaux. Le séquençage des amplicons donne de nombreuses séquences qui correspondent à celles de papillomavirus connus. Une des séquences obtenues diffère de celles des papillomavirus et le génome complet séquencé possède une structure de type polyomavirus. Ils le nomment le polyomavirus humain 10 (HPyV10).²⁸

Le génome du MWPpyV et celui de l'HPyV10 possèdent plus de 95% d'homologie. D'après les critères de l'ICTV (seuil d'homologie supérieur à 81%),²⁹ il s'agit en fait du même virus découvert par deux équipes différentes quasi-simultanément. Nous utiliserons le terme de MWPpyV pour la suite de ce manuscrit puisque l'article rapportant la découverte du Malawi polyomavirus a été publié un mois avant celui sur l'HPyV10.

2.8) Le Saint Louis polyomavirus (STLPyV)

En 2013, l'équipe de Siebrasse et al. qui a déjà séquencé le MWPpyV découvre le Saint Louis polyomavirus (STLPyV). Ils utilisent la même cohorte de patients et les mêmes échantillons de selles. Par une méthode de PCR de type RCA, ils amplifient un nouveau polyomavirus à partir d'échantillons de matières fécales d'un enfant de 15 mois, lui aussi originaire du Malawi.³⁰ Ce nouveau virus ne partage que 64,2% d'homologie avec le génome du MWPpyV, il constitue donc une espèce à part entière.

2.9) Le polyomavirus humain 12 (HPyV12)

Comme pour l'HPyV9, une PCR qui cible des régions conservées du gène VP1 est utilisée à grande échelle sur de nombreux échantillons biologiques. Des prélèvements de rates et de ganglions lymphatiques sont effectués chez des patients décédés en attente de prélèvements d'organes. Des prélèvements de foies, de vésicules biliaires, d'œsophages, d'estomacs, de biopsies rectales et caecales sont obtenus après chirurgie digestive à but diagnostique ou thérapeutique. Un produit d'amplification est obtenu pour treize échantillons sur les 242 prélèvements testés. Par comparaison à des bases de données, huit séquences correspondent à celle de la protéine VP1 du MCPyV, et une à celle du TSPyV. La même séquence est obtenue à quatre reprises après amplification à partir de prélèvements de foie de quatre patients différents. Elle présente 51 à 67% d'homologie avec la séquence VP1 des autres polyomavirus. La réalisation d'une nouvelle PCR, au moyen de deux amorces dégénérées ciblant les domaines conservés du gène VP3 des polyomavirus, et de deux autres amorces antisens spécifiques de la séquence VP1 nouvellement découverte, permet l'obtention d'un génome complet de 5033 pb, appelé polyomavirus humain 12 (HPyV12).³¹

La recherche secondaire du génome de l'HPyV12 avec une PCR spécifique s'est avérée positive à partir de biopsies digestives (deux échantillons positifs sur dix) et d'une selle d'un patient diarrhéique (un échantillon positif sur les 56 testés).

2.10) Le New Jersey polyomavirus (NJPyV)

En 2014, le dernier polyomavirus humain connu à ce jour est découvert : il est appelé le New Jersey polyomavirus (NJPyV). Le NJPyV est détecté chez une patiente de 33 ans diabétique de type 1, greffée du pancréas depuis onze mois au moment de cette découverte.³² Sous traitements immunosuppresseurs (prednisone, mycophénolate mofétil, tacrolimus), cette patiente présente brutalement une baisse d'acuité visuelle, l'apparition de plaques de nécrose sur le visage, le cuir chevelu et les mains ainsi qu'une grande faiblesse musculaire. L'initiation d'un traitement par méthylprednisone associée à la réalisation de plasmaphérèses entraînent une régression des signes cliniques, à l'exception de l'atteinte oculaire. Les recherches de génomes viraux par PCR spécifiques sur sérum sont toutes négatives. Une biopsie musculaire est effectuée au niveau du deltoïde. En microscopie électronique, l'examen anatomopathologique révèle une destruction des capillaires et un important infiltrat inflammatoire au niveau de

l'endomysium, ainsi que des signes de microhémorragies. De plus, il existe des inclusions nucléaires, dans lesquelles sont présentes des particules virales de 36 à 44 nm de diamètre. Les recherches de génomes viraux à l'aide de PCR spécifiques sur la biopsie musculaire sont toutes négatives. Ces résultats négatifs motivent la réalisation d'une extraction des acides nucléiques totaux à la recherche d'un agent pathogène non connu. L'étape de transcription inverse, puis la synthèse des brins complémentaires d'ADN, permettent d'obtenir des doubles brins d'ADNc qui sont fragmentés par des enzymes de restriction puis amplifiés. L'analyse des 491858 séquences génomiques obtenues est non contributive. En revanche, par comparaison à la base de données BLAST, 61 séquences (de 98 à 276 pb) présentent 75 à 80% d'homologie avec différents polyomavirus de chimpanzés. Le génome complet, obtenu dans un second temps, comporte 5108 pb et présente 80,7% d'homologie avec celui du Chimpanzé polyomavirus (ChPyV).

Le NJPyV a ensuite été détecté au niveau des plaques de nécrose, et a été retenu comme à l'origine de l'atteinte de cette patiente (tropisme pour les cellules endothéliales musculaires et pour la rétine). Il semble qu'il puisse s'agir d'une acquisition *de novo*. Les PCR NJPyV réalisées *a posteriori*, sur les sérums du donneur et de la patiente, prélevés avant transplantation, sont négatives. En revanche, une charge virale de 1.6×10^5 copies/mL de sérum est mesurée dix mois après l'épisode initial (souche n'ayant pas de mutations par rapport à la souche décrite initialement).

II – Principales caractéristiques virologiques des polyomavirus

L'ensemble des polyomavirus humains partage des caractéristiques structurales communes. Ce sont parmi les plus petits virus humains avec une taille d'environ 35 à 45 nm de diamètre.³³

1) Structure de la particule virale

Le virion est composé d'une capside icosaédrique non enveloppée qui entoure le génome viral. Cette capside est constituée de 72 capsomères. Chaque capsomère est composé d'un pentamère de protéines VP1 (protéine majeure, environ 360 molécules par capsomère), lié par liaisons hydrophobes à une protéine VP2 ou VP3 (protéines mineures, environ 30 à 60 molécules par capsomère) localisée au centre du pentamère.³⁴ La cohésion de la capside est assurée par des interactions calciques entre l'extrémité C-terminale d'un monomère VP1 et le pentamère voisin.³⁵

2) Organisation génomique et transcription

Le génome des polyomavirus est toujours structuré de façon identique et comporte entre 4900 et 5400 pb. Il s'agit d'un génome à ADN bicaténaire circulaire, étroitement lié avec des histones cellulaires (H2A, H2B, H3 et H4) donnant l'aspect de minichromosomes.³⁶ Il est constitué des régions codantes précoces et tardives, séparées par la région contrôle non codante (RCNC) (Figure 9).

2.1) La région codante

Constituant la grande majorité du génome, la région codante est elle-même subdivisée en deux parties.

2.1.1) La région codante précoce

La région codante précoce représente environ la moitié du génome (2500 pb) et code pour des protéines appelées antigènes T (T pour tumeur). Rapidement après l'entrée dans leurs cellules cibles, tous les polyomavirus humains expriment des ARN messagers (ARNm) issus d'une transcription dans le sens anti-horaire. L'épissage alternatif d'un même ARNm précurseur est à l'origine de la synthèse de différents antigènes T : le petit

antigène T (agT), le grand antigène T (AgT) et des antigènes T tronqués (au centre ou au niveau de l'extrémité C-terminale, en fonction des mutations observées).

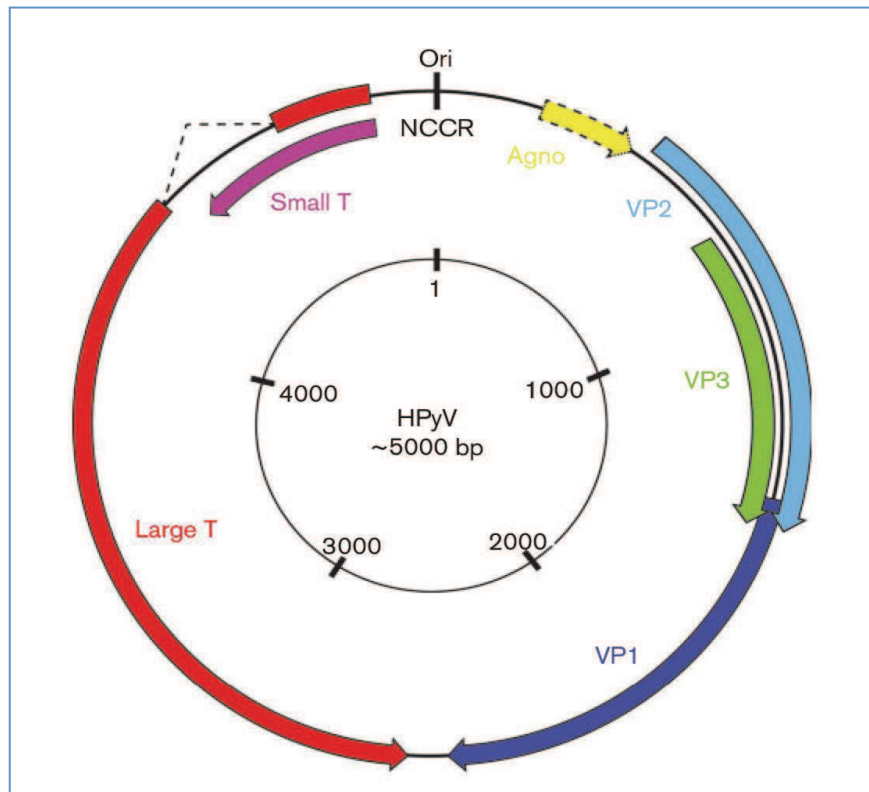


Figure 9 : Représentation schématique du génome d'un polyomavirus humain

Chaque couleur correspond à la séquence d'une protéine et l'ensemble forme un ADN circulaire bicaténaire. La transcription s'effectue dans le sens anti-horaire pour la région codante précoce, et dans le sens horaire pour la région codante tardive. (Feltkamp et al., 2013)

Les différents antigènes T partagent tous la même extrémité N-terminale (environ 75 à 80 acides aminés) constituée par le domaine J. Elle correspond au premier exon de l'AgT (Figure 10).

2.1.1.1) Le grand antigène T (AgT)

Il s'agit d'une phosphoprotéine nucléaire multifonctionnelle, jouant un rôle spécifique dans l'initiation de la réplication de l'ADN viral, dans l'assemblage des virions, dans la progression du cycle cellulaire et dans l'initiation de processus tumoraux.³⁷

Cette phosphoprotéine est constituée de six sous-unités (hexamères) catalytiques ayant des capacités de liaison à de nombreuses protéines cellulaires régulatrices :

- Le domaine J, qui peut se lier à la protéine de choc thermique Hsc70 et mimer l'activité d'une protéine chaperone. Il entraîne alors l'action du facteur de transcription E2F, impliqué dans la progression du cycle cellulaire.

- Le motif LXCXE, qui peut se lier directement à différentes protéines cellulaires suppressives de tumeur comme la protéine associée au retinoblastome (pRb). Ceci permet de libérer le facteur de transcription E2F.
- Le domaine Thréonine-Proline-Proline-Lysine et le domaine Nuclear-Localization-Sequence, qui permettent la migration vers le noyau.
- Le motif Origin DNA-Binding-Domain (OBD), qui joue un rôle primordial dans l'initiation de la réplication de l'ADN viral. L'AgT peut reconnaître la séquence GAGGC présente au niveau du site *ORI*, et recruter des facteurs de réplication cellulaires.
- Le motif hélicase-ATPase, qui initie la réplication virale. Il est aussi capable de se lier à la protéine régulatrice p53, pour l'empêcher d'activer la transcription de gènes cibles.
- Le domaine Host Range-Adenovirus Helper (HR-AH), qui possède un résidu thréonine. Il entre en compétition avec des cyclines cellulaires (cycline E1 et MYC) vis-à-vis de protéines phosphorylatrices. Cela provoque l'accumulation de ces cyclines cellulaires sous formes actives non phosphorylées, à l'origine d'une prolifération cellulaire non contrôlée.³⁸

2.1.1.2) Le petit antigène T (agT)

Il se compose d'un domaine J identique à celui de l'AgT, suivi d'une région unique contenant deux domaines en doigt de zinc qui ont la capacité de moduler l'activité de la phosphatase cellulaire 2A.³⁹ En se liant à la phosphatase cellulaire 2A, il inhibe son activité et permet l'activation de la voie Akt/m-TOR impliquée dans la survie cellulaire.⁴⁰

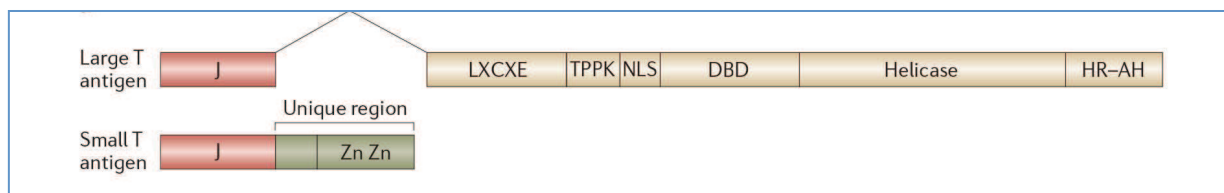


Figure 10 : Représentation de la structure des deux antigènes T
(DeCaprio et Garcea, 2013)⁴¹

2.1.1.3) Le micro ARN (miARN)

Certains polyomavirus humains (BKPyV, JCpyV, MCPyV) codent pour des micro ARN (miARN). Les miARN sont des ARN de petite taille (environ 22 nucléotides), qui ne codent pour aucune protéine. Ils ont la capacité de réguler directement l'expression de certains gènes, notamment en activant la dégradation des ARNm cibles.⁴²

La séquence promoteur des miARN de polyomavirus se situerait au niveau de la région tardive, et leur synthèse est postérieure à celle de l'AgT au cours du cycle. Le miARN a la capacité de cliver l'ARNm précoce à l'origine de la synthèse de l'AgT, ce qui réduit ainsi le niveau d'expression de l'AgT. D'après des travaux récents, les formes réarrangées du BKPyV sont caractérisées par une faible expression du miARN et une expression à haut niveau de l'AgT. A l'inverse, dans les formes archétypes, le niveau d'expression du miARN serait élevé, aboutissant à une répression de l'expression de l'AgT. Ce mécanisme pourrait avoir une implication dans le phénomène de persistance des polyomavirus.⁴³

2.1.2) La région codante tardive

La transcription des gènes de la région tardive a lieu dans le sens opposé à celle des gènes précoces. Elle entraîne la synthèse de la protéine de capsid majeure : VP1, et des protéines de capsid mineures : VP2 et VP3.

Outre la particule virale classique décrite précédemment, il peut se former, *in vivo* et *in vitro*, des pseudoparticules virales ou VLP non infectantes constituées de protéines VP1 auto-assemblées.⁴⁴ De plus, la région codante tardive de certains polyomavirus (BKPyV et JCpyV notamment) comprend un gène qui code pour une agnoprotéine : petite protéine dont la fonction est mal connue.

2.2) La région contrôle non codante (RCNC)

La région contrôle non codante a une taille d'environ 400 pb. Elle est essentiellement constituée de séquences répétées réparties en cinq blocs.⁴⁵ Par exemple, pour le BKPyV, elles se nomment O,P,Q,R,S (Figure 11) :

- la région O, plutôt conservée, contient le site d'origine de réplication (*ORI*) des régions précoce et tardive, le site du promoteur de la région précoce, et des sites de fixation de différents facteurs de transcription,

- les régions P, Q, R, S comportent le site du promoteur de la région tardive et des sites de fixation pour des facteurs transcriptionnels (Sp1, AP-1, le récepteur aux glucocorticoïdes, le récepteur aux estrogènes...).

La région RCNC peut être le site de modifications de séquence telles que des délétions, des répétitions ou des réarrangements de groupes entiers de nucléotides.⁴⁶ Les termes de souches archétypes (génotype sauvage) et de souches réarrangées sont utilisés. Dans le contexte des infections à BKPyV en transplantation rénale, ces souches réarrangées ont une capacité répliquative augmentée *in vitro* et sont associées *in vivo* à des charges virales plasmatiques plus élevées et des lésions histologiques plus sévères que les formes archétypes.⁴⁷ L'existence de formes réarrangées a également été décrite pour le JCPyV, et elles semblent également associées à une pathogénicité augmentée.

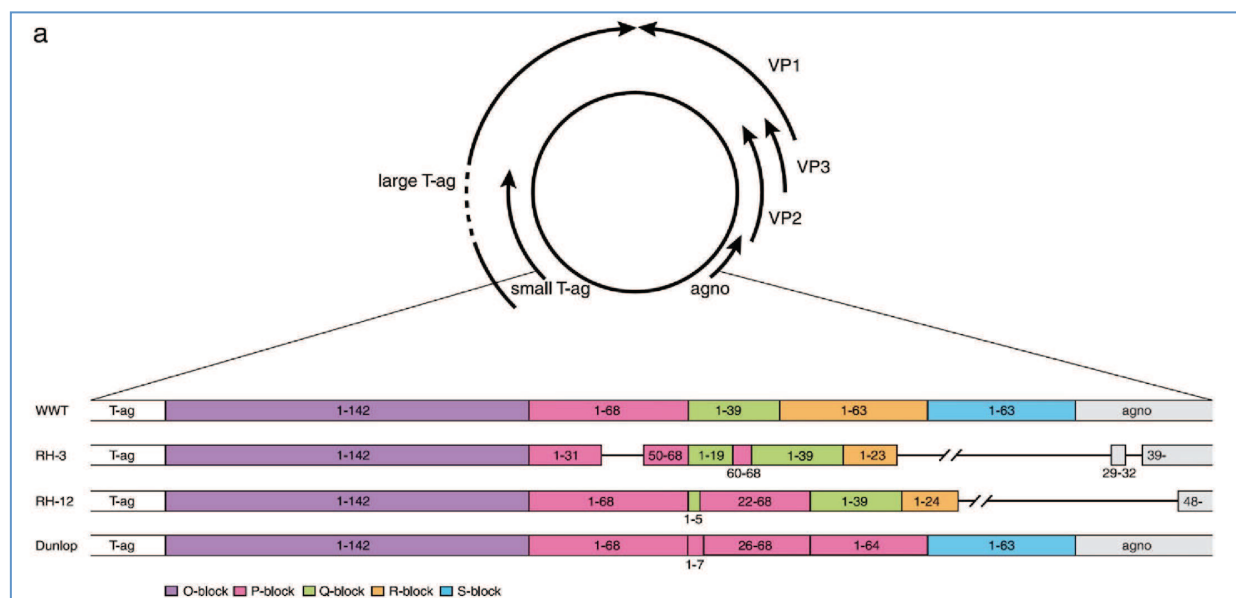


Figure 11 : Schéma de l'organisation de la Région Contrôle Non Codante de quatre souches de BKPyV

(Myhre et al., 2010)⁴⁸

3) Cycle de multiplication viral

L'entrée du virion dans la cellule se fait généralement par fixation de la protéine majoritaire de capsid VP1 sur des récepteurs et co-récepteurs spécifiques de type gangliosides, qui comportent des résidus d'acide sialique. Par exemple, la protéine VP1 du BKPyV interagit avec les gangliosides GD1b et GT1b,⁴⁹ le JCPyV se fixe sur les récepteurs sérotoninergiques 5HT_{2A}.⁵⁰

Les particules virales sont ensuite internalisées par endocytose. Le devenir des vésicules d'endocytose est variable en fonction du type de virus. Par exemple, le BKPyV utilise la voie d'endocytose médiée par les cavéolines,⁵¹ alors que l'entrée dans la cellule du JCPyV s'effectue via des vésicules d'endocytose clathrine-dépendantes.⁵²

L'abaissement du pH dans la vésicule d'endocytose semble constant : il permet la décapsidation. Les particules virales transitent via les microtubules du réticulum endoplasmique pour arriver au niveau des pores nucléaires. L'ADN circulaire libéré au sein du noyau est ensuite pris en charge par la machinerie cellulaire. Après transcription de la région précoce amenant à la synthèse d'AgT, la réplication de l'ADN des polyomavirus est initiée lorsque deux motifs OBD de deux molécules d'AgT se lient via le motif LXCXE au site *ORI* de la région RCNC (Pour le SV40, le site *ORI* est entouré de quatre motifs GAGGC). Grâce à l'activité ATPase intrinsèque de l'AgT, ils ont la capacité de s'assembler pour former un double hexamère d'AgT : chaque hexamère est réparti de part et d'autre des motifs palindromiques centraux du site *ORI*.

L'état de phosphorylation des AgT est capital. En présence d'ADP, l'activation du complexe de pré-réplication (formé par les deux hexamères d'AgT) ne peut se faire que si les sérines en position 120 et 123 se trouvent sous forme non phosphorylée et que la thréonine en position 124 est monophosphorylée. Après activation, le complexe de pré-réplication se scinde en deux. Ce changement de conformation entraîne l'activation des domaines hélicase-ATPases qui initient le recrutement de protéines de réplication cellulaires (Protéine A de réplication, ADN polymérase α -primase, Topoisomérase I). Les deux hexamères associés aux protéines de réplication cellulaires fonctionnent alors comme deux hélicases, et initient la réplication dans le sens horaire et dans le sens anti-horaire.⁵³ La transcription de la région tardive se déroule de façon concomitante à la réplication.

L'assemblage des protéines structurales VP1, VP2 et VP3 s'effectue dans le noyau et précède l'encapsidation des ADN circulaires doubles brins néosynthétisés.⁵⁴

De façon simplifiée, ce cycle cellulaire complet se déroule au sein des cellules permissives, ce qui entraîne une production lytique de virions. C'est par exemple le cas de la multiplication du JCPyV au sein des oligodendrocytes. En revanche en cas d'infection de cellules non permissives, le cycle cellulaire n'est pas complet. Seuls les protéines précoces sont produites, ce qui peut entraîner la cellule vers la cancérisation (Figure 12).

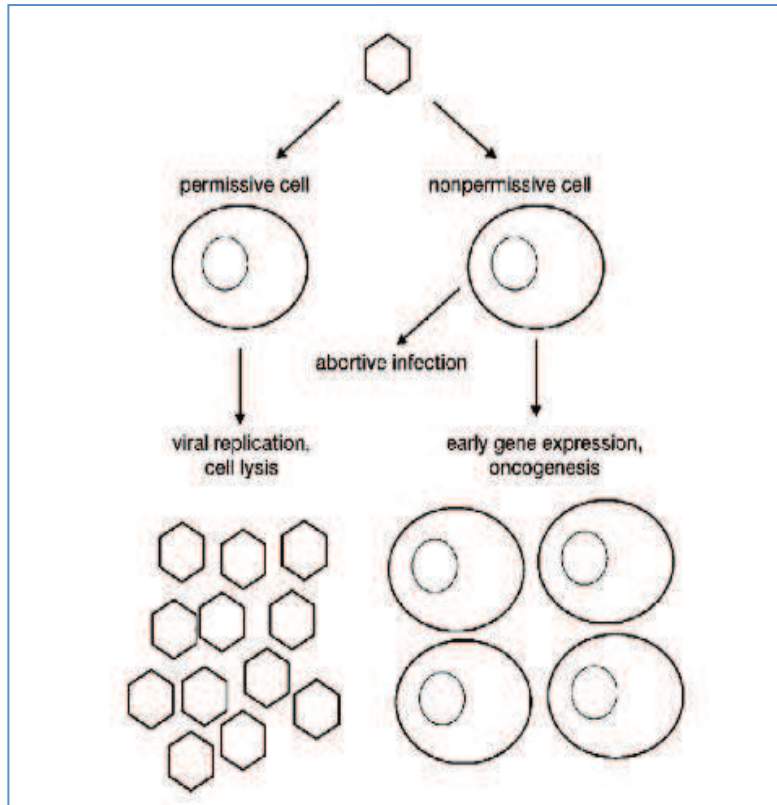


Figure 12 : Schéma du déroulement du cycle cellulaire dans une cellule permissive et dans une cellule non permissive (Khalili et Stoner, 2004)

III – Epidémiologie

1) Modes de transmission

Le mode de transmission des polyomavirus humains n'est pas clairement élucidé. En ce qui concerne le BKPyV, les données de la littérature sont en faveur d'une contamination dans la petite enfance, en raison du taux de séroconversion élevé chez les jeunes enfants. Renforçant cette idée, des cas d'infections à BKPyV ont été décrits en pédiatrie.^{55,56}

Une des voies de transmission des polyomavirus pourrait être la voie aérienne. Le BKPyV et le JCPyV ont été mis en évidence au niveau amygdalien, chez des enfants sains et chez des enfants présentant des signes d'infections respiratoires.^{56,57} Pour rappel, le KIPyV et le WUPyV ont été découverts par PCR à partir d'échantillons respiratoires. On imagine dès lors assez facilement la possibilité d'une transmission interhumaine via les sécrétions respiratoires. D'autres voies de transmission ont été décrites ou suggérées : l'alimentation,^{58,59} les transfusions sanguines,⁶⁰ les transplantations d'organes,^{61,62} ou la voie transplacentaire.⁶³ La présence de polyomavirus humains (BKPyV et JCPyV) a été détectée dans des eaux usées, confirmant leur grande résistance dans le milieu extérieur, ce qui peut favoriser leur transmission.⁶⁴

2) Séroprévalence

In vitro, les protéines de capsid VP1 ont la particularité de pouvoir s'auto-assembler pour constituer des VLP.⁴⁴ Leur expression dans des systèmes de baculovirus permet la mise au point de tests sérologiques de type Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).⁶⁵ La majorité des test ELISA détectent les anticorps neutralisants anti-VP1. Les protéines VP1 des différents polyomavirus partagent certains épitopes qui peuvent entraîner la détection d'un signal non spécifique. Les tests par compétition, avec une étape d'incubation préalable, limitent ces réactions croisées.

Dès 1973, deux ans seulement après la découverte du BKPyV et du JCPyV, Gardner et al. réalisent des tests sérologiques (inhibition d'hémagglutination, fixation du complément) sur 500 sérums de patients sains, et estiment la séroprévalence du BKPyV dans la population générale entre 52 et 64 %.⁶⁶

Depuis, de nombreuses études de séroprévalence ont été conduites sur l'ensemble des polyomavirus humains. Elles ont permis de mettre en évidence qu'une large proportion de la population a été exposée ou est exposée à un ou plusieurs polyomavirus humains.

Il existe deux profils de répartition dans la population générale (Figure 13) :

- des virus pour lesquels la séroprévalence observée à l'âge de 10-15 ans est équivalente à celle retrouvée chez l'adulte. C'est le cas pour la majorité des polyomavirus humains (BKPyV, KIPyV, WUPyV, MCPyV, HPyV6, TSPyV, MWPyV, STLPyV, HPyV12),
- des virus pour lesquels la séroprévalence a tendance à augmenter avec l'âge (JCPyV, HPyV7 et HPyV9).

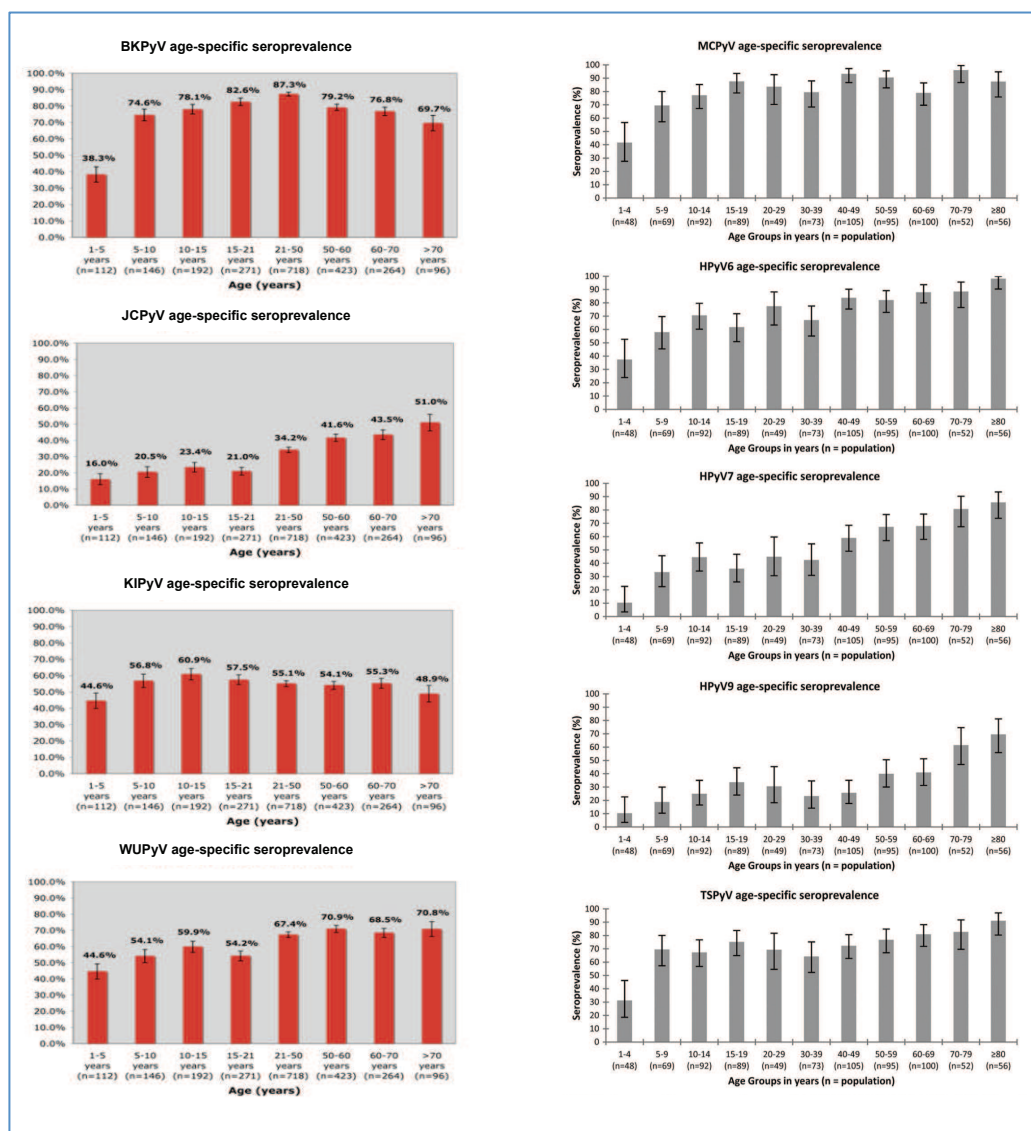


Figure 13 : Séroprévalence des polyomavirus humains dans la population générale
(D'après Kean et al., 2009 et Nicol et al., 2013)^{67,68}

Ne figurant pas sur ce graphique, la séroprévalence du MWPvV est estimée entre 31 et 47%,⁶⁹ et celle du STLPvV entre 68 et 95%.⁷⁰ La séroprévalence de l'HPvV12 est d'environ 27 à 33%.³¹ Il n'existe pas encore de chiffres de séroprévalence pour le NJPyV, découvert en 2014.

3) Répartition géographique

La répartition géographique des polyomavirus humains semble cosmopolite. En effet, de multiples travaux ont montré leur large distribution sur les cinq continents et dans de nombreux pays. Cependant, il semble exister des différences de répartition géographique pour les polyomavirus lorsque plusieurs génotypes ont été décrits, comme c'est le cas pour le BKPvV.

IV – Pathogénicité virale, aspects cliniques et maladies associées

Les polyomavirus humains sont ubiquitaires. La contamination ou primo-infection est très souvent asymptomatique. Elle survient généralement tôt dans l'enfance, puisque la séroprévalence augmente dès le plus jeune âge. Après la primoinfection, les polyomavirus persistent dans des sites privilégiés et restent silencieux. La recherche d'ADN viral de BKPyV ou de JCPyV à partir de plasmas de donneurs de sang n'est positive que chez 10 à 30% des sujets séropositifs pour ces mêmes virus.⁷¹ Une réplication virale n'est donc détectable que chez un petit nombre de patients sains. Des sites tels que le tractus urinaire, les lymphocytes^{60,72,73} ou le cerveau⁷⁴ sont privilégiés par les polyomavirus pour établir leur persistance. Ils sont à l'origine de réactivations, préférentiellement dans un contexte d'immunodépression, qui donnent lieu à de véritables atteintes cliniques. La grande majorité des cas d'infections à polyomavirus sont décrits dans des circonstances d'immunodépression acquise. Il s'agit le plus souvent de patients atteints d'hémopathies malignes, d'infections par le VIH ou de patients traités par immunosuppresseurs ou par biothérapies ciblées.

1) Le polyomavirus BK

Chez l'immunocompétent, il existe une élimination asymptomatique de BKPyV dans les urines (environ 10 à 15% de la population).⁷⁵ Il est essentiellement à l'origine d'atteintes rénales du fait de son tropisme pour l'épithélium du tractus génito-urinaire. L'examen cytologique des urines peut permettre l'observation de cellules Decoy en cas d'atteinte à BKPyV. Toutefois, leur présence n'est pas pathognomonique puisqu'elles s'observent également en cas d'infection à ADV ou à CMV.

1.1) La néphropathie à polyomavirus BK (NBKV)

La NBKV est quasi-exclusivement décrite chez les patients transplantés rénaux, avec une prévalence variant entre 1 et 10%.^{76,77} Elle se déclare habituellement entre trois et douze mois après la transplantation par l'apparition de signes cliniques non spécifiques. Le suivi systématique des patients transplantés rénaux par PCR BKPyV dans le sang et les urines permet généralement un diagnostic précoce, parfois avant l'élévation de la créatininémie. Un contexte de néphrite interstitielle inflammatoire, ou de sténose

urétérale est souvent retrouvé en cas de survenue de NBKV. Le diagnostic de certitude est histologique et nécessite la réalisation d'une biopsie du greffon. C'est une pathologie grave chez le transplanté rénal car elle peut entraîner la perte du greffon.⁷⁸

La NBKV survient principalement au moment où le niveau d'immunosuppression est le plus élevé. C'est dans les premiers mois après la transplantation, lorsque le patient reçoit plusieurs molécules associant en général un inhibiteur de calcineurines (tacrolimus ou ciclosporine), un inhibiteur de prolifération cellulaire (mycophénolate mofétil) et des corticostéroïdes que le risque est le plus élevé. Une charge virale supérieure à 10^4 copies/mL sur sang EDTA doit faire évoquer une NBKV et est une indication à baisser l'immunosuppression si elle persiste.

1.2) La cystite hémorragique à polyomavirus BK

La cystite hémorragique à BKPyV survient chez 10 à 25% des patients greffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH), dans les deux semaines après la greffe.⁷⁹ Cliniquement, on observe des signes fonctionnels urinaires (dysurie, obstruction urinaire,...) associés à des douleurs pubiennes et à une hématurie. Elle survient tardivement, contrairement à la cystite hémorragique induite par l'acroléine qui apparaît dans les 72 heures après une cure de cyclophosphamide. Près de 50% des patients greffés de CSH éliminent du BKPyV dans leurs urines en dehors de tout contexte de cystite hémorragique à BKPyV.⁸⁰ Le diagnostic virologique de l'infection à BKPyV après allogreffe de CSH s'appuie sur la quantification de l'ADN du BKPyV dans les urines et dans le sang. Des charges virales supérieures à 10^9 copies/mL dans les urines et supérieures à 10^4 copies/mL dans le sang sont prédictives de l'évolution vers une cystite hémorragique. Parmi les facteurs de risque de survenue de cystite hémorragique à BKPyV, on retrouve notamment le statut immunitaire prégreffe ou le type de greffe.

1.3) Autres types d'atteintes cliniques liées au polyomavirus BK

De rares cas d'autres types d'atteintes (pulmonaires, hépatiques, oculaires, voire des cas d'infections disséminées) ont été décrits chez des patients sévèrement immunodéprimés.⁸¹

2) Le JC polyomavirus

Le JCPyV est responsable de la LEMP. Il s'agit d'une atteinte irréversible de la substance blanche cérébrale liée à la réplication cytotytique du JCPyV au décours d'une réactivation, au niveau des astrocytes et des oligodendrocytes. Les signes cliniques sont liés à la localisation des territoires de démyélinisation. Il peut s'agir de troubles sensoriels, de dysarthrie, de troubles moteurs, d'aphasie, de troubles cognitifs, dont l'évolution s'effectue généralement sur plusieurs semaines.⁸²

Avant l'ère des trithérapies antirétrovirales, des cas de LEMP étaient fréquemment décrits chez les patients infectés par le VIH. Des cas de LEMP sont aussi observés chez des patients atteints d'hémopathies malignes, de sarcoïdose, ou plus récemment chez des patients recevant des traitements immunomodulateurs (natalizumab, efalizumab, infliximab, rituximab...).⁸³

Le natalizumab, indiqué dans la prise en charge de la sclérose en plaque, a fait l'objet de plusieurs mises en garde de la part de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament. Cet anticorps monoclonal humanisé est un anti- $\alpha 4$ -intégrine (CD49b). Ces intégrines exprimées à la surface des leucocytes, jouent le rôle de molécules d'adhésion et permettent leur attachement à la surface de l'endothélium vasculaire. Le natalizumab empêche la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium vers les parenchymes inflammatoires. Une des hypothèses expliquant l'augmentation du nombre de cas de LEMP observés sous natalizumab (chez des patients ayant des anticorps anti-JCPyV), pourrait être son effet sur les cellules CD34+. Le natalizumab favorise la migration des cellules CD34+ depuis le compartiment médullaire vers le sang périphérique. Une fois dans le sang périphérique, elles sont capables de se différencier, ce qui provoque une élévation chronique du nombre de cellules B, T et NK durant toute la période de traitement. Comme le JCPyV persiste dans les cellules souches hématopoïétiques et est transporté par les lymphocytes B, cela pourrait favoriser sa dissémination jusqu'au cerveau.⁸⁴ D'autres biothérapies comme l'efalizumab (indiqué dans le psoriasis), ou le rituximab (anti-CD20) ont également été incriminées.

Le diagnostic de LEMP peut être évoqué sur l'aspect typique de l'IRM cérébrale (hyposignal en T1 et hypersignal en T2).⁸⁵ L'examen anatomopathologique d'une biopsie cérébrale associé à la réalisation d'une PCR JCPyV sur le liquide céphalo-rachidien ou sur une biopsie de cerveau permet le plus souvent d'établir le diagnostic de LEMP avec certitude.

3) Le Karolinska Institute polyomavirus

Le KIPyV est essentiellement détecté à partir de prélèvements respiratoires. En Suède, la prévalence mesurée lors de sa découverte est de 1% (six prélèvements positifs sur 637 aspirations nasopharyngées).¹⁶ D'autres études obtiennent une prévalence d'environ 2,6% chez des patients symptomatiques. Il est préférentiellement détecté chez des enfants de moins de cinq ans (80% des échantillons positifs).^{86,87}

Lorsqu'il est détecté chez des patients symptomatiques, on retrouve le plus souvent de la fièvre, une toux persistante, une détresse respiratoire, voire un tableau de pneumonie. Il n'existe pas de signes cliniques spécifiques.

En dehors de tout contexte d'infection respiratoire, il est mis en évidence à partir d'échantillons de plasma EDTA chez des donneurs de sang,⁸⁸ ou à partir d'échantillons de selles dans des contextes de gastro-entérites aiguës.⁸⁹ Chez des patients immunodéprimés, il est détecté dans des urines de patients transplantés rénaux, et à partir de prélèvements sanguins (patients transplantés rénaux ou atteints par le VIH) avec une prévalence de 1 à 7,1%.^{88,90}

Peu d'éléments de physiopathologie sont connus. En 2014, une technique de détection histochimique de la protéine VP1 a été mise au point. C'est la première fois que le virus est mis en évidence autrement que par PCR. Un anticorps monoclonal spécifique de la protéine VP1 du KIPyV a permis sa détection au niveau de macrophages alvéolaires et au niveau de la pulpe blanche de la rate de deux patients sévèrement immunodéprimés.⁹¹

Le KIPyV parvient à être détecté en l'absence de symptômes cliniques, chez des patients immunocompétents et immunodéprimés. Toutefois, il est régulièrement rencontré chez l'enfant de moins de cinq ans atteint de symptômes respiratoires. On peut considérer que le KIPyV est un pathogène respiratoire, principalement chez l'enfant, bien qu'il soit fréquemment détecté en association avec un autre virus respiratoire.

4) Le Washington University polyomavirus

La détection initiale du WUPyV a été effectuée à partir d'une aspiration nasopharyngée chez un enfant Australien de trois ans présentant un tableau de pneumonie.¹⁷ Une étude Australienne réalisée en 2008 retrouve une prévalence de 4,5% chez des patients hospitalisés présentant des signes d'infection respiratoires.⁹² Quatre-vingt-treize pour

cent des WUPyV détectés proviennent de prélèvements respiratoires d'enfants de moins de cinq ans. Chez des patients immunocompétents, il est aussi mis en évidence à partir de prélèvements sanguins ou à partir de prélèvements de selles chez des enfants.⁸⁹ Le WUPyV est également détecté par PCR à partir de prélèvements sanguins, de prélèvements d'urines et de prélèvements de gorge, chez des patients transplantés rénaux.⁹⁰

Il apparaît comme un virus potentiellement à l'origine d'infections respiratoires chez l'enfant. Cependant, il est détecté en association avec un autre virus respiratoire dans 68 à 100% des cas.¹⁷ Il est difficile de dire s'il s'agit d'un pathogène opportuniste, ou s'il fait partie de la flore endogène respiratoire. Dans ce cas, il pourrait prédisposer ou faciliter une infection secondaire par un autre virus.

5) Le Merkel Cell polyomavirus

Le MCPyV est le premier polyomavirus dont le caractère oncogène est clairement démontré chez l'homme. Décrit depuis 1972, le Carcinome Cellulaire de Merkel (CCM) semble d'origine multifactorielle même si sa physiopathologie n'est pas clairement élucidée. Une hypothèse pouvant expliquer sa survenue est l'hypersécrétion de granules, contenant des marqueurs neuroendocriniens, par des cellules mécanoréceptrices appelées cellules de Merkel.

Il s'agit d'une tumeur cutanée rare, mais agressive, qui s'observe préférentiellement chez les patients âgés et/ou immunodéprimés (patients transplantés, patients ayant une exposition chronique à l'arsenic et patients infectés par le VIH notamment). La surexposition au soleil, la photothérapie ou l'exposition aux rayons ultra-violets constituent des facteurs de risque supplémentaires de développement de CCM.

L'incidence est estimée à environ 0.32 cas par an pour 100000 habitants aux Etats Unis.⁹³ Les sujets les plus souvent atteints sont les hommes d'âge supérieur à 65 ans et de peau blanche. Cliniquement, il s'agit le plus souvent d'une masse sous-cutanée non douloureuse de consistance nodulaire, avec un aspect superficiel rouge-violacé.

Le MCPyV est retrouvé dans 75 à 80% des CCM. On parle alors de CCM positif (présence du MCPyV) et de CCM négatif (absence du MCPyV). On peut donc supposer l'existence de deux formes de CCM sur le plan génétique, avec d'éventuelles différences en terme de pronostic et de prise en charge thérapeutique.

Lors de sa découverte en 2008, le génome du MCPyV est retrouvé intégré dans des cellules tumorales cutanées de patients ayant un CCM. L'analyse de ces séquences de MCPyV montre l'existence de multiples mutations au niveau du gène codant pour le grand antigène T (AgT) : on parle de «mutations signatures». Elles sont responsables de la formation de codons STOP, à l'origine de la synthèse d'un AgT tronqué. La disparition du domaine C-terminal qui porte l'activité hélicase, conduit à la perte de la capacité répliquative du virus. Cependant, l'AgT tronqué conserve sa capacité de liaison à la protéine pRb. A l'inverse, des souches de MCPyV issues de cellules non tumorales (MCPyV détecté dans des cellules mononuclées du sang circulant ou dans des cellules intestinales) ne portent pas ces mutations spécifiques.⁹⁴

Via la voie de la mammalian target of rapamycin, ou protéine m-TOR, le petit antigène T (agT) favorise l'hyperphosphorylation du facteur de transcription 4E-BP1 (4E-Binding-protein-1). Ce dernier entraîne l'hyperexpression d'un second facteur de transcription, l'eIF4E (eukaryotic-translation-initiation-factor-4E) promoteur de la mitogenèse et de la différenciation cellulaire.

In vitro, la croissance de lignées cellulaires infectées par des MCPyV déficients en agT est ralentie. L'agT est nécessaire pour la prolifération tumorale et doit être considéré comme une oncoprotéine.⁹⁵

6) Le polyomavirus associé à la Trichodysplasie spinuleuse

Tour à tour dénommée «pilomatrix dysplasia»,⁹⁶ «cyclosporine induced folliculodystrophy»,⁹⁷ «viral associated trichodysplasia of immunosuppression»,⁹⁸ la Trichodysplasie spinuleuse était initialement attribuée à la ciclosporine, car rencontrée chez des patients transplantés, toujours traités par ciclosporine en prévention du rejet de greffe. Pour rappel, la découverte du polyomavirus associé à la Trichodysplasie spinuleuse (TSPyV) date de 2010.²⁴

Il s'agit d'une atteinte cutanée de type folliculaire, caractérisée par l'apparition de papules et de spicules localisées préférentiellement au niveau du visage (oreilles, nez, front), plus rarement au niveau du tronc ou des extrémités. Elles sont parfois associées à un faciès léonin et à une alopécie des sourcils. Vingt-et-un cas sont répertoriés dans la littérature. Ce sont systématiquement des patients immunodéprimés, qui ont un traitement immunosuppresseur après une transplantation (cœur, rein, rein-pancréas, poumons), ou des patients atteints d'hémopathies (leucémie lymphoïde chronique,

lymphome non hodgkinien). Les lésions cutanées peuvent apparaître entre quelques mois et plusieurs dizaines d'années après l'installation de l'immunodépression.^{23,99} L'âge de survenue est donc très variable, allant de 7 à 70 ans. Sur le plan histologique, les follicules pileux sont distendus et anormalement matures. La gaine interne de la racine des follicules contient un grand nombre de cellules renfermant des quantités excessives de trichohyaline. La réalisation de biopsies cutanées à partir de spicules permet l'amplification du TSPyV par PCR et la mise en évidence de particules virales en microscopie électronique.^{24,98}

7) Les autres polyomavirus humains

Le caractère pathogène de ces sept autres polyomavirus, dont la découverte est postérieure à 2010, n'est pas clairement établi.

Ils ont été découverts à partir d'échantillons cutanés, de prélèvements de selles ou d'urines prélevés chez des individus sains et/ou immunodéprimés et sont plus ou moins susceptibles de faire partie du microbiote humain.

V – Le polyomavirus humain 9

La découverte du polyomavirus humain 9 date de 2011. Son génome a une structure identique à celle des autres polyomavirus (Figure 14) et il est très proche du LPyV (76% d'homologie sur l'ensemble du génome). La détection d'anticorps anti-LPyV chez l'homme s'explique par une réactivité croisée avec l'HPyV9 (homologie de 87% entre les deux protéines VP1).

Pour rappel, le LPyV a été découvert en 1979 à partir d'une lignée de cellules lymphoblastiques B du grand singe vert d'Afrique¹⁰⁰ et présente, *in vivo*, une haute affinité pour les lymphocytes B humains.¹⁰¹

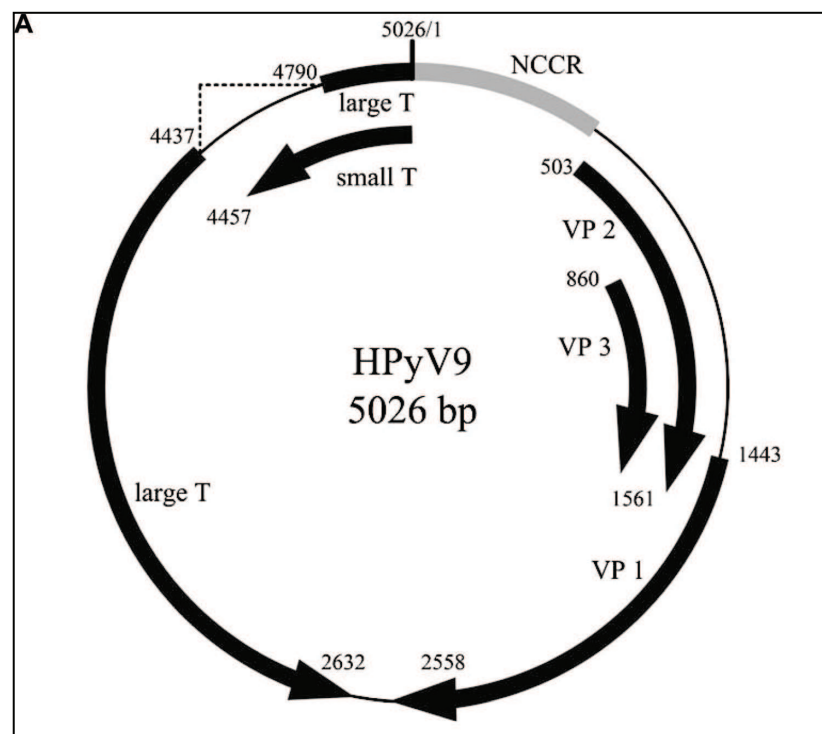


Figure 14 : Schéma du génome de l'HPyV9, d'après la séquence de référence HQ696595.1
(Scuda et al., 2011)

Lors de sa découverte, Scuda et al. détectent le génome de l'HPyV9 à partir d'échantillons sanguins (sang total, plasma, sérum), et à partir d'un échantillon d'urine d'un patient transplanté rénal (une urine positive sur les 38 échantillons prélevés chez des patients transplantés rénaux).

Depuis sa découverte en 2011, différents travaux ont permis d'en savoir plus sur l'HPyV9.

En 2011, une équipe française réalise une amplification par méthode RCA avec des amorces randomisées à partir d'écouvillons cutanés. Chez un patient atteint de CCM, ils parviennent à obtenir un génome de 5028 pb qu'ils nomment l'Institut Pasteur polyomavirus (IPPyV). Seuls deux nucléotides diffèrent de la séquence de l'HPyV9 publiée par Scuda et al. précédemment. L'IPPyV est un variant de l'HPyV9. La mise au point d'une PCR nichée spécifique permet d'amplifier son génome à partir d'un écouvillon cutané prélevé vingt mois plus tard chez le même patient et chez un autre patient ayant lui aussi un CCM.¹⁰²

En 2012, Csoma et al. recherchent par PCR quatre polyomavirus humains (BKPyV, KIPyV, WUPyV, HPyV9) chez 100 patientes enceintes et 100 patientes non enceintes du même âge, pour étudier le risque de virémie à polyomavirus lié à l'immunodépression physiologique de la grossesse. Une PCR nichée spécifique de l'HPyV9 leur permet d'amplifier son génome à partir de plasmas EDTA, d'urines et d'écouvillons de gorge. Ils obtiennent des résultats comparables dans les deux populations, avec une prévalence entre 2 et 6%. On imagine qu'il s'agit de faibles charges virales puisqu'une PCR nichée a été nécessaire pour le détecter, et qu'aucune donnée quantitative n'est disponible. On ne dispose pas d'information précise sur le statut immunitaire des patientes non enceintes, mais il s'agirait de la première mise en évidence de l'HPyV9 à partir d'échantillons biologiques de patients non immunodéprimés.¹⁰³

En 2014, Lednicky et al. réussissent à amplifier le génome de l'HPyV9 par méthode de type RCA à partir de cellules mononuclées du sang périphérique d'un patient séropositif pour le VIH.¹⁰⁴ Ils parviennent à mettre en évidence quelques différences au niveau de la région RCNC par comparaison à la séquence initialement décrite par Scuda et al. (présence de trois sites de fixation du facteur de transcription sp1 en plus, et d'un site de fixation pour la protéine AML1 en moins).

En 2014, une équipe Hollandaise recherche l'HPyV9 chez des patients transplantés rénaux. Entre 2002 et 2004, ils suivent une cohorte de 101 patients Hollandais, dans les 18 premiers mois après leur transplantation rénale. Ils recherchent le génome de l'HPyV9 sur des sérums prélevés tous les trois mois, entre 0 et 18 mois après transplantation, avec une PCR spécifique maison.¹⁰⁵

Leur travail permet de souligner deux points intéressants :

- 20,8% des patients (soit 21 patients sur 101) ont une PCR HPyV9 positive sur sérum contre aucun donneur sain dans la population contrôle.
- la plus grande proportion de patients ayant une PCR HPyV9 positive sur sérum est observée entre 3 et 9 mois après transplantation (Figure 15).

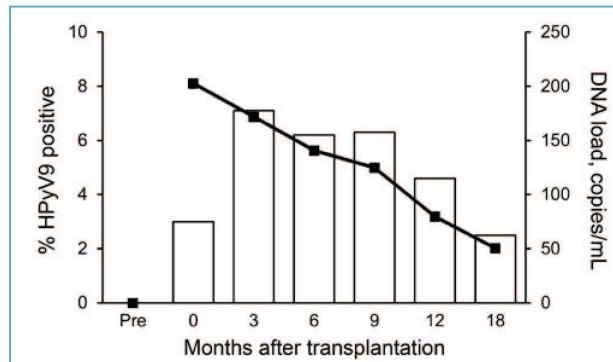


Figure 15 : Pourcentage de patients ayant une PCR HPyV9 positive sur sérum et charges virales exprimées en nombre de copies par mL de sérum, entre 0 et 18 mois après transplantation rénale (Van der Meijden et al., 2014)

Ils mesurent de très faibles valeurs de charges virales, comprises entre 50 et 200 copies/mL de sérum. De plus, ces charges virales décroissent rapidement et progressivement, depuis le moment de la transplantation et ce jusqu'à 18 mois après. Ces résultats témoignent de l'existence d'une réplication de l'HPyV9 chez les patients transplantés rénaux. De plus, ils montrent que l'HPyV9 est plus fréquemment détecté chez les patients positifs pour le BKPyV. En effet, 81,5% des sérums positifs pour l'HPyV9 sont également positifs pour le BKPyV (22 sérums sur 27). Et 95% des patients ayant une PCR HPyV9 positive sont virémiques pour le BKPyV (Figure 16).

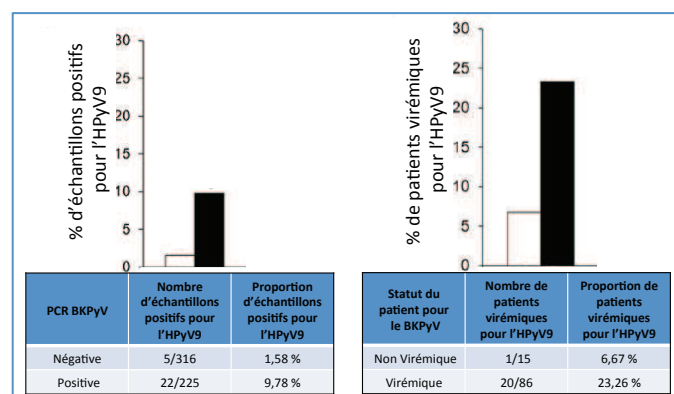


Figure 16 : Proportion de résultats positifs pour l'HPyV9 en fonction du statut vis à vis du BKPyV (D'après Van der Meijden et al., 2014)

OBJECTIFS

L'objectif de ce travail était de rechercher la présence d'HPyV9 dans des échantillons cliniques de patients transplantés de rein. La première partie du travail expérimental a consisté à mettre au point une PCR temps réel quantitative pour la détection et la quantification du génome de l'HPyV9. Nous avons comparé deux PCR dont les gènes cibles étaient soit l'AgT, soit le gène codant pour la protéine VP1. Dans un second temps, nous avons recherché la présence de génome d'HPyV9 dans des échantillons de sang et d'urine de patients transplantés de rein. Partant des données publiées récemment par Van der Meijden et al., nous avons sélectionné plus particulièrement des patients positifs pour le BKPyV.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I – Matériel

1) Patients

Au CHU de Nantes, tous les patients transplantés rénaux bénéficient d'un suivi virologique systématique des infections à BKPyV au cours des deux années post-greffe. Une recherche de BKPyV par PCR est réalisée dans le sang et les urines à un mois (M1), deux mois (M2), trois mois (M3), six mois (M6), neuf mois (M9), douze mois (M12) et 24 mois (M24) post-transplantation. Le suivi est rapproché tous les mois en cas de virurie élevée (supérieure à 10^7 copies/mL) ou de virémie.

Quatre-vingt-dix-neuf patients, transplantés entre octobre 2010 et novembre 2013 ont été sélectionnés pour ce travail. Une partie de ces patients fait partie d'une cohorte suivie pour le projet «Rôle de la réponse immune cellulaire spécifique dans le contrôle de l'infection à BKPyV». Dans une première étape du travail, les extraits d'ADN isolés à partir de prélèvements de sang total EDTA de 20 patients ont été étudiés. La recherche d'HPyV9 dans les urines a été élargie à un groupe plus important de 82 patients. Trois de ces patients ont été inclus dans les deux sous-études.

2) Prélèvements biologiques

Les prélèvements d'urines (échantillon des urines de 24 heures ou recueil d'une miction) et les prélèvements de sang total EDTA sont acheminés au laboratoire, en structure pré-PCR. Avant extraction, une fraction de l'urine est aliquotée et conservée à -20°C.

3) Amorces et sondes

Les amorces et les sondes synthétisées par Eurogentec® sont réceptionnées sous forme lyophilisée puis reconstituées avec de l'eau distillée à la concentration de 200 µM. Leur conservation s'effectue à -20°C après aliquotage.

3.1) Amorces et sondes spécifiques de l'HPyV9

Deux couples amorces/sonde ont été testées : l'un ciblant une portion du gène tardif codant pour la protéine VP1, l'autre ciblant une portion du gène précoce codant pour l'AgT.

3.1.1) Couple amorces/sonde pour amplifier le gène VP1

Pour amplifier cette séquence de 109 pb, le couple amorces/sonde sélectionné est celui publié par l'équipe de Van der Meijden et al. A son extrémité 5', la sonde est marquée par le fluorochrome FAM et par le quencher BHQ1 à son extrémité 3' (Tableau 1).

Tableau 1 : Séquences des amorces et de la sonde ciblant le gène VP1
Positions déterminées d'après la séquence de référence GenBank HQ696595.1

	Fournisseur	Séquence (5'→3')	Taille (pb)	T _m (°C)	Position
Amorce sens					
HPyV9-VP1-RG1	Eurogentec	CCTGTAAGCTCTCTCCTTA	19	56,0	2355-2373
Amorce antisens					
HPyV9-VP1-RG2	Eurogentec	CCTGATAAATTCTGACTTCTTC	22	44,1	2442-2463
Sonde					
HPyV9-VP1-RGS	Eurogentec	FAM-CTTGTCTCTGGTCTTATGCCTCA-BHQ1	24	50,6	2378-2401

3.1.2) Couple amorces/sonde pour amplifier le gène AgT

Pour cette PCR, les amorces et la sonde ont été dessinées à l'aide de l'outil de construction Primer Quest® du site Integrated DNA Technologies (IDT). Leurs séquences sont sélectionnées pour éviter la formation de boucles intracaténaïres et de dimères d'amorces. La sonde est marquée par le fluorochrome CY5 à son extrémité 5' et par le quencher BHQ2 à son extrémité 3' (Tableau 2).

Tableau 2 : Séquences des amorces et de la sonde ciblant le gène AgT
Positions déterminées d'après la séquence de référence GenBank HQ696595.1

	Fournisseur	Séquence (5'→3')	Taille (pb)	Tm (°C)	Position
Amorce sens					
HPyV9-LTAG-RG1	Eurogentec	GCCCAGGTTGAAGATGTTTG	20	60,0	3072-3091
Amorce antisens					
HPyV9-LTAG-RG2	Eurogentec	TTGAGTTAGGCTGTGCTATTGA	22	46,0	3140-3161
Sonde					
HPyV9-LTAG-RGS	Eurogentec	CY5-TCTGGCCCTTCACATCATCAAGCA-BHQ2	24	52,3	3102-3125

3.2) Amorces et sonde spécifiques de l'albumine

L'amplification d'une séquence de 141 pb du gène de l'albumine est réalisée au moyen de sonde et amorces spécifiques, d'après la technique publiée par Laurendeau et al.¹⁰⁶ L'utilisation de ce couple amorces/sonde est déjà validée au laboratoire, notamment pour la quantification du CMV et de l'EBV (Tableau 3).¹⁰⁷

Tableau 3 : Séquences des amorces et de la sonde ciblant le gène de l'albumine
Positions déterminées d'après la séquence de référence GenBank M12523.1
(Laurendeau et al., 1999)

	Fournisseur	Séquence (5'→3')	Taille (pb)	Tm (°C)	Position
Amorce sens					
ALB-RG1	Eurogentec	GCTGTCATCTCTTGTTGGGCTGT	22	68,0	16283-16304
Amorce antisens					
ALB-RG2	Eurogentec	AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT	22	50,0	16402-16423
Sonde					
ALB-RGS	Eurogentec	JOE-CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC-BHQ	26	80,0	16340-16365

4) Thermocycleur

L'appareil de PCR en temps réel utilisé est le Rotor-Gene Q (Qiagen®). Il possède six canaux de lecture qui permettent l'acquisition, au cours d'une réaction d'amplification de PCR, du signal de fluorescence émis par six fluorochromes distincts présents dans le mélange réactionnel. L'acquisition du signal lumineux s'effectue à chaque cycle tout au long de la réaction d'amplification (Figure 17).

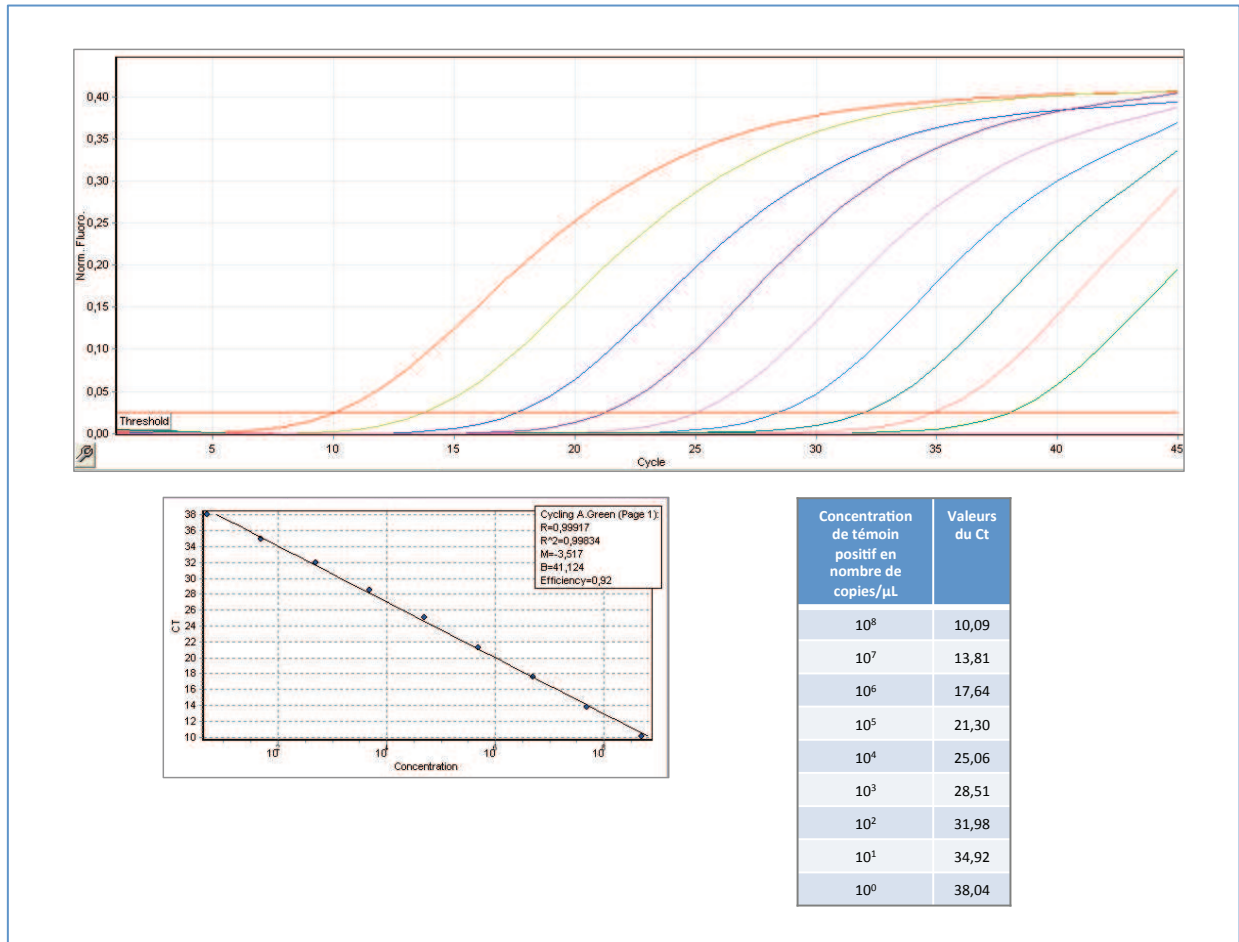


Figure 17 : Exemple de courbes réactionnelles obtenues sur le Rotor-Gene Q pour une gamme de témoin positif de raison dix (10^8 à 10^0 copies/ μ L)

Le threshold ou seuil de fluorescence est fixé à 0,025. Un cycle seuil ou Ct est ainsi déterminé pour chaque dilution, ce qui permet d'établir une droite d'étalonnage (Valeur mesurée du Ct en fonction de la concentration initiale du témoin positif).

5) Témoin positif

En l'absence d'échantillon biologique connu positif à HPyV9 à notre disposition, une séquence synthétique de 960 pb a été commandée (GeneArt® Strings DNA Fragments, INVITROGEN®)(Figure 18). Il s'agit de fragments d'ADN doubles brins construits à partir d'oligonucléotides de synthèse. Fourni sous forme lyophilisée, il est reconstitué avec de l'eau stérile pour obtenir une solution concentrée à 10^{10} copies/ μ L. Une gamme de dilution de dix en dix en tampon Tris EDTA est conservée à -20°C .

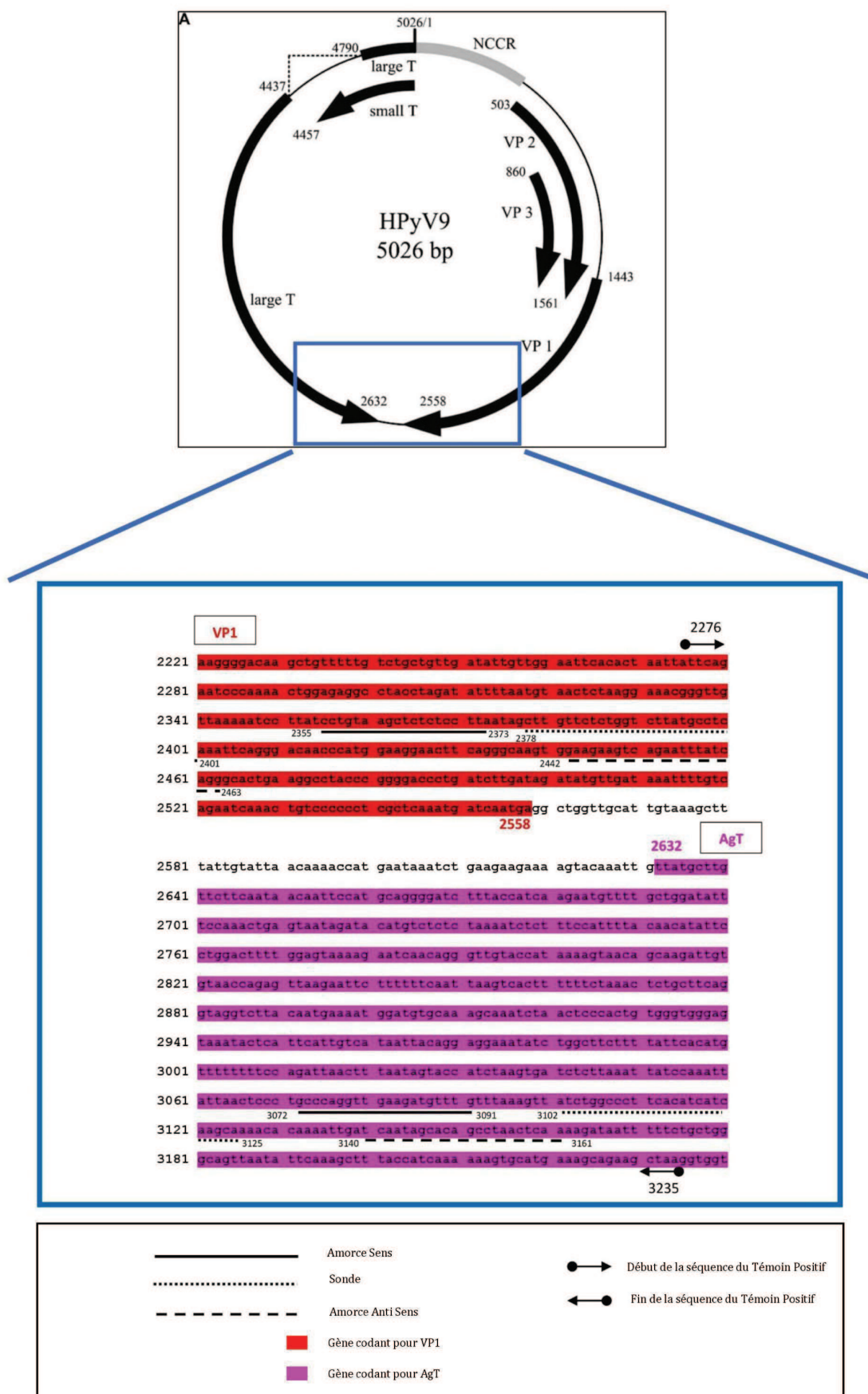


Figure 18 : Schéma de la séquence du témoin positif, à partir de la séquence de l'HPyV9
(D'après Scuda et al., 2011) Séquence de référence GenBank : HQ696595.1

6) Témoin interne d'amplification

L'utilisation du témoin interne d'amplification TaqMan® Exogenous Internal Positive Control (IPC) DNA Applied Biosystems® permet de s'assurer du bon déroulement de l'étape d'amplification dans chaque tube réactionnel. Le coffret comprend également le mix IPC d'amplification contenant les amorces spécifiques et la sonde marquée par le fluorochrome VIC.

II – Méthodes

1) Extraction des acides nucléiques

L'extraction d'ADN viral à partir de sang total EDTA et d'urine est réalisée à l'aide du kit DSP/Virus Pathogen (Qiagen ®) sur l'extracteur QIA Symphony SP. Cet extracteur réalise une extraction automatisée de 24 échantillons simultanément. Il garantit une haute reproductibilité inter-séries et permet de travailler avec des échantillons code-barrés.

Au moyen de billes magnétiques, la purification des acides nucléiques contenus dans le sang total EDTA ou l'urine est assurée selon le principe de fixation-élution. Pour les sangs totaux EDTA, l'extraction est réalisée sur une prise d'essai de 200 µL. Le volume d'extrait obtenu est de 100 µL. Les urines conservées à -20°C sont décongelées pendant cinq minutes au bain marie à 56°C, puis stabilisées dix minutes à température ambiante (15 à 25°C). Après homogénéisation, l'extraction est réalisée à partir de 500 µL d'urines. Le volume final d'extrait obtenu pour les urines est de 90 µL. Les extraits sont conservés à -20°C avant utilisation.

2) Réactifs pour la PCR en temps réel

Avant utilisation, les extraits conservés à -20°C sont décongelés cinq minutes au bain marie à 65°C, puis stabilisés à température ambiante (15 à 25°C). Un mélange réactionnel permettant l'amplification de l'HPyV9 (sang total EDTA et urine) et un mélange réactionnel permettant l'amplification de l'albumine (urine) sont utilisés. Le volume d'extrait ajouté dans le mélange réactionnel est toujours de cinq microlitres. Le volume réactionnel total est ajusté à 25 µL avec de l'eau distillée.

2.1) Amplification spécifique de l'HPyV9

Les concentrations finales des composants du mélange réactionnel permettant l'amplification du gène VP1 ou du gène AgT sont :

- Gene Expression Master Mix 1X
- 0,4 µM de chacune des amorces HPyV9-RG1 et HPyV9-RG2 (VP1 ou LTAG)
- 0,3 µM de sonde HPyV9-RGS (VP1 ou LTAG)
- Mix IPC 0,5X (amorces et sonde)
- IPC DNA 0,5X

2.2) Amplification spécifique de l'albumine

Les concentrations finales des composants du mélange réactionnel permettant l'amplification de l'albumine sont :

- Gene Expression Master Mix 1X
- 5 mM de $MgCl_2$
- 0,5 μM de chacune des amorces ALB-RG1 et ALB-RG2
- 0,1 μM de sonde ALB-RGS

Le Gene Expression Master Mix est commercialisé par Applied Biosystems®. Il contient la Taq polymérase AmpliTaq Gold® DNA Polymérase Ultra Pure. Elle est associée à un mélange de désoxyribonucléotides tri-phosphates (dATP, dTTP, dUTP, dCTP, dGTP), et d'Uracile-ADN Glycosylase, qui permet de limiter la contamination à partir d'ADN exogènes.

3) Interprétation des résultats de la PCR

Quelques éléments permettent de s'assurer du bon déroulement de la technique de PCR en temps réel :

- l'aspect général de type sigmoïde des courbes d'amplification avec un point d'inflexion (qui permet de définir le nombre de cycles (Ct) à partir du quel le signal lumineux dépasse la ligne de seuil fixée à 0,025 unités de fluorescence), une phase exponentielle et une phase de saturation.
- l'absence d'amplification du témoin d'extraction (Ct > 45 cycles). Le témoin d'extraction est un tampon fourni dans le kit d'extraction (Eau ARNase free stabilisée par de l'azide de sodium 0,04%). Utilisé au cours de chaque série d'extraction, il permet de vérifier l'absence de contamination.
- l'amplification du témoin positif (Ct < 40 cycles).
- l'amplification du contrôle interne (Ct < 40 cycles).
- l'amplification de l'albumine (Ct < 40 cycles).

RÉSULTATS

I – Mise au point de la PCR HPyV9 en temps réel

1) Conditions initiales de PCR pour l'amplification du témoin positif

Dans un premier temps, nous avons testé la détection du témoin positif en utilisant un programme d'amplification construit pour les autres virus à ADN au laboratoire. Le tableau 4 résume les caractéristiques de la réaction d'amplification réalisée sur le Rotor-Gene Q.

Tableau 4 : Profil de la réaction d'amplification réalisée sur le Rotor-Gene Q

Nombre de Cycles	Etape	Température	Durée
1 cycle préliminaire	Dénaturation et activation de la Taq Polymérase	95°C	600 secondes
45 cycles	Dénaturation	94°C	15 secondes
	Hybridation	58°C	20 secondes
	Elongation	72°C	20 secondes

Les couples amorces/sonde ciblant les gènes VP1 et AgT ont été testés. Le tableau 5 présente les résultats des Ct obtenus dans ces conditions pour chacune des PCR HPyV9.

Tableau 5 : Ct obtenus pour différentes concentrations de témoin positif

Concentration théorique du témoin positif (copies/μL)	VP1 (Ct)	AgT (Ct)
10 ⁸	9,83	8,63
10 ⁷	12,95	12,18
10 ⁶	16,89	15,48
10 ⁵	20,24	19,24
10 ⁴	23,94	22,74
10 ³	27,67	26,31
10 ²	31,15	30,45
10 ¹	35,06	32,28

Le témoin positif est correctement amplifié, aussi bien avec les amorces et sondes du gène VP1, qu'avec celles du gène de l'AgT. Les Ct obtenus sont corrélés à la quantité de témoin positif présente dans le mélange réactionnel (Figure 19).

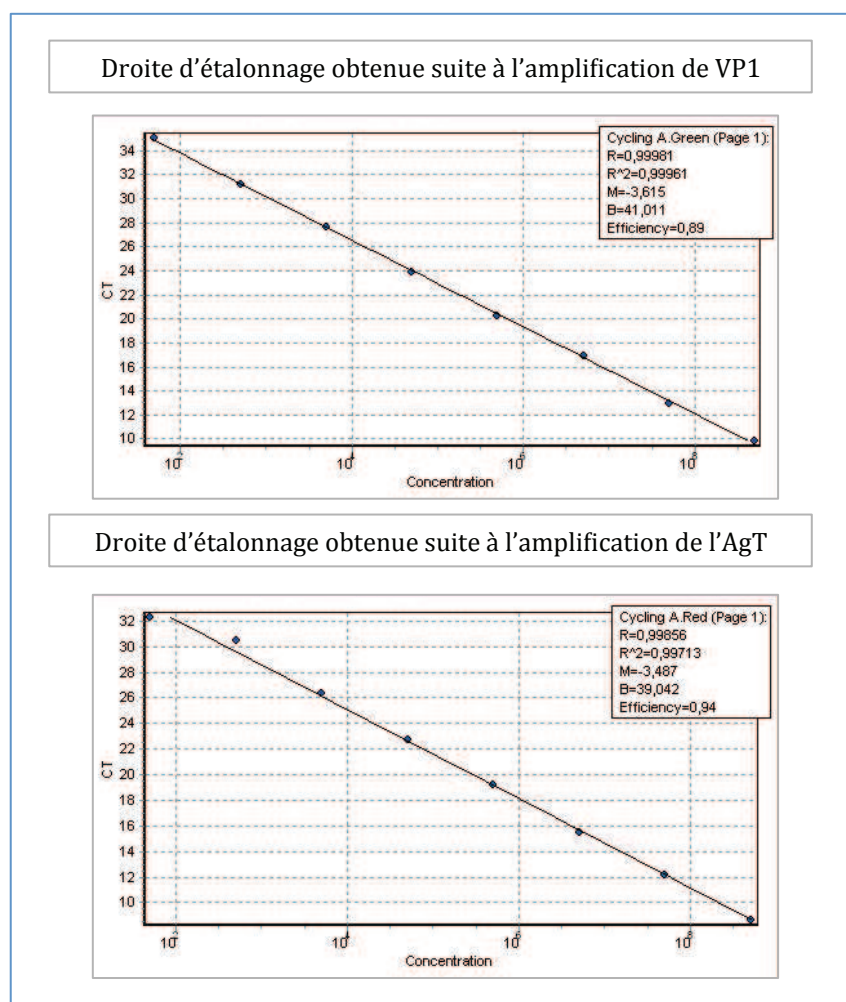


Figure 19 : Droites d'étalonnage obtenues après amplification de VP1 et de l'AgT pour une gamme de témoin positif (dilutions de 10^8 à 10^1 copies/ μ L)

Ces droites sont obtenues avec les Ct reportés dans le tableau 5.

Toutes les dilutions sont détectées, y compris la plus faible de 10^1 copies/ μ L. Les droites d'étalonnage représentent la valeur du Ct exprimée en fonction de la concentration théorique en témoin positif. La corrélation est linéaire sur l'ensemble des dilutions testées (de 10^8 à 10^1 copies/ μ L) et l'efficacité est proche de 1 pour les deux PCR.

Ce témoin positif peut donc être utilisé pour optimiser les conditions réactionnelles de la PCR.

2) Optimisation des conditions de la PCR en temps réel pour la détection de l'HPyV9

2.1) Choix de la température d'hybridation des amorces

Pour optimiser la température d'hybridation des amorces, un gradient de température a été réalisé sur le Light Cycler® 96 Real-Time PCR. Il s'agit d'un thermocycleur qui a la particularité de pouvoir travailler à différentes températures en même temps, sur différents échantillons, au moyen d'un système de capillaires thermorégulés. Les deux couples amorces/sonde ont été testés. Le tableau 6 présente les résultats des Ct obtenus en faisant varier la température d'hybridation de 55.0°C à 65.0 °C, en utilisant toujours la même concentration de témoin positif de 10² copies/μL. L'utilisation de cette dilution permet d'optimiser la température d'hybridation à partir d'une faible concentration de témoin positif.

Tableau 6 : Gradient de température réalisé sur le LightCycler® 96 Real-Time PCR pour la dilution 10² copies/μL de témoin positif

Températures d'hybridation des amorces	VP1 (Ct)	AgT (Ct)
55,0 °C	33,18	28,05
55,5 °C	32,96	28,15
56,5 °C	33,42	28,00
57,6 °C	34,47	27,80
59,0 °C	39,78	28,10
60,3 °C	ND	30,40
61,7 °C	ND	34,20
62,9 °C	ND	44,20
63,9 °C	ND	ND
64,6 °C	ND	ND
65,0 °C	ND	ND

ND : Non détecté

La comparaison des Ct obtenus pour une dilution de 10^2 copies/ μ L de témoin positif montre une détection plus précoce avec le couple amorces/sonde amplifiant l'AgT qu'avec celui amplifiant VP1 sur l'automate Light Cycler® 96 Real-Time PCR.

Pour l'amplification du gène VP1, la température d'hybridation des amorces de 55,5°C permet d'obtenir le plus faible Ct, traduisant ainsi une amplification optimale. Cependant, la différence entre les Ct obtenus est minime (moins de 1,5% d'écart) entre 55,0°C et 56,5°C. Au delà de 59,0°C, l'amplification du témoin positif n'est plus détectée. En ce qui concerne l'AgT, la température de 57,6°C permet d'obtenir le Ct le plus faible. Toutefois, il n'y a pas de différence significative entre les Ct observés pour des températures comprises entre 55,0 et 59,0°C (moins de 1,3% d'écart entre les Ct obtenus). Une température supérieure à 60,0°C diminue les performances d'amplification du gène de l'AgT.

Dans le but de pouvoir travailler simultanément à la même température d'hybridation avec les deux couples amorces/sonde en parallèle sur le Rotor-Gene Q, on choisit de sélectionner la température de 56,0°C pour l'hybridation des amorces.

2.2) Comparaison des PCR VP1 et AgT pour l'amplification de l'HPyV9

Nous avons ensuite comparé les performances des deux couples amorces/sondes sur une gamme de dilutions de témoin positif, puis en étudiant l'interférence avec l'IPC, et en vérifiant leurs spécificités.

2.2.1) Comparaison des performances des couples amorces/sonde

Les résultats présentés dans le tableau 7 ont été obtenus en testant cinq dilutions de raison dix du témoin positif dans les mêmes conditions analytiques pour les deux PCR HPyV9.

Tableau 7 : Comparaison des Ct obtenus lors de quatre séries de PCR VP1 et AgT à 56°C

Concentration théorique de témoin positif (copies/ μ L)	Ct obtenus par couple amorces/sonde				
	VP1 (Ct)				
	Série1	Série 2	Série 3	Série 4	Moyenne $\pm$ ET
10^4	25,06	24,89	25,61	25,33	25,22 $\pm$ 0,32
10^3	28,51	28,67	28,82	28,64	28,66 $\pm$ 0,13
10^2	31,98	32,30	32,51	32,19	32,25 $\pm$ 0,22
10^1	34,92	35,58	36,69	35,68	35,72 $\pm$ 0,73
10^0	38,04	38,04	37,22	37,34	37,66 $\pm$ 0,44
Concentration théorique de témoin positif (copies/ μ L)	AgT (Ct)				
	Série1	Série 2	Série 3	Série 4	Moyenne $\pm$ ET
	Série1	Série 2	Série 3	Série 4	Moyenne $\pm$ ET
10^4	23,64	24,78	25,09	25,81	24,83 $\pm$ 0,90
10^3	27,41	26,31	28,19	29,13	27,76 $\pm$ 1,20
10^2	30,81	31,92	32,33	32,62	31,92 $\pm$ 0,79
10^1	35,13	36,48	37,15	36,89	36,41 $\pm$ 0,90
10^0	40,22	39,22	38,01	36,18	38,41 $\pm$ 1,74

Contrairement à ce qui avait été observé sur le Light Cycler® 96 Real-Time PCR, les résultats des Ct obtenus avec les deux couples sont équivalents pour les dilutions allant de 10^4 à 10^2 copies/ μ L. La détection de la dilution 10^0 copies/ μ L pour l'AgT est très variable (valeur de l'écart type : 1,74) et tardive (Ct supérieure à 40) dans une série. La détection de la dilution 10^0 copies/ μ L n'est donc pas satisfaisante pour la PCR ciblant l'AgT. Ce problème ne s'observe pas pour la PCR VP1 pour laquelle la détection de la dilution 10^0 copies/ μ L est constante, avec des valeurs de Ct cohérentes et homogènes (valeur de l'écart type : 0,44). Des tests supplémentaires ont montré que la détection de concentrations de témoin positif de 10^{-1} copies/ μ L et de 10^{-2} copies/ μ L était aléatoire.

2.2.2) Interférence des PCR avec l'amplification de l'IPC

La co-amplification de l'IPC et du témoin positif a été réalisée. Le tableau 8 comporte les valeurs des Ct obtenus pour l'IPC, introduit en quantité fixe dans le mélange réactionnel, en fonction de la concentration de témoin positif.

Tableau 8 : Ct obtenus pour l'IPC co-amplifié avec le témoin positif

Concentration théorique de témoin positif (copies/ μ L)	Ct IPC (PCR VP1)	Ct IPC (PCR AgT)
10^8	41,21	ND
10^7	39,59	ND
10^6	38,47	ND
10^5	37,02	42,25
10^4	36,65	39,18
10^3	36,33	38,15
10^2	36,50	37,54
10^1	37,07	36,67
10^0	36,67	36,81

ND : Non détecté

Pour l'IPC, plus la quantité de témoin positif augmente dans le mélange réactionnel, plus les résultats de Ct observés sont élevés. Ceci s'explique par une compétition entre l'IPC et le couple amorces/sonde permettant l'amplification de VP1 ou de l'AgT vis-à-vis des nucléotides et de la TaqPolymérase. Cette compétition est responsable d'une détection plus tardive de l'IPC. Plus la concentration de témoin positif est élevée, plus il y a un décalage du Ct de l'IPC, ce qui montre qu'il y a une interférence entre les deux PCR. Cela s'observe surtout lorsque l'IPC est co-amplifié avec l'AgT. On ne détecte pas le signal de l'IPC (Ct supérieurs à 45) pour les dilutions de témoin positif les plus concentrées (10^6 à 10^8 copies/ μ L). Cette interférence ne s'observe pas lorsque l'IPC est co-amplifié avec VP1 pour des concentrations de témoin positif allant de 10^0 à 10^5 copies/ μ L.

2.2.3) Etude de la spécificité des couples amorces/sonde

Des extraits d'ADN d'échantillons positifs pour les virus BKPyV, JCPyV, CMV, EBV, ADV ont été testés au cours de la même réaction d'amplification et dans les mêmes conditions opératoires que le témoin positif. Ces tests ont été effectués avec les deux couples

amorces/sonde. Aucune amplification n'a été détectée, ce qui confirme la spécificité des deux couples amorces/sonde pour l'HPyV9.

2.2.4) Choix final du couple amorces/sonde

D'après les résultats précédents, le couple amorces/sonde spécifique du gène VP1 est choisi. Pour rappel, il s'agit de la technique utilisée par l'équipe de Van der Meijden et al. pour la recherche de l'HPyV9 dans une cohorte de patients transplantés rénaux en Hollande.

La reproductibilité a été testée pour quatre concentrations de témoin positif lors de 14 expériences. Ces dilutions ont été choisies pour vérifier la reproductibilité de la technique pour de faibles concentrations de témoin positif (10^4 à 10^0 copies/ μ L) (Tableau 9).

Tableau 9 : Résultats des tests de reproductibilité à partir de 14 expériences

Concentration théorique de témoin positif (copies/ μ L)	10^4	10^2	10^1	10^0
Moyenne des Ct	25,19	32,28	35,95	38,69
Ecart type	0,53	0,38	0,75	1,36
CV %	2,10	1,19	1,09	3,50

Les résultats obtenus sont satisfaisants avec des coefficients de variations inférieurs à 5%.

La concentration de 10^0 copies/ μ L constitue la limite de détection de notre méthode. Ce qui correspond à une capacité de détection de 5 copies dans le mélange réactionnel.

2.3) Amplification du témoin positif à partir d'une matrice biologique

Le témoin positif a été dilué dans des urines exemptes de BKPyV à différentes concentrations. L'objectif étant de réaliser l'extraction, suivie de l'amplification, de façon à pouvoir valider l'ensemble du protocole établi. Les concentrations de témoin positif obtenues après ajout dans des urines s'étendent de 10^0 à 10^4 copies/ μ L, dans le but de mimer les concentrations de la gamme de témoin positif déjà testées.

Cinq microlitres d'extraits sont ajoutés au mélange réactionnel qui permet la co-amplification de l'IPC et du témoin positif, effectuée avec le couple amorces/sonde spécifique du gène VP1. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Ct obtenus après ajout de témoin positif dans des urines

Echantillons d'urines	Concentration de témoin positif dans l'urine (copies/ μ L)	VP1 (Ct)	IPC (Ct)
Urine 1	10^4	23,08	38,23
Urine 2	10^2	33,51	37,49
Urine 3	10^1	36,61	37,25
Urine 4	10^0	ND	37,51

ND : Non détecté

Le témoin positif est amplifié lorsque sa concentration urinaire est supérieure ou égale à 10^1 copies/ μ L. La non détection de la concentration 10^0 copies/ μ L est probablement liée à un effet de matrice. L'amplification de l'IPC est satisfaisante et reproductible (valeur moyenne : 37,62 ; écart type : 0,42).

II – Recherche de l'HPyV9 dans des échantillons cliniques chez des patients transplantés de rein

1) Caractéristiques de la population et prélèvements étudiés

Nous avons étudié des prélèvements biologiques prélevés chez des patients transplantés de rein depuis moins d'un an au moment du prélèvement et suivis au CHU de Nantes. Ces patients ont été greffés entre octobre 2010 et novembre 2013.

1.1) Population étudiée pour les prélèvements sanguins

Il s'agit de 20 patients greffés entre avril 2012 et novembre 2013, âgés de 26 à 68 ans au moment de la greffe (âge moyen : 53 ans $\pm$ 14,0 ans). Le sexe ratio est de 1. Tous les patients ont reçu un greffon rénal isolé.

La PCR HPyV9 a été réalisée sur 61 prélèvements de sang total EDTA. Nous avons sélectionnés ceux prélevés entre trois mois et neuf mois après transplantation, pour lesquels la charge virale BKPyV était supérieure à 3,0 Log copies/mL (Charge virale moyenne : 4,1 Log copies/mL, écart type : 0,6 Log copies/mL).

1.2) Population étudiée pour les prélèvements urinaires

La population étudiée, âgée de 19 à 79 ans, est composée de 82 patients transplantés entre octobre 2010 et juillet 2013. L'âge moyen au moment de la transplantation, est de 51 ans ($\pm$ 14,2 ans). Le sexe ratio est de 1,73 hommes pour une femme. Un seul patient a reçu un greffon de type rein-pancréas. Tous les autres patients ont reçu un greffon rénal isolé (81 patients).

Pour chaque patient, des urines recueillies à 3 mois (M3), 6 mois (M6) et 9 mois (M9) post-transplantation ont été sélectionnées. Pour cause d'arrêt du suivi longitudinal d'un patient, un échantillon d'urine est manquant (M9). Ainsi 245 prélèvements d'urines ont été étudiés (Tableau 11).

Tableau 11 : Délais de recueil des 245 prélèvements d'urines collectés

Délai réel (en mois)	M3	M6	M9
Moyenne	3,01	6,05	9,26
Médiane	3,02	6,00	9,07
Minimum	1,93	3,37	7,63
Maximum	4,17	9,37	13,23
Ecart type	0,32	0,60	0,74
Nombre de prélèvements d'urines collectés	82	82	81

Le suivi longitudinal de ces patients inclut la réalisation de PCR BKPyV sur sang total et sur les urines. Van der Meijden et al. ont montré une détection plus fréquente de l'HPyV9 chez les patients virémiques pour le BKPyV. Nous avons donc constitué trois groupes de patients en fonction des résultats des PCR BKPyV sanguines et urinaires.

Le premier groupe est composé de 16 patients ayant développé une NBKV ou ayant eu une charge virale supérieure à 3,0 Log copies/mL sur sang total EDTA lors de la première année post-greffe. Les résultats des PCR BKPyV sanguines et urinaires de ces patients figurent dans le tableau 12.

Tableau 12 : Résultats des charges virales BKPyV sanguines et urinaires des patients du groupe 1

Patients virémiques BKPyV	M3	M6	M9
Pourcentage	56%	50%	56%
CV moyenne (Log copies/mL)	3,79	4,04	3,38
Ecart type (Log copies/mL)	0,75	1,43	0,85
PCR BKPyV urinaire positive	M3	M6	M9
Pourcentage	75%	87,5%	75%
CV moyenne (Log copies/mL)	7,21	6,79	6,62
Ecart type (Log copies/mL)	2,11	2,0	2,17

Le groupe 2 est constitué de 25 patients ayant eu au moins une PCR BKPyV positive dans les urines avec une charge virale toujours inférieure à 3,0 Log copies/mL sur sang total EDTA au cours de la première année post-greffe. Les résultats des PCR BKPyV réalisées sur les urines sont présentés dans le tableau 13. Seuls trois patients ont eu une PCR BKPyV positive sur sang total EDTA, au sixième mois (Charge virale égale à 2,0 Log copies/mL).

Tableau 13 : Résultats des charges virales BKPyV urinaires des patients du groupe 2

PCR BKPyV urinaire positive	M3	M6	M9
Pourcentage	32%	44%	40%
CV moyenne (Log copies/mL)	5,93	5,50	5,64
Ecart type (Log copies/mL)	1,99	1,82	2,41

Les 41 patients du groupe 3 ont eu un suivi virologique strictement négatif pour le BKPyV au cours de leur première année post-greffe. Aucun patient n'a eu de PCR BKPyV positive sur sang total EDTA ou sur prélèvement urinaire.

2) Recherche de l'HPyV9 dans les prélèvements de sang

Sur les 61 prélèvements de sang total analysés, aucun n'a été détecté positif pour l'HPyV9, malgré une détection satisfaisante de l'IPC (Tableau 14).

Tableau 14 : Ct obtenus pour l'amplification de l'IPC dans les 61 échantillons de sang total EDTA

Ct	IPC
Moyenne	34,13
Médiane	34,65
Minimum	32,97
Maximum	40,42
Ecart type	1,96

3) Recherche de l'HPyV9 dans les prélèvements d'urine

Suite à l'absence de détection de l'HPyV9 sur les prélèvements de sang total EDTA, nous avons choisi d'étudier des prélèvements d'urine. Nous nous sommes appuyés sur l'idée que les charges virales urinaires pouvaient être significativement plus fortes que les charges virales sanguines, ce qui pourrait faciliter la détection de l'HPyV9.

La PCR HPyV9 a été effectuée sur 245 prélèvements d'urine. Aucun échantillon n'a été détecté positif pour l'HPyV9 malgré une détection satisfaisante du gène de l'albumine et de l'IPC.

Après extraction, le gène de l'albumine a été amplifié dans 241 urines. L'IPC a été amplifié avec succès pour tous les échantillons testés. Des résultats complets, figurant dans le tableau 15, ont ainsi été obtenus pour 241 échantillons d'urine.

Tableau 15 : Ct obtenus pour l'amplification de l'IPC et du gène de l'albumine dans les 241 échantillons d'urines analysés

Ct	IPC	Albumine
Moyenne	34,91	31,66
Médiane	34,88	32,07
Minimale	31,07	19,56
Maximale	38,03	37,99
Ecart type	1,32	3,45

Les valeurs de Ct mesurées après amplification du gène de l'albumine ont une dispersion hétérogène, s'expliquant par la quantité variable d'albumine, retrouvée au niveau urinaire, d'un patient à un autre. En revanche, les valeurs de Ct mesurées après amplification de l'IPC ont une dispersion homogène autour de la valeur de 35 cycles (Figure 20).

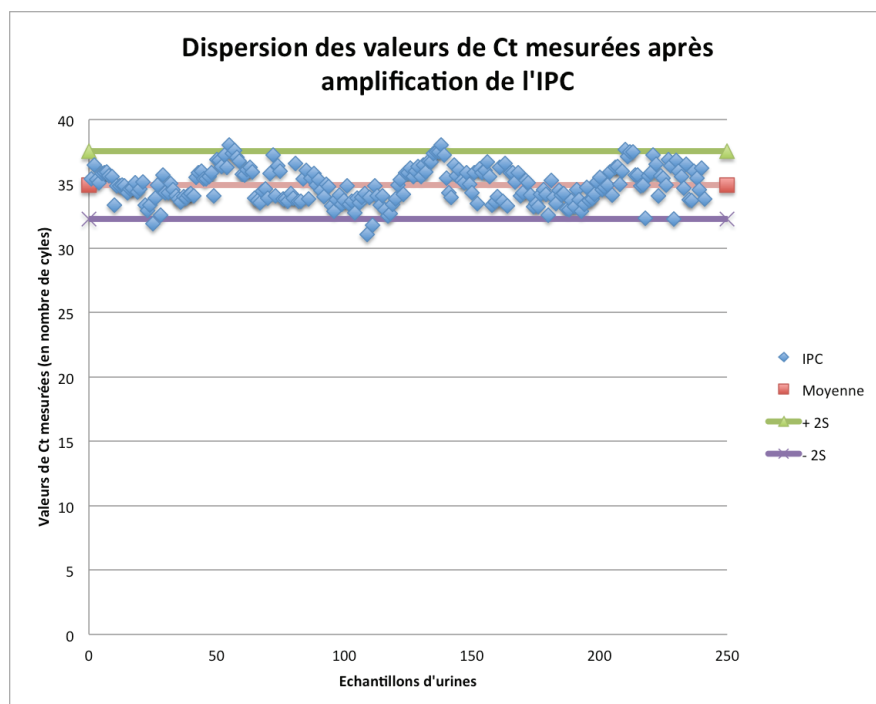
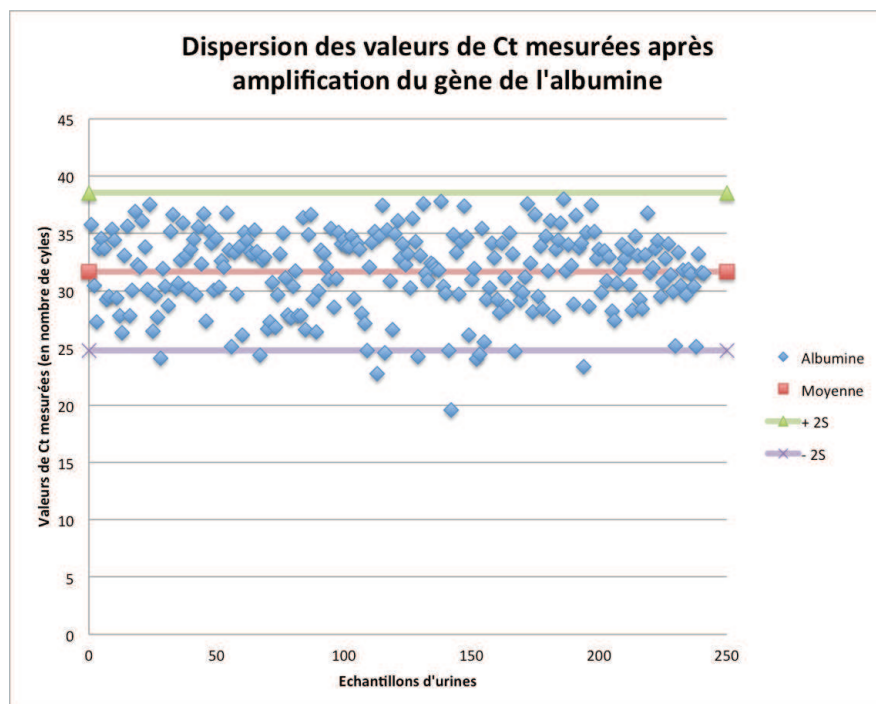


Figure 20 : Nuages de point représentant la dispersion des valeurs de Ct du gène de l'albumine et de l'IPC pour les 241 échantillons d'urines sélectionnés

DISCUSSION

Le nombre de polyomavirus humains connus s'est considérablement enrichi ces dernières années, grâce à l'utilisation de techniques de PCR/séquençage permettant d'identifier de nouveaux pathogènes grâce à l'amplification de leur génome. Le pouvoir pathogène des polyomavirus humains n'est pas précisément identifié pour l'ensemble de la famille. Les polyomavirus les plus connus, car associés à un pouvoir pathogène bien individualisé, sont notamment les BKPyV, le JCPyV, le MCPyV. Ces virus très bien adaptés à l'homme passent le plus souvent totalement inaperçus lors de la primo-infection chez le sujet sain. C'est dans un contexte d'immunodépression que leur pathogénicité s'exprime le plus souvent, et notamment après transplantation rénale dans le cas du BKPyV.

En 2011, le polyomavirus humain 9 (HPyV9) est découvert par Scuda et al. dans le sérum d'une patiente transplantée rénale. On ne dispose d'aucune information sur les molécules immunosuppressives administrées à cette patiente, ni sur la durée depuis laquelle la patiente était greffée au moment de cette découverte. Cependant, cela amène à se poser la question d'un éventuel lien entre transplantation rénale et infection à HPyV9.

En 2014, l'équipe de Van der Meijden et al. étudie une cohorte de patients transplantés rénaux. Ils parviennent à détecter l'HPyV9 par une PCR spécifique à partir d'échantillons de sérum chez 20,8% des patients suivis. Parmi les patients positifs pour l'HPyV9, 95% d'entre eux sont virémiques pour le BKPyV.

L'objectif de notre travail était de mettre au point une méthode de détection quantitative par PCR en temps réel de l'HPyV9. Il s'agissait secondairement de confirmer la fréquence élevée de détection du génome de l'HPyV9 dans une population de patients transplantés rénaux.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode de détection quantitative du génome de l'HPyV9 par PCR en temps réel (par technologie TaqMan). Nous n'avions pas d'échantillon biologique humain positif pour l'HPyV9 à notre disposition. Nous avons donc fait synthétiser un fragment d'ADN double brin. Notre choix s'est porté sur une portion de 960 pb du génome de l'HPyV9. Sur cette partie du génome, les gènes qui

codent pour la protéine VP1 et l'AgT sont contigus, du fait de la structure circulaire des polyomavirus (malgré leur transcription respective dans des sens opposés).

La mise au point des conditions de PCR a été effectuée au moyen de ce témoin positif, en testant deux couples amorces/sonde différents, ciblant les gènes VP1 et AgT. L'élaboration d'une gamme de standard, à partir de différentes dilutions de ce témoin positif, a permis d'effectuer des tests de reproductibilité, de spécificité, et d'estimer la limite inférieure de détection de notre méthode.

Ces tests ont conduit à sélectionner le couple amorces/sonde spécifique du gène codant pour la protéine VP1 pour essayer d'amplifier l'HPyV9.

Dans un second temps, cette technique a été appliquée à une cohorte de patients transplantés rénaux, dans le cadre d'une étude rétrospective. Ces patients bénéficient d'un suivi systématique rapproché pendant les deux premières années après la greffe. Nous avons étudié des échantillons biologiques prélevés entre trois mois et neuf mois après transplantation. Ils correspondent à la période où le niveau d'immunosuppression est le plus élevé, et par déduction, à une plus grande probabilité de parvenir à mettre en évidence une réactivation virale.

Pour rappel l'équipe de Scuda et al. puis celle de Van der Meijden et al. ont amplifié l'HPyV9 à partir de prélèvements sanguins (sang total, plasma, sérum) et de prélèvements urinaires.

Nous avons d'abord testé notre PCR sur 61 échantillons de sang total EDTA. Ces échantillons étaient initialement dédiés à la recherche du BKPyV. Ils avaient été collectés chez des patients transplantés rénaux entre trois et neuf mois après leur transplantation. S'inspirant des résultats publiés par Van der Meijden et al., nous avons sélectionné des échantillons pour lesquels les charges virales BKPyV étaient toutes supérieures à 3,0 Log copies/mL. L'HPyV9 n'a pu être détecté dans aucun de ces 61 prélèvements.

Suite à l'absence de détection de l'HPyV9 sur sang total EDTA, il nous a semblé intéressant de rechercher le génome de l'HPyV9 dans les urines de patients transplantés rénaux. Pour le BKPyV, les charges virales urinaires sont bien plus élevées que les charges virales sanguines (6 à 9 Log copies/mL dans les urines contre 3 à 5 Log copies/mL sur sang total EDTA). Nous avons fait l'hypothèse que cette différence entre les charges virales urinaires et sanguines pouvait aussi exister pour l'HPyV9, même si pour l'instant le site de persistance de l'HPyV9 n'est pas connu.

Nous avons constitué trois groupes de patients, pour voir si les patients qui faisaient une infection à BKPyV avaient une plus grande probabilité d'avoir une PCR positive à HPyV9. Le premier groupe est constitué de 16 patients ayant eu une PCR BKPyV positive avec une charge virale supérieure à 3,0 Log copies/mL sur sang total EDTA, au cours de leur première année post-transplantation. Quatre d'entre eux ont développé une NBKV. Le second est formé de 25 patients, pour lesquels au moins une PCR BKPyV effectuée sur les urines est revenue positive, avec une charge virale toujours inférieure à 3,0 Log copies/mL sur sang total EDTA. Le troisième groupe réunit 41 patients, dont le suivi virologique, au cours de cette même première année post-greffe, est resté négatif pour le BKPyV.

Notre PCR spécifique HPyV9 a été effectuée sur 245 prélèvements d'urines. Tous groupes confondus, aucun échantillon n'a été détecté positif pour l'HPyV9, malgré la co-détection de l'albumine et du contrôle interne d'amplification dans 241 urines.

Le gène de l'albumine est amplifié de façon satisfaisante (Ct inférieur à 40 cycles) dans 241 échantillons d'urines, soit 98,4% des urines collectées. Ce résultat valide l'extraction des acides nucléiques effectuée sur le QIAAsymphony SP QIAGEN®. De plus, l'IPC ajouté dans chaque mélange réactionnel est amplifié dans 100% des urines collectées. La détection constante de cette amplification, avec des valeurs de Ct toujours inférieures à 40, valide l'étape d'amplification. Malgré ces éléments satisfaisants à propos de l'amplification du gène de l'albumine et de l'IPC, certains points techniques pourraient expliquer l'absence de détection de l'HPyV9.

Premièrement, la mise au point de notre PCR a entièrement été effectuée avec un témoin synthétique. Bien que la séquence de ce témoin soit identique à celle de la souche de référence d'HPyV9 (Séquence GenBank : HQ696595.1), il aurait été intéressant d'effectuer la mise au point de notre PCR avec un échantillon biologique positif. Les sondes et amorces spécifiques se fixent probablement à l'identique sur la séquence de témoin positif ou sur le génome de l'HPyV9. Il est possible que des variations nucléotidiques existent au niveau de la séquence des amorces ou de la sonde entre les différentes souches d'HPyV9. Cependant, comme nous avons utilisé les amorces et sonde publiées par une autre équipe précédemment, cette hypothèse est peu probable, en tout cas pas sur l'ensemble des souches d'HPyV9 circulantes.

Une autre explication possible est une sensibilité insuffisante de notre technique pour détecter des charges virales très faibles. Contrairement à la limite de détection observée lors de la mise au point de notre PCR (10^0 copies/ μ L), la plus petite dilution de témoin positif toujours détectée au cours des séries de PCR sur les échantillons cliniques était celle de 10^1 copies/ μ L. Ce qui équivaut à une concentration théorique de 5000 copies/mL dans les prélèvements de sang total EDTA de départ, et de 1800 copies/mL dans les urines primitives. La détection de la dilution 10^0 copies/ μ L de témoin positif dans le mélange réactionnel était aléatoire. La limite de détection de notre technique peut donc être estimée entre 500 et 5000 copies/mL pour le sang total EDTA et entre 180 et 1800 copies/mL pour les urines.

Dans l'article de Van der Meijden et al., les charges virales sériques mesurées ont des valeurs comprises entre 25 et 530 copies/mL. La sensibilité mentionnée dans leur article est de 10 copies/mL (soit une capacité de détection de 0,2 copies dans le mélange réactionnel selon leur protocole). Les charges virales mesurées et la sensibilité affichée sont très faibles. Avec notre technique, nous aurions une sensibilité équivalente en détectant la dilution de 10^{-1} copies μ L. Ce qui correspondrait à des valeurs de charges virales sanguines et urinaires de 50 et 18 copies /mL.

D'après ces constatations, la sensibilité de notre méthode apparaît comme un réel argument dans la non détection d'échantillons positifs. Toutefois, à la différence de Van der Meijden et al., nous avons travaillé à partir de prélèvements d'urines. Si on s'autorise à effectuer une comparaison avec le BKPyV, pour lequel les charges virales urinaires sont 1000 à 10 000 fois plus élevées que les charges virales sanguines, on s'attendrait à détecter des échantillons d'urines positifs, même avec une technique de sensibilité relative. Ceci pourrait s'expliquer par une excrétion urinaire faible ou très intermittente de l'HPyV9, qui est peut être caractérisé par un faible tropisme pour le tractus réno-urinaire. Cependant, d'autres polyomavirus ont été détectés dans des urines de patients transplantés rénaux (JCPyV, MCPyV, KIPyV, WUPyV, TSPyV). De plus, Scuda et al. et Csoma et al. sont parvenus à amplifier l'HPyV9 à partir d'échantillons urinaires, mais en utilisant des techniques hypersensibles et sans données quantitatives.

Dans la cohorte Hollandaise, 20,8% des patients ont eu au moins une PCR HPyV9 positive au cours des 18 mois post-transplantation. À ce chiffre élevé de prévalence, s'ajoute une importante proportion de patients ayant une PCR positive à trois mois

et/ou six mois et/ou neuf mois après la transplantation : respectivement 7,1%, 6,2% et 6,3% des patients. Par extension de ces chiffres à notre population, on pourrait s'attendre à obtenir des résultats positifs pour au moins une dizaine d'échantillons d'urine.

Les patients issus de notre cohorte et ceux de l'étude Hollandaise proviennent de deux centres différents de transplantations. Des différences d'utilisation des traitements anti-rejet peuvent exister entre les centres, même si globalement les associations de molécules sont les mêmes. En ce qui concerne le CHU de Nantes, dans le cas d'une première transplantation rénale, le protocole thérapeutique standard comprend l'administration de 500 mg de méthylprednisone et de 20 mg de Simulect® ou basiliximab (antagoniste du récepteur de l'IL-2) le jour de l'intervention. L'administration de 20 mg de basiliximab est renouvelée le quatrième jour suivant la transplantation rénale. Le traitement «anti-rejet au long cours» comprend en général l'association de tacrolimus, de mycophénolate mofétil (1000 mg), et de glucocorticoïdes. Dans des circonstances spécifiques (greffes ABO incompatibles, transplantation rénale antérieure, patient à haut risque immunologique...), d'autres thérapeutiques peuvent être utilisées en complément, comme le rituximab (anticorps anti-CD20), des globulines anti-lymphocytaires (ATG-Frenesius®), des globulines anti-thymocytes (Thymoglobulin®) ou encore des immunoglobulines humaines polyvalentes (Privigen®).

Pour les patients suivis dans la cohorte Hollandaise, il est mentionné dans la publication de Van der Meijden et al. l'utilisation de basiliximab à la dose de 40 mg à J0 et J4 (contre 20 mg dans le protocole nantais) ou de Zenapax®, daclizumab (autre antagoniste du récepteur de l'IL-2), administré à la dose de 100mg/jour pendant les dix premiers jours suivants la transplantation. Les molécules utilisées au long cours sont les suivantes : prednisone, mycophénolate mofétil et ciclosporine ou tacrolimus. Il n'est pas proposé de critères pour le choix des antagonistes du récepteur de l'IL-2 ou pour les molécules de la classe des anticalcineurines.

Il ne semble pas y avoir de différences majeures entre les pratiques des deux centres de transplantations, même si l'on ne dispose que des grandes lignes thérapeutiques. La seule différence porte sur la posologie du basiliximab. Il s'agit dans l'ensemble de protocoles standardisés, qui comportent les mêmes molécules anti-rejet.

Il serait intéressant de connaître pour chaque patient, la pathologie rénale initiale ayant motivée la greffe, le statut du donneur du greffon (donneur vivant ou cœur arrêté) et l'existence d'une éventuelle greffe antérieure, pour essayer d'évaluer le niveau d'immunodépression auquel est exposé le patient en fonction des traitements qu'il reçoit. La confrontation de ce niveau relatif d'immunodépression aux résultats des PCR HPyV9 pourrait être informative.

A noter que les données épidémiologiques des deux cohortes de patients (sexe ratio, âge du patient au moment de la greffe) sont similaires.

D'autres hypothèses sont envisageables pour expliquer ces différences de résultats. En effet, la distribution des polyomavirus est habituellement considérée comme ubiquitaire, mais on peut imaginer que ce ne soit pas tout à fait le cas pour l'HPyV9. Il n'existe pas de données sur la répartition géographique de ce virus. A l'heure actuelle, seules cinq équipes dans le monde ont réussi à détecter le génome de l'HPyV9 dans des échantillons biologiques humains. Outre Scuda et al. à l'origine de sa découverte en 2011, et l'équipe de Van der Meijden et al. à l'origine de l'étude de la cohorte de patients transplantés rénaux Hollandais, trois autres équipes ont réussi à amplifier le génome de l'HPyV9 en août 2011 (Sauvage et al.),¹⁰² en mai 2012 (Csoma et al.),¹⁰³ et en septembre 2014 (Lednicky et al.).¹⁰⁴

Ces cinq équipes sont respectivement originaires de Berlin (Allemagne), de Leiden (Hollande), de Montpellier (France), de Debrecen (Hongrie) et de Gainesville (Floride, Etats-Unis). Ce qui correspond pour l'instant à une distribution géographique relativement limitée (Tableau 16).

Tableau 16 : Synthèse des publications rapportant la détection d'HPyV9 par PCR

Auteurs	Dates	Populations	Echantillons biologiques	Méthodes	Statut de la recherche	Séquence	Fréquence de détection
Scuda et al.	Février 2011	Patients transplantés rénaux	Plasmas Sérums Urines	PCR dégénérée	Découverte	HQ696595.1	1/76(1,3%) 1/41(2,4%) 1/38(2,6%)
Sauvage et al.	Août 2011	Patients atteints de CCM	Peau	RCA	Découverte	FR823284.2	2/8 (25%)
Csoma et al.	Mai 2012	Femmes enceintes et non enceintes	Plasmas, Urines, Ecouillons de gorge	PCR nichée spécifique	Recherche spécifique	/	2 à 6%
Van der Meijden et al.	Juin 2014	Patients transplantés rénaux	Sérums	PCR spécifique quantitative	Recherche spécifique	/	21/101 (20,8%)
Lednický et al.	Septembre 2014	Patients au stade SIDA	Lymphocytes du sang périphérique	RCA	Découverte	KC831440.1	/

L'explication la plus vraisemblable est sûrement le caractère récent de la découverte de l'HPyV9, associé à un nombre restreint de laboratoires de recherche qui travaillent sur ce sujet.

Il est très probable que la distribution de l'HPyV9 ne soit pas aussi restreinte. La séroprévalence élevée (environ 20% chez les moins de quinze ans, et 40 à 60% chez les plus de 50 ans) est en faveur d'une assez large distribution. Toutefois, il n'est pas impossible d'envisager qu'une répllication ne soit détectable que dans des foyers limités de population, sous l'influence d'éventuels facteurs environnementaux locaux.

Il serait intéressant de rechercher l'HPyV9 dans d'autres populations de patients immunodéprimés. L'HPyV9 a été mis en évidence à partir d'écouvillons cutanés chez des patients atteints de CCM. Dans, une étude française regroupant huit patients atteints de CCM, deux ont eu une PCR positive à HPyV9.

Précédemment, l'HPyV6 et l'HPyV7 ont déjà été isolés à partir de prélèvements cutanés de patients sains, laissant supposer le fait qu'ils puissent faire partie intégrante d'une flore virale cutanée. Dès lors, peut-il en être de même pour l'HPyV9 ou bien existe-t-il un

lien privilégié entre infection à MCPyV et l'HPyV9. Ce lien a déjà été observé par Scuda et al. lors de la découverte de l'HPyV9 : ils avaient amplifié le génome de l'HPyV9 et celui du MCPyV dans une urine d'un patient transplanté rénal.

La recherche de l'HPyV9 pourrait être effectuée chez des patients atteints d'hémopathies, notamment de leucémie aigüe myéloïde. L'équipe de Scuda et al. avait réussi, à partir de prélèvements de sangs totaux, à détecter un échantillon positif sur vingt prélèvements analysés. Bien que ces données ne soient pas confirmées par d'autres études, les patients leucémiques pourraient potentiellement constituer une population d'intérêt.

En dépit de ces quelques pistes de réflexion, on ne dispose aujourd'hui d'aucune information sur la pathogénicité éventuelle de l'HPyV9. Comme pour tous les polyomavirus découverts depuis 2011, il est difficile de se prononcer sur le rôle de ce virus devant le manque d'éléments à notre disposition.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Gross, L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **83**, 414–421 (1953).
2. Stewart, S. E., Eddy, B. E., Gochenour, A. M., Borgese, N. G. & Grubbs, G. E. The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. *Virology* **3**, 380–400 (1957).
3. Sweet, B. H. & Hilleman, M. R. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **105**, 420–427 (1960).
4. Girardi, A. J., Sweet, B. H., Slotnick, V. B. & Hilleman, M. R. Development of Tumors in Hamsters Inoculated in the Neonatal Period with Vacuolating Virus, SV40. *Exp. Biol. Med.* **109**, 649–660 (1962).
5. Gross, L. Oncogenic Viruses. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **33**, 67–78 (1963).
6. Rifkind, D., Goodman, N. & Hill, J., Rolla B. The Clinical Significance of Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Recipients. *Ann. Intern. Med.* **66**, 1116–1128 (1967).
7. Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V. & Hulme, B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* **1**, 1253–1257 (1971).
8. Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J. & Dessel, B. H. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* **1**, 1257–1260 (1971).
9. Khalili, K. & Stoner, G. L. *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*. (John Wiley & Sons, 2004).
10. Melnick, J. L. Papova virus group. *Science* **135**, 1128–1130 (1962).
11. Pringle, C. R. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Arch. Virol.* **144**, 2065–2070 (1999).
12. Feltkamp, M. C. W., Kazem, S., van der Meijden, E., Lauber, C. & Gorbalenya, A. E. From Stockholm to Malawi: recent developments in studying human polyomaviruses. *J. Gen. Virol.* **94**, 482–496 (2013).
13. Allander, T. *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12891–12896 (2005).
14. Froussard, P. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. *Nucleic Acids Res.* **20**, 2900 (1992).
15. Johne, R., Müller, H., Rector, A., van Ranst, M. & Stevens, H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol.* **17**, 205–211 (2009).
16. Allander, T. *et al.* Identification of a third human polyomavirus. *J. Virol.* **81**, 4130–4136 (2007).
17. Gaynor, A. M. *et al.* Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* **3**, e64 (2007).
18. Toker, C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch. Dermatol.* **105**, 107–110 (1972).
19. Merkel, F. Tastzellen und Tastkörperchen bei den Haustieren und beim Menschen. *Ark. Für Mikrosk. Anat. Entwick- Lungsmechanik* **11**, 636–652 (1875).
20. Feng, H. *et al.* Human Transcriptome Subtraction by Using Short Sequence Tags To Search for Tumor Viruses in Conjunctival Carcinoma. *J. Virol.* **81**, 11332–11340 (2007).

21. Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **319**, 1096–1100 (2008).
22. Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. A., Moyer, A. L. & Buck, C. B. Merkel Cell Polyomavirus and Two Novel Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin. *Cell Host Microbe* **7**, 509–515 (2010).
23. Claire L Haycox, S. K. Trichodysplasia spinulosa--a newly described folliculocentric viral infection in an immunocompromised host. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* **4**, 268–71 (1999).
24. Van der Meijden, E. *et al.* Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog.* **6**, e1001024 (2010).
25. Viscidi, R. P. & Clayman, B. Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **577**, 73–84 (2006).
26. Scuda, N. *et al.* A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J. Virol.* **85**, 4586–4590 (2011).
27. Siebrasse, E. A. *et al.* Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J. Virol.* **86**, 10321–10326 (2012).
28. Buck, C. B. *et al.* Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *J. Virol.* **86**, 10887 (2012).
29. Johne, R. *et al.* Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* **156**, 1627–1634 (2011).
30. Lim, E. S. *et al.* Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology* **436**, 295–303 (2013).
31. Korup, S. *et al.* Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PloS One* **8**, e58021 (2013).
32. Mishra, N. *et al.* Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. *J. Infect. Dis.* **210**, 1595–1599 (2014).
33. Imperiale, M. J. & Major. Polyomaviruses. In Fields' Virology. *M Knipe P M Howley* **5 th Edition**, 2263–2298 (2007).
34. Stehle, T., S. J. Gamblin, Y. Yan, and S. C. Harrison. The structure of Simian Virus 40 refined at 3.1 Å resolution. 165–182 (1996).
35. Li, P. P. *et al.* Importance of Vp1 Calcium-Binding Residues in Assembly, Cell Entry, and Nuclear Entry of Simian Virus 40. *J. Virol.* **77**, 7527–7538 (2003).
36. Gjoerup, O. & Chang, Y. Update on human polyomaviruses and cancer. *Adv. Cancer Res.* **106**, 1–51 (2010).
37. An, P., Sáenz Robles, M. T. & Pipas, J. M. Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 213–236 (2012).
38. Welcker, M. & Clurman, B. E. The SV40 large T antigen contains a decoy phosphodegron that mediates its interactions with Fbw7/hCdc4. *J. Biol. Chem.* **280**, 7654–7658 (2005).
39. Pallas, D. C. *et al.* The third subunit of protein phosphatase 2A (PP2A), a 55-kilodalton protein which is apparently substituted for by T antigens in complexes with the 36- and 63-kilodalton PP2A subunits, bears little resemblance to T antigens. *J. Virol.* **66**, 886–893 (1992).
40. Andrabi, S., Gjoerup, O. V., Kean, J. A., Roberts, T. M. & Schaffhausen, B. Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19011–19016 (2007).

41. DeCaprio, J. A. & Garcea, R. L. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 264–276 (2013).
42. Seo, G. J., Fink, L. H. L., O'Hara, B., Atwood, W. J. & Sullivan, C. S. Evolutionarily Conserved Function of a Viral MicroRNA. *J. Virol.* **82**, 9823–9828 (2008).
43. Broekema, N. M. & Imperiale, M. J. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 8200–8205 (2013).
44. Salunke, D. M., Caspar, D. L. & Garcea, R. L. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* **46**, 895–904 (1986).
45. Markowitz, R. B. & Dynan, W. S. Binding of cellular proteins to the regulatory region of BK virus DNA. *J. Virol.* **62**, 3388–3398 (1988).
46. Moens, U., Johansen, T., Johnsen, J. I., Seternes, O. M. & Traavik, T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes* **10**, 261–275 (1995).
47. Gosert, R. *et al.* Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J. Exp. Med.* **205**, 841–852 (2008).
48. Myhre, M. R., Olsen, G.-H., Gosert, R., Hirsch, H. H. & Rinaldo, C. H. Clinical polyomavirus BK variants with agnogene deletion are non-functional but rescued by trans-complementation. *Virology* **398**, 12–20 (2010).
49. Low, J. A., Magnuson, B., Tsai, B. & Imperiale, M. J. Identification of Gangliosides GD1b and GT1b as Receptors for BK Virus. *J. Virol.* **80**, 1361–1366 (2006).
50. Elphick, G. F. *et al.* The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* **306**, 1380–1383 (2004).
51. Moriyama, T., Marquez, J. P., Wakatsuki, T. & Sorokin, A. Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *J. Virol.* **81**, 8552–8562 (2007).
52. Pho, M. T., Ashok, A. & Atwood, W. J. JC Virus Enters Human Glial Cells by Clathrin-Dependent Receptor-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* **74**, 2288–2292 (2000).
53. Sowd, G. A. & Fanning, E. A Wolf in Sheep's Clothing: SV40 Co-opts Host Genome Maintenance Proteins to Replicate Viral DNA. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
54. Sandalon, Z. & Oppenheim, A. Self-Assembly and Protein-Protein Interactions between the SV40 Capsid Proteins Produced in Insect Cells. *Virology* **237**, 414–421 (1997).
55. Hashida, Y., Gaffney, P. C. & Yunis, E. J. Acute hemorrhagic cystitis of childhood and papovavirus-like particles. *J. Pediatr.* **89**, 85–87 (1976).
56. Goudsmit, J., Dillen, P. W., van Strien, A. & van der Noordaa, J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J. Med. Virol.* **10**, 91–99 (1982).
57. Monaco, M. C., Atwood, W. J., Gravell, M., Tornatore, C. S. & Major, E. O. JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J. Virol.* **70**, 7004–7012 (1996).
58. Ricciardiello, L. *et al.* JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **119**, 1228–1235 (2000).
59. Bofill-Mas, S., Formiga-Cruz, M., Clemente-Casares, P., Calafell, F. & Girones, R. Potential Transmission of Human Polyomaviruses through the Gastrointestinal Tract after Exposure to Virions or Viral DNA. *J. Virol.* **75**, 10290–10299 (2001).
60. Dolei, A. *et al.* Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J. Gen. Virol.* **81**, 1967–1973 (2000).

61. Andrews, C., Shah, K. V., Rubin, R. & Hirsch, M. BK papovavirus infections in renal transplant recipients: contribution of donor kidneys. *J. Infect. Dis.* **145**, 276 (1982).
62. Andrews, C. A., Shah, K. V., Daniel, R. W., Hirsch, M. S. & Rubin, R. H. A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J. Infect. Dis.* **158**, 176–181 (1988).
63. Pietropaolo, V. *et al.* Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J. Med. Virol.* **56**, 372–376 (1998).
64. Bofill-Mas, S., Pina, S. & Girones, R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 238–245 (2000).
65. Touzé, A. *et al.* Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1767–1770 (2010).
66. Gardner, S. D. Prevalence in England of Antibody to Human Polyomavirus (B.K.). *Br. Med. J.* **1**, 77–78 (1973).
67. Kean, J. M., Rao, S., Wang, M. & Garcea, R. L. Seroepidemiology of Human Polyomaviruses. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
68. Nicol, J. T. J. *et al.* Age-specific seroprevalences of merkel cell polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9, and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **20**, 363–368 (2013).
69. Nicol, J. T. J. *et al.* Seroprevalence of human Malawi polyomavirus. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 321–323 (2014).
70. Lim, E. S., Meinerz, N. M., Primi, B., Wang, D. & Garcea, R. L. Common exposure to STL polyomavirus during childhood. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1559–1561 (2014).
71. Egli, A. *et al.* Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J. Infect. Dis.* **199**, 837–846 (2009).
72. Azzi, A. *et al.* Human polyomaviruses DNA detection in peripheral blood leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *J. Neurovirol.* **2**, 411–416 (1996).
73. Dörries, K., Vogel, E., Günther, S. & Czub, S. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* **198**, 59–70 (1994).
74. Tan, C. S. *et al.* JC virus latency in the brain and extraneural organs of patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.* **84**, 9200–9209 (2010).
75. Behzad-Behbahani, A., Klapper, P. E., Valley, P. J., Cleator, G. M. & Khoo, S. H. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **29**, 224–229 (2004).
76. Hirsch, H. H. *et al.* Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* **79**, 1277–1286 (2005).
77. Bressollette-Bodin, C. *et al.* A Prospective Longitudinal Study of BK Virus Infection in 104 Renal Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.* **5**, 1926–1933 (2005).
78. Randhawa, P. S. & Demetris, A. J. Nephropathy due to polyomavirus type BK. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1361–1363 (2000).
79. L K Dropulic, R. J. J. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* **41**, 11–8 (2008).

80. Hirsch, H. H. & Steiger, J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 611–623 (2003).
81. Reploeg, M. D., Storch, G. A. & Clifford, D. B. BK Virus: A Clinical Review. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 191–202 (2001).
82. Tan, C. S. & Koralnik, I. J. Beyond progressive multifocal leukoencephalopathy: expanded pathogenesis of JC virus infection in the central nervous system. *Lancet Neurol.* **9**, 425–437 (2010).
83. Bellizzi, A. *et al.* New insights on human polyomavirus JC and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, 839719 (2013).
84. Planas, R., Jelčić, I., Schippling, S., Martin, R. & Sospedra, M. Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* **42**, 790–798 (2012).
85. Brew, B. J., Davies, N. W. S., Cinque, P., Clifford, D. B. & Nath, A. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. *Nat. Rev. Neurol.* **6**, 667–679 (2010).
86. Abedi Kiasari, B., Vallely, P. J., Corless, C. E., Al-Hammadi, M. & Klapper, P. E. Age-related pattern of KI and WU polyomavirus infection. *J. Clin. Virol.* **43**, 123–125 (2008).
87. Bialasiewicz, S. *et al.* A newly reported human polyomavirus, KI virus, is present in the respiratory tract of Australian children. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **40**, 15–18 (2007).
88. Babakir-Mina, M. *et al.* KI and WU Polyomaviruses and CD4+ Cell Counts in HIV-1-infected Patients, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1482–1485 (2010).
89. Bialasiewicz, S., Whiley, D. M., Lambert, S. B., Nissen, M. D. & Sloots, T. P. Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **45**, 249–254 (2009).
90. Csoma, E., Mészáros, B., Asztalos, L., Kónya, J. & Gergely, L. Prevalence of WU and KI polyomaviruses in plasma, urine, and respiratory samples from renal transplant patients. *J. Med. Virol.* **83**, 1275–1278 (2011).
91. Siebrasse, E. A., Nguyen, N. L., Smith, C., Simmonds, P. & Wang, D. Immunohistochemical detection of KI polyomavirus in lung and spleen. *Virology* **468-470**, 178–184 (2014).
92. Bialasiewicz, S. *et al.* Presence of the newly discovered human polyomaviruses KI and WU in Australian patients with acute respiratory tract infection. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **41**, 63–68 (2008).
93. Agelli, M. & Clegg, L. X. Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. *J. Am. Acad. Dermatol.* **49**, 832–841 (2003).
94. Shuda, M. *et al.* T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 16272–16277 (2008).
95. Shuda, M., Kwun, H. J., Feng, H., Chang, Y. & Moore, P. S. Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *J. Clin. Invest.* **121**, 3623–3634 (2011).
96. Chastain, M. A. & Millikan, L. E. Pilomatrix dysplasia in an immunosuppressed patient. *J. Am. Acad. Dermatol.* **43**, 118–122 (2000).
97. Heaphy, M. R., Shamma, H. N., Hickmann, M. & White, M. J. Cyclosporine-induced folliculodystrophy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **50**, 310–315 (2004).
98. Sperling, L. C., Tomaszewski, M.-M. & Thomas, D. A. Viral-associated trichodysplasia in patients who are immunocompromised. *J. Am. Acad. Dermatol.* **50**, 318–322 (2004).
99. Osswald, S. S., Kulick, K. B., Tomaszewski, M.-M. & Sperling, L. C. Viral-associated trichodysplasia in a patient with lymphoma: a case report and review. *J. Cutan. Pathol.*

34, 721–725 (2007).

100. Zur Hausen, H. & Gissmann, L. Lymphotropic papovaviruses isolated from African green monkey and human cells. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **167**, 137–153 (1979).

101. Herrmann, M., Oppenländer, M. & Pawlita, M. Fast and high-affinity binding of B-lymphotropic papovavirus to human B-lymphoma cell lines. *J. Virol.* **69**, 6797–6804 (1995).

102. Sauvage, V. *et al.* Human Polyomavirus Related to African Green Monkey Lymphotropic Polyomavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1364–1370 (2011).

103. Csoma, E., Sápy, T., Mészáros, B. & Gergely, L. Novel human polyomaviruses in pregnancy: higher prevalence of BKPyV, but no WUPyV, KIPyV and HPyV9. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **55**, 262–265 (2012).

104. Lednicky, J. A., Butel, J. S., Luetke, M. C. & Loeb, J. C. Complete genomic sequence of a new Human polyomavirus 9 strain with an altered noncoding control region. *Virus Genes* **49**, 490–492 (2014).

105. Van der Meijden, E. *et al.* Human polyomavirus 9 infection in kidney transplant patients. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, (2014).

106. Laurendeau, I. *et al.* TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency. *Clin. Chem.* **45**, 982–986 (1999).

107. Bressollette-Bodin, C. *et al.* Cellular normalization of viral DNA loads on whole blood improves the clinical management of cytomegalovirus or Epstein Barr virus infections in the setting of pre-emptive therapy. *J. Med. Virol.* **81**, 90–98 (2009).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
ADNase:	Désoxyribonucléase
ADNc:	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADP:	Adénosine DiPhosphate
ADV:	Adénovirus
AgT:	Grand antigène T
agT:	Petit antigène T
ARN:	Acide RiboNucléique
ARNase:	Ribonucléase
ARNm:	Acide RiboNucléique messenger
BKPyV:	polyomavirus BK
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
CCM:	Carcinome Cellulaire de Merkel
ChPyV:	Chimpanzé polyomavirus
CMV:	Cytomégalovirus humain
CSH:	Cellules Souches Hématopoiétiques
CV:	Charge Virale
CV %:	Coefficient de variation exprimé en pourcentage
DTS:	Digital Transcriptome Subtraction
EBV:	Virus Epstein Barr
ECP:	Effet CytoPathogène
EDTA:	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ELISA:	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ET:	Ecart type
HPyV6:	polyomavirus humain 6
HPyV7:	polyomavirus humain 7
HPyV9:	polyomavirus humain 9
HPyV10:	polyomavirus humain 10
HPyV12:	polyomavirus humain 12
IC 95 %:	intervalle de confiance à 95 %
ICVT:	International Committee on Virus Taxonomy
IPPyV:	Institut Pasteur polyomavirus
IRM:	Imagerie par Résonnance Magnétique
JCPyV:	JC polyomavirus
kD:	kiloDalton
KIPyV:	Karolinska Institute polyomavirus
LEMP:	LeucoEncéphalopathie Multifocale Progressive
LPyV:	Lymphotropic polyomavirus
MCPyV:	Merkel Cell polyomavirus
miARN:	micro Acide RiboNucléique
mL:	millilitre
mM:	millimolaire
MWPyV:	Malawi polyomavirus
NBKV:	Néphropathie à polyomavirus BK
NCBI:	National Center for Biotechnology

ND:	non détecté
NF- κ B:	Nuclear Factor kappa B
NJPyV:	New Jersey polyomavirus
nm:	nanomètre
NT:	Non Testé
OBD:	Origin DNA Binding Domain
ORI:	Origine de répllication
pb:	paire de bases
PCR:	Polymerase Chain Reaction
pRb:	protéine associée au rétinoblastome
RCA:	Rolling Circle Amplification
RCNC:	Région Contrôle Non Codante
RT-PCR:	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
SIDA:	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
STLPyV:	Saint Louis polyomavirus
SV40:	Simian Vacuolating virus 40
TSPyV:	polyomavirus associé à la Trichodysplasie spinuleuse
μ L:	microlitre
μ M:	micromolaire
VIH:	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLP:	Virus Like Particules
WUPyV:	Washington University polyomavirus

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Liste des principaux virus oncogènes connus en 1963 avec l'année et l'auteur de leur découverte	12
Figure 2 : Échantillon d'urine contenant des particules de BKPyV observé en microscopie électronique	13
Figure 3 : Coupe fine de cellule gliale montrant des agrégats de particules virales chez un patient atteint de LEMP	14
Figure 4 : Pourcentages d'homologie partagés entre les séquences protéiques et génomiques du SV40, du BKPyV et du JCPyV.....	15
Figure 5 : Caractéristiques des virus membres du groupe des Papovavirus	16
Figure 6 : Frise chronologique résumant l'ensemble des polyomavirus humains identifiés à ce jour	16
Figure 7 : Illustration du fonctionnement d'une amorce universelle.....	18
Figure 8 : Micrographie électronique de kératinocytes montrant des particules de TSPyV	21
Figure 9 : Représentation schématisée du génome d'un polyomavirus humain.....	27
Figure 10 : Représentation de la structure des deux antigènes T.....	28
Figure 11 : Schéma de l'organisation de la Région Contrôle Non Codante de quatre souches de BKPyV	30
Figure 12 : Schéma du déroulement du cycle cellulaire dans une cellule permissive et dans une cellule non permissive.....	32
Figure 13 : Séroprévalence des polyomavirus humains dans la population générale.....	35
Figure 14 : Schéma du génome de l'HPyV9, d'après la séquence de référence HQ696595.1	43
Figure 15 : Pourcentage de patients ayant une PCR HPyV9 positive sur sérum et charges virales exprimées en nombre de copies par mL de sérum, entre 0 et 18 mois après transplantation rénale.....	45
Figure 16 : Proportion de résultats positifs pour l'HPyV9 en fonction du statut vis à vis du BKPyV.....	45
Figure 17 : Exemple de courbes réactionnelles obtenues sur le Rotor-Gene Q pour une gamme de témoin positif de raison dix (10^8 à 10^0 copies/ μ L)	50
Figure 18 : Schéma de la séquence du témoin positif, à partir de la séquence de l'HPyV9	51
Figure 19 : Droites d'étalonnage obtenues après amplification de VP1 et de l'AgT pour une gamme de témoin positif (dilutions de 10^8 à 10^1 copies/ μ L)	56
Figure 20 : Nuages de point représentant la dispersion des valeurs de Ct du gène de l'albumine et de l'IPC pour les 241 échantillons d'urines sélectionnés.....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Séquences des amorces et de la sonde ciblant le gène VP1	48
Tableau 2 : Séquences des amorces et de la sonde ciblant le gène AgT	49
Tableau 3 : Séquences des amorces et de la sonde ciblant le gène de l'albumine	49
Tableau 4 : Profil de la réaction d'amplification réalisée sur le Rotor-Gene Q	55
Tableau 5 : Ct obtenus pour différentes concentrations de témoin positif	55
Tableau 6 : Gradient de température réalisé sur le LightCycler® 96 Real-Time PCR pour la dilution 10 ² copies/μL de témoin positif.....	57
Tableau 7 : Comparaison des Ct obtenus lors de quatre séries de PCR VP1 et AgT à 56°C	59
Tableau 8 : Ct obtenus pour l'IPC co-amplifié avec le témoin positif	60
Tableau 9 : Résultats des tests de reproductibilité à partir de 14 expériences	61
Tableau 10 : Ct obtenus après ajout de témoin positif dans des urines	62
Tableau 11 : Délais de recueil des 245 prélèvements d'urines collectés.....	64
Tableau 12 : Résultats des charges virales BKPyV sanguines et urinaires des patients du groupe 1.....	65
Tableau 13 : Résultats des charges virales BKPyV urinaires des patients du groupe 2....	65
Tableau 14 : Ct obtenus pour l'amplification de l'IPC dans les 61 échantillons de sang total EDTA.....	66
Tableau 15 : Ct obtenus pour l'amplification de l'IPC et du gène de l'albumine dans les 241 échantillons d'urines analysés.....	67
Tableau 16 : Synthèse des publications rapportant la détection d'HPyV9 par PCR	75

SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

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

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

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

RÉSUMÉ

Introduction : Les polyomavirus humains sont des petits virus à ADN circulaire bicaténaire. A ce jour, treize espèces ont été identifiées chez l'homme. Ils sont largement répandus dans la population générale d'après leurs chiffres élevés de séroprévalence. En revanche, leur caractère pathogène ne s'exprime que chez des sujets immunodéprimés. Le BKPyV, le JCPyV et le MCPyV sont respectivement responsables de Néphropathie à BKPyV chez des sujets transplantés rénaux, de LeucoEncéphalopathie Multifocale Progressive chez des patients atteints d'hémopathies malignes et du Carcinome Cellulaire de Merkel chez des sujets âgés. Le polyomavirus humain de type 9 a été découvert en 2011 par Scuda et al. chez une patiente transplantée rénale.

Méthode : Nous avons étudié une cohorte de quatre-vingt-dix-neuf patients transplantés rénaux au CHU de Nantes entre octobre 2010 et novembre 2013. Les échantillons de sang total EDTA et d'urine étudiés ont tous été prélevés entre trois mois et neuf mois après transplantation. Une PCR spécifique ciblant une portion du gène VP1 de l'HPyV9 a été mise au point en utilisant un ADN synthétique. Après l'optimisation des conditions réactionnelles de la PCR en temps réel, cette technique a été appliquée à 61 prélèvements de sang total EDTA et à 245 prélèvements d'urine.

Résultats : Aucun des 61 prélèvements de sang total EDTA analysés n'a été détecté positif pour l'HPyV9 malgré une détection satisfaisante de l'IPC. Pour les échantillons d'urine, le gène de l'albumine et l'IPC ont été correctement amplifiés pour 241 prélèvements. En revanche, aucun échantillon n'a été détecté positif pour l'HPyV9.

Discussion : Cette absence de détection de l'HPyV9 ne nous a pas permis d'évaluer l'éventuel caractère pathogène que pourrait posséder l'HPyV9 chez des patients immunodéprimés, tels que les patients transplantés rénaux. Peut-on le considérer comme un pathogène opportuniste, ou fait-il partie d'une flore virale existant chez l'homme, ces éléments restent à déterminer, en renouvelant des travaux chez d'autres patients immunodéprimés et chez des patients immunocompétents.

Mots-clés : Polyomavirus humain 9 – Transplantation rénale – PCR en temps réel – Nouveaux Polyomavirus Humains