

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2018

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 MEDICALE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 14 mai 2018 à NANTES
par Mademoiselle MICHON Clémence

Optimisation d'une méthode de PCR quantitative en temps réel pour la détection
de tous les génotypes de BK polyomavirus humain

Composition du jury :

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

Membres : Madame le Professeur FERRE Virginie, PU-PH, CHU de Nantes

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

Directeur de thèse :

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

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2018

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 MEDICALE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 14 mai 2018 à NANTES
par Mademoiselle MICHON Clémence

Optimisation d'une méthode de PCR quantitative en temps réel pour la détection
de tous les génotypes de BK polyomavirus humain

Composition du jury :

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

Membres : Madame le Professeur FERRE Virginie, PU-PH, CHU de Nantes

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

Directeur de thèse :

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



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- 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
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

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

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

➤

Poste d'ATER

- JUIN Camille

Poste de Doctorant

- BERNARD Clément
- DOUMAS Manon

Un grand merci...

A Monsieur le Professeur Nicolas LEVEQUE, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Madame le Docteur Céline BRESSOLLETTE-BODIN, pour m'avoir confié ce travail, pour m'avoir encadré, toujours dans la bonne humeur, et m'avoir enseigné quelques secrets sur le BK polyomavirus. Sois assurée de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Virginie FERRE, pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Je vous suis sincèrement reconnaissante pour tous vos conseils au fil de mes études de pharmacie et au cours de cet internat.

A Madame le Docteur Marianne COSTE-BUREL, pour ton intérêt pour ce travail, ta volonté de transmettre ton savoir, avec le souvenir de ce très bon semestre, malgré trop de sérologies HTLV équivoques.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de virologie, pour leur bonne humeur et leur savoir-faire, et plus particulièrement :

A Brigitte, Caroline, Christelle, Fabienne, Florine et Malicia, pour avoir partagé leurs compétences techniques avec moi pour ce travail,

A Babeth, pour LA qualité et tes qualités, merci pour tout.

Aux différentes équipes avec lesquelles j'ai eu plaisir à travailler, à Brest, à Poitiers, à Nantes, ou à Saint Nazaire,

Notamment à Damien Ali pour une ambiance toujours musicale dans le bureau et tes encouragements.

A mes collègues internes pour tous ces bons moments partagés (et pour leur soutien dans les moins bons...), que ce soit à Brest, Poitiers ou Nantes et plus particulièrement :

A Rémi pour m'avoir supporté pendant 3 semestres et n'avoir (presque) jamais râlé, merci Uncle Tom pour tous ces instants de franche rigolade, je n'oublierai pas tes talents de joueur d'escalier,

A Sophie Guillou pour m'avoir prise sous son aile hémostasienne, je suis heureuse de compter aujourd'hui parmi tes amis, to be continued,

A Caroline, Céline, Clara, Kévin, Lauranne, parce qu'il y aura encore de bons moments à partager,

A Aurélie Fantou, pour ce rire exceptionnel, tous ces bons moments et ceux à venir,

A Emeline, pour les spectacles du midi, et un joli semestre devant nous,

A la team « bactério été 2017 », Adeline, Charles, Clélia, Pierre, Thomas, pour tous les FF matinaux, avec le sourire, mais juste un petit peu,

A Christophe et Thibaud, pour avoir été mes meilleurs soutiens pendant ces 6 premiers mois d'internat si particuliers.

A la promo Pharma Nantes 2014, aux Pharma Blabla, aux copains de près et de loin,

A Aurore, à Jess, à Lu, pas assez souvent, mais toujours là,

A tous ceux que j'oublie,

A Will, pour ta tendresse et ton soutien, et tout ce bonheur devant nous (et, non, désolée, le BK virus n'a vraiment rien à voir avec le Burger King...),

A ma famille,

A ma sœur, ma maman, ma nièce, simplement d'être là.

A mon papa, tu es parti trop tôt pour apprécier la clôture de ce parcours avec nous, ta présence nous manque cruellement. Pour ce chemin, plus long que prévu, parfois semé d'embûches, mais toujours soutenue. Nous arrivons au bout, enfin.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	2
LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX.....	4
LISTE DES ANNEXES.....	5
INTRODUCTION	6
I. LE BK POLYOMAVIRUS	8
A. Historique, famille des <i>Polyomaviridae</i>	8
B. Structure du BKPyV	10
1. Structure de la capside.....	10
2. Structure du génome.....	11
C. Cycle de réplication	12
1. Entrée du virus dans la cellule hôte	12
2. Réplication du génome viral.....	13
3. Persistance virale.....	13
D. Diversité génétique et antigénique chez le BKPyV.....	14
1. Génotypes de BKPyV et variabilité dans la région codant pour VPI.....	14
2. Variabilité dans la région codant pour l'AgT.....	16
3. Variabilité dans la NCCR.....	17
E. Pouvoir pathogène.....	17
1. Epidémiologie, tropisme tissulaire.....	17
2. Manifestations cliniques chez l'immunodéprimé	18
a) Néphropathie associée au BK polyomavirus (NBKV)	18
b) Cystite hémorragique	19
c) Sténose urétérale	20
d) Autres manifestations	20
3. Diagnostic de l'infection	21
a) Techniques sérologiques	21
b) Marqueurs directs	22
c) Diagnostic anatomopathologique.....	23
4. Prise en charge thérapeutique.....	25
II. TECHNIQUES MOLECULAIRES EN VIROLOGIE.....	27
A. Techniques de quantification de l'ADN viral appliquées au BKPyV	27
1. Techniques moléculaires en virologie et principe de la PCR	27
2. Détection en temps réel	29
3. Principe de la PCR quantitative et standards de quantification	30
4. Application à la quantification du BKPyV.....	31
B. Standard international de quantification de l'OMS	33
1. Mise au point du standard.....	33
2. Utilisation du standard international.....	36
C. Validation d'une méthode de biologie moléculaire	37
1. Principes généraux.....	37
2. Critères de qualité utilisés pour la validation de méthode.....	38
a) Fidélité analytique.....	39
b) Robustesse	40
c) Justesse – exactitude.....	40
d) Comparaison de méthodes	41
e) Etendue de mesure.....	41
f) Spécificité analytique	43
III. OBJECTIFS.....	45

IV. MATERIELS ET METHODES	46
A. Matériel.....	46
1. Patients.....	46
2. Prélèvements biologiques.....	46
3. Amorces et sondes utilisées	46
4. Thermocycleur.....	46
5. Contrôle interne	47
6. Composants du mélange réactionnel pour la PCR	47
7. Standard de quantification plasmidique.....	47
8. Contrôle de qualité interne.....	48
B. Méthodes.....	48
1. Extraction des acides nucléiques.....	48
2. Conception de nouvelles amorces	49
3. Amplification par PCR.....	50
4. Critères de validation de la PCR.....	51
V. RESULTATS	53
A. Optimisation de la technique existante	53
1. Choix des amorces.....	53
2. Détermination de la température d'amplification.....	54
B. Validation de méthode de PCR quantitative en virologie.....	55
1. Fidélité analytique.....	55
a) Répétabilité.....	55
b) Reproductibilité ou fidélité intermédiaire	56
2. Robustesse	57
3. Justesse – exactitude	57
4. Comparaison de méthodes	57
5. Etendue de mesure.....	59
a) Limite supérieure de linéarité.....	59
b) Limite de détection ou LOD	60
c) Limite de quantification ou LLOQ.....	61
6. Spécificité analytique	62
7. Incertitude de mesure	62
8. Contamination inter-échantillons.....	62
C. Standard international de quantification de l'OMS	63
D. Application au suivi des patients de la cohorte infectés par un BKPyV de génotype II ..	65
1. Patient LeG.....	65
2. Patient MeP.....	67
3. Patient ChD.....	69
4. Patient LeA.....	70
VI. DISCUSSION	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	79
ANNEXES	86
RÉSUMÉ.....	104

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFNOR	Association Française de Normalisation
Ag	Antigène
AMDEC	Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité
ARN	Acide ribonucléique
BHQ	Black Hole Quencher
BKPyV	BK polyomavirus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CE-IVD	Marquage CE des dispositifs médicaux de diagnostic <i>in vitro</i>
CMV	Cytomégalo virus humain
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
Cp	Nombre de copies
CQE	Contrôle de qualité externe
CQI	Contrôle de qualité interne
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
Ct	Cycle seuil
CV	Coefficient de variation
dNTP	Déoxynucléotides
DSA	<i>Donor-Specific antibodies</i>
EBV	Virus d'Epstein-Barr
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
FI/AT	Fibrose interstitielle / Atrophie tubulaire
HEK	<i>Human Embryo Kidney</i> (cellules rénales embryonnaires humaines)
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HHV6	Herpesvirus humain de type 6
HHV8	Herpesvirus humain de type 8
HPyV6	Human polyomavirus 6
HPyV7	Human polyomavirus 7
HPyV9	Human polyomavirus 9
HPyV12	Human polyomavirus 12
HSV1	Virus de l'Herpès simplex de type 1
HSV2	Virus de l'Herpès simplex de type 2
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IPC	Internal Positive Control
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
JCPyV	JC polyomavirus
KIPyV	KI polyomavirus

LCR	Liquide céphalo-rachidien
LC96	LightCycler®96
LEMP	Leucoencéphalopathie multifocale progressive
LIPyV	Lyon IARC polyomavirus
LLOQ	Limite basse de quantification
LOD	Limite de détection
LT	Lymphocytes T
MCPyV	Merkel cell polyomavirus
miARN	MicroARN
MMF	Mycophénolate mofétil
MWPyV	Malawi polyomavirus
NBKV	Néphropathie liée au BK polyomavirus
NCCR	Région régulatrice non codante
NCCRrr	Formes réarrangées
NCCRww	Formes archétypes
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NGS	Next Generation Sequencing
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
NJPyV	New Jersey polyomavirus
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pb	Paire de base
PBR	Ponction biopsie rénale
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
pRb	Protéine du rétinoblastome humain
QCMD	Quality Control for Molecular Diagnostics
qPCR	PCR quantitative
SE	Sang total EDTA
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
STLPyV	St Louis polyomavirus
SV40	Simian Virus 40
Tm	Température de fusion
TSPyV	Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus
UI	Unités Internationales
UR	Urines
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VZV	Virus de la varicelle et du zona
WHO	World Health Organization (ou OMS)
WUPyV	WU polyomavirus

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Arbre phylogénétique des <i>Polyomaviridae</i> humains	8
Figure 2 – Structure de la capside de BKPyV en cryo-microscopie électronique	10
Figure 3 – Structure du génome de BKPyV	11
Figure 4 – Répartition géographique des différents géotypes de BKPyV	15
Figure 5 – Répartition des géotypes de BKPyV au sein de la cohorte du CHU de Nantes ...	16
Figure 6 – Decoy cells observées en microscopie optique (coloration de Papanicolaou)	24
Figure 7 – Phases de la réaction de PCR.....	29
Figure 8 – Réaction utilisant les sondes d'hydrolyse TaqMan	30
Figure 9 – Etude préliminaire standard OMS : résultats en fonction de la matrice utilisée.....	35
Figure 10 – Phases d'un examen de biologie médicale	38
Figure 11 – Schéma d'illustration des critères de qualité d'une méthode d'analyse	39
Figure 12 – Etendue de mesure d'une méthode quantitative	42
Figure 13 – Essai en gradient de température : courbes d'amplification	54
Figure 14 – Comparaison de méthodes : droite de corrélation	58
Figure 15 – Calcul de la limite de détection : Probit analysis.....	61
Figure 16 – Protocole pour la détermination du facteur de conversion du standard NIBSC ...	63
Figure 17 – Analyse des patients de géotype II : suivi du patient LeG.....	66
Figure 18 – Analyse des patients de géotype II : suivi de la patiente MeP.....	68
Figure 19 – Analyse des patients de géotype II : suivi du patient ChD	69
Figure 20 – Suivi de la créatininémie du patient LeA (en $\mu\text{mol/L}$)	71
Figure 21 – Analyse des patients de géotype II : suivi du patient LeA.....	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Classification ICTV 2016 des Polyomavirus humains.....	9
Tableau 2 – Facteurs de risque de néphropathie à BKPyV	19
Tableau 3 – Classification anatomopathologique des NBKV	25
Tableau 4 – Kits commerciaux de détection et de quantification de l’ADN de BKPyV	32
Tableau 5 – Caractéristiques des candidats standards NIBSC	33
Tableau 6 – Caractéristiques des échantillons testés par les laboratoires participants.....	34
Tableau 7 – Séquences et caractéristiques des amorces et de la sonde (technique initiale).....	49
Tableau 8 – Séquences et caractéristiques des amorces conçues	50
Tableau 9 – Nomenclature internationale des bases dites « dégénérées »	50
Tableau 10 – Composants du mélange réactionnel pour la PCR	51
Tableau 11 – Comparaison des couples d’amorces : Valeurs des cycles seuils (Ct) et des concentrations calculées.....	53
Tableau 12 – Essai en Gradient de température : valeurs de Ct.....	55
Tableau 13 – Essai de répétabilité.....	56
Tableau 14 – Essai de reproductibilité	56
Tableau 15 – Comparaison de méthodes : échantillons utilisés.....	58
Tableau 16 – Comparaison de méthodes : résultats par génotype	59
Tableau 17 – Essai de linéarité.....	60
Tableau 18 – Calcul de la limite de détection : résultats obtenus avec la gamme « faible » ...	60
Tableau 19 – Détermination du facteur de conversion	64
Tableau 20 – Différences de quantification selon le pré-traitement des urines	64

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 – Alignement des séquences des amorces et de la sonde sur les séquences GenBank des différents génotypes de BKPyV.....	86
Annexe 2 – Maîtrise des risques, étude AMDEC	95
Annexe 3 – Dossier de validation de méthode qPCR BKPyV	99
Annexe 4 – Table de Finney (1952).....	103

INTRODUCTION

Le BK polyomavirus est un petit virus à ADN, membre de la famille des *Polyomaviridae*, découvert en 1971 chez un patient greffé rénal. Ce virus présente une séroprévalence élevée en population générale, mais n'est à l'origine de pathologies identifiées que chez certains patients immunodéprimés parmi lesquels, principalement : les greffés rénaux, les allogreffés de cellules souches hématopoïétiques ou les patients infectés par le VIH au stade SIDA.

Le suivi de la réplication du BKPyV chez ces patients se fait par quantification de l'ADN viral dans le sang et les urines. Les techniques de PCR quantitatives ont été développées en utilisant comme séquences de référence celles de souches comme Dunlop ou d'autres souches de génotype I. Depuis, les connaissances sur la diversité génomique de BKPyV se sont accrues. Au laboratoire de Virologie du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, la technique *in-house* de PCR quantitative en temps réel a été mise au point en 2003 (Bressollette-Bodin et al., 2005). Les résultats d'une évaluation inter-laboratoire nationale ont par la suite montré que, malgré une performance satisfaisante de la technique pour les génotypes les plus fréquents, celle-ci sous-quantifiait le génotype II d'environ 3 log₁₀ copies/mL. Ce constat nous a amené à concevoir de nouvelles amorces qui permettraient de quantifier convenablement le génotype II tout en conservant les performances de la technique sur les autres génotypes de BKPyV.

D'un point de vue technique, les amorces sélectionnées ont été testées afin de déterminer les conditions optimales d'amplification. Par la suite, nous avons procédé à la validation de méthode de la technique en vue d'une accréditation par le Comité Français d'Accréditation en décembre 2017. Le standard international de quantification mis au point par l'OMS a été testé avec notre technique, dans le but d'uniformiser les résultats quantitatifs rendus entre les différentes techniques utilisées en routine dans les laboratoires.

D'un point de vue clinique, l'impact de cette sous-quantification du génotype II a été étudié chez les patients connus infectés par un BKPyV de génotype II dans la cohorte du CHU de Nantes.

I. LE BK POLYOMAVIRUS

A. Historique, famille des *Polyomaviridae*

Le BK polyomavirus (BKPyV) appartient à la famille des *Polyomaviridae*, initialement considérée comme un sous-groupe des *Papovaviridae* jusqu'à 1999 (van Regenmortel et al., 2000). Le BKPyV a été nommé selon les initiales d'un patient greffé rénal, chez qui il a été isolé pour la première fois en 1971, par mise en culture de ses urines sur des cellules de rein de singe. Ce patient était alors traité par immunosuppresseurs et présentait une sténose urétérale (Gardner et al., 1971).

La famille des *Polyomaviridae* comprend aussi le JC polyomavirus, isolé la même année du cerveau d'un patient décédé de leucoencéphalopathie multifocale progressive (Padgett et al., 1971). Au fil des années, d'autres *Polyomaviridae* humains ont été identifiés, pour autant, tous ne sont pas associés à un pouvoir pathogène chez l'Homme (Figure 1 et Tableau 1). Un quatorzième polyomavirus humain potentiel a été identifié récemment, le LIPyV, à partir d'échantillons cutanés, de gargarismes et de prélèvements de follicules pileux du sourcil (Gheit et al., 2017).

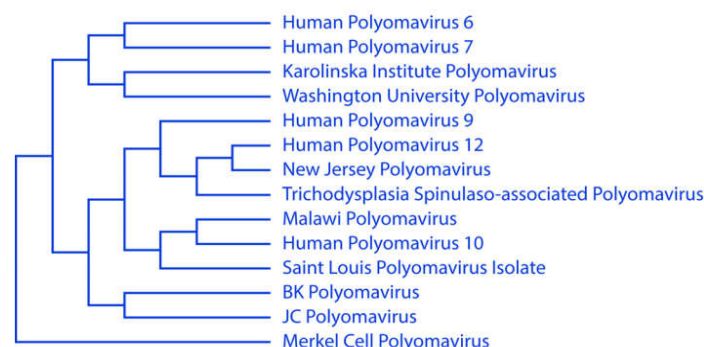


FIGURE 1 – ARBRE PHYLOGENETIQUE DES *POLYOMAVIRIDAE* HUMAINS

(Ambalathingal et al., 2017)

Les *Polyomaviridae* sont classés en 4 genres : *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* et *Deltapolyomavirus* selon la classification ICTV de 2016 (Calvignac-Spencer et al., 2016). Le premier *Polyomaviridae* découvert est le Simian vacuolating virus 40 (SV40) chez le macaque Rhésus, il présente une forte homologie avec le BKPyV.

Nom du virus	Abréviation	Source	Pathologies associées	Première publication
Famille des <i>Polyomaviridae</i>				
Genre <i>Alphapolyomavirus</i>				
Merkel cell polyomavirus	MCPyV ou HPyV5	Peau	Carcinome à cellules de Merkel	Feng et al., 2008
Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus	TSPyV ou HPyV8	Peau	Trichodysplasie spinulosa	Meijden et al., 2010
Human polyomavirus 9	HPyV9	Peau, sang, urine		Scuda et al., 2011
Human polyomavirus 12	HPyV12	Tractus digestif		Korup et al., 2013
New Jersey polyomavirus	NJPyV ou HPyV13	Cellules endothéliales (muscle)	Myosite	Mishra et al., 2014
Genre <i>Betapolyomavirus</i>				
BK polyomavirus	BKPyV ou HPyV1	Urine, tissu rénal	Néphropathie associée au BKPyV, cystite hémorragique, etc.	Gardner et al., 1971
JC polyomavirus	JCPyV ou HPyV2	LCR, tissu cérébral	LEMP	Padgett et al., 1971
Karolinska Institute polyomavirus	KIPyV ou HPyV3	Tissu nasopharyngé		Allander et al., 2007
Washington University polyomavirus	WUPyV ou HPyV4	Tissu nasopharyngé		Gaynor et al., 2007
Genre <i>Deltapolyomavirus</i>				
Human polyomavirus 6	HPyV6	Peau		Schowalter et al., 2010
Human polyomavirus 7	HPyV7	Peau		Schowalter et al., 2010
Malawi polyomavirus	MWPyV ou HPyV10	Verrue, selles		Siebrasse et al., 2012
St Louis polyomavirus 19	STLPyV ou HPyV11	Selles		Lim et al., 2013

TABEAU 1 – CLASSIFICATION ICTV 2016 DES POLYOMAVIRUS HUMAINS

(D'après DeCaprio and Garcea, 2013 et Calvignac-Spencer et al., 2016)

B. Structure du BKPyV

Les virus de la famille des *Polyomaviridae* partagent des structures virales proches : il s'agit de petits virus à ADN non enveloppés d'une taille de 40 à 45 nm de diamètre avec un haut niveau d'homologie génétique.

1. Structure de la capside

Le BKPyV présente une capside icosaédrique (T=7) de petite taille, composée de trois protéines virales de structure : VP1, VP2 et VP3. Cette capside comporte 360 molécules VP1 organisées en 72 pentamères, chacun d'entre eux étant lié à une protéine mineure de capside (VP2 ou VP3). VP1 est la seule protéine virale exposée à l'extérieur du virion, tandis que VP2 et VP3 se situent à la face interne de la capside virale (Figure 2). VP1 est en effet responsable de l'attachement de la particule virale aux récepteurs de la cellule hôte et est donc impliquée dans l'entrée du virus dans la cellule hôte. VP2 et VP3, quant à elles, seraient en contact avec les protéines histones et avec l'ADN génomique (Hurdiss et al., 2016) mais leur rôle précis reste encore à démontrer.

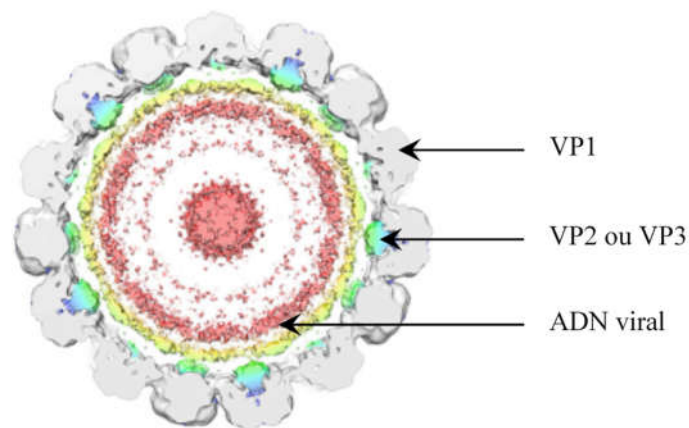


FIGURE 2 – STRUCTURE DE LA CAPSIDE DE BKPYV EN CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

(D'après Hurdiss et al., 2016)

2. Structure du génome

Le génome des *Polyomaviridae* est composé d'une seule molécule d'ADN bicaténaire circulaire (environ 5000 paires de bases) super-enroulée *via* l'association à des histones cellulaires (H2A, H2B, H3 et H4). Le génome de BKPyV comporte trois régions : une région codante précoce, une région codante tardive, ainsi qu'une région régulatrice non codante (NCCR) (Figure 3).

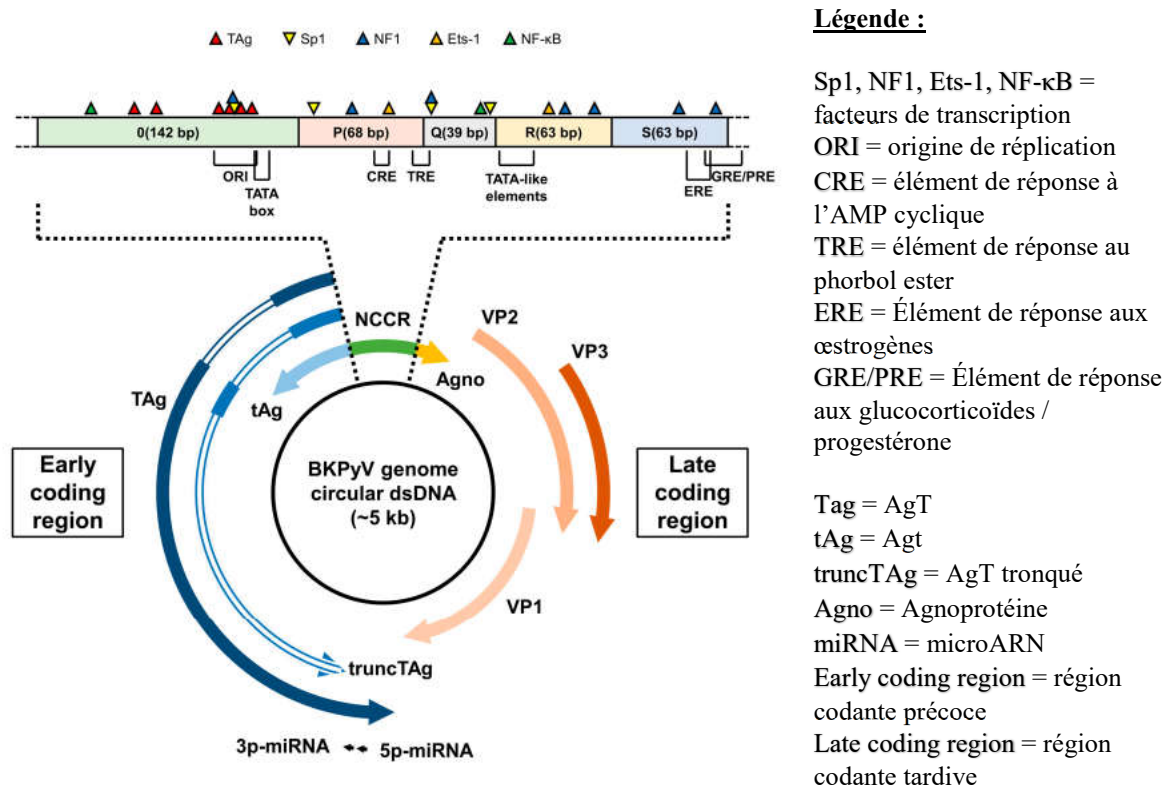


FIGURE 3 – STRUCTURE DU GENOME DE BKPYV

(Helle et al., 2017)

La région codante **précoce** contient les gènes codant pour trois protéines multifonctionnelles : l'antigène T (AgT, ou LTA pour *large T antigen*), l'antigène T tronqué et l'antigène t (Agt, ou STA pour *small t antigen*). Grâce à un phénomène d'épissage alternatif, ces trois protéines sont obtenues à partir d'un gène commun et partagent une extrémité N-terminale identique de 81 aa.

La région codante **tardive** contient les gènes codant pour l'agnoprotéine (protéine régulatrice) ainsi que pour les protéines structurales virales VP1, VP2 et VP3. Ces protéines structurales sont obtenues à partir d'un même transcrit primaire après épissage alternatif.

La région **NCCR** est située entre le codon d'initiation pour l'AgT et le site d'initiation pour l'agnoprotéine. Cinq blocs de séquences la composent : O (142 pb), P (68 pb), Q (39 pb), R (63 pb) et S (63 pb) (White et al., 2009). La NCCR est une région hypervariable portant des sites de liaison pour des facteurs de régulation cellulaires de l'hôte. La réplication se fait dans deux directions opposées à partir de l'origine de réplication unique ORI, située dans la séquence O, hautement conservée. Cette séquence O comprend aussi le site d'initiation de la transcription des gènes précoces, des sites de fixation pour l'AgT et un site de fixation pour NF- κ B. Les blocs P, Q et R portent des sites de fixation pour les facteurs de transcription cellulaires, il s'agit d'une région activatrice. La séquence S, hautement conservée, contient le site d'initiation de la transcription des gènes tardifs, un élément de réponse aux glucocorticoïdes/progestérone (GRE/PRE) et un élément de réponse aux œstrogènes (ERE).

C. Cycle de réplication

1. *Entrée du virus dans la cellule hôte*

Le BKPyV entrerait dans la cellule hôte par endocytose en utilisant la voie des cavéolines – invaginations de la membrane plasmique cellulaire – (Moriyama et al., 2007), contrairement aux autres *Polyomaviridae* qui utilisent une médiation par les clathrines. La protéine majeure de capsid VP1 formerait une fissure entre les boucles BC1 et BC2, rendant possible la liaison aux motifs acides disialiques α 2-8 sur les gangliosides GD1b et GT1d exprimés sur la membrane des cellules épithéliales rénales (Low et al., 2006). Après internalisation, le BKPyV atteindrait le réticulum endoplasmique en utilisant les microtubules, cette étape provoquant la décapsidation intracellulaire du virus avec la perte de VP1 (Jiang et

al., 2009). Les protéines mineures de capsid VP2 et VP3, exposées à la surface, permettraient l'entrée dans le noyau de la cellule hôte *via* l'importine (Nakanishi et al., 2002, 2007). À ce stade, le génome se trouverait sous forme épisomale dans les cellules humaines, alors qu'il est intégré à l'ADN cellulaire chez le rongeur.

2. Réplication du génome viral

La réplication de l'ADN viral se fait à partir de l'origine de réplication ORI, localisée au niveau de la région NCCR, et de manière bidirectionnelle. Les régions précoces sont transcrites avant le début de la réplication, ce qui permet l'accumulation d'AgT et d'Agt dans le noyau, aidant la réplication de l'ADN viral. Pendant la réplication de l'ADN viral, l'AgT forme un complexe multimérique qui se lie à l'origine de réplication et qui agit comme une hélicase pour faciliter la transcription des régions tardives. L'AgT est une molécule régulatrice clé qui lie les protéines suppressives de tumeurs (pRb, p107, p130, p53) et qui permet le passage du cycle cellulaire en phase S.

Les régions tardives sont exprimées seulement après le début de la réplication, elles codent pour des protéines de structure impliquées dans la formation de la particule virale ainsi que pour l'agnoprotéine. Les protéines de capsid (VP1, VP2 et VP3) sont produites dans le cytoplasme et recrutées dans le noyau grâce à des signaux de localisation nucléaire attachés aux protéines, permettant ainsi l'assemblage des particules virales et leur accumulation nucléaire.

3. Persistance virale

L'infection à BKPyV persiste tout au long de la vie chez l'hôte au niveau du tractus réno-urinaire par un mécanisme qui reste incertain à l'heure actuelle, il pourrait s'agir : soit d'une latence vraie du virus dans la cellule hôte, sans réplication, soit le virus pourrait maintenir un faible niveau d'expression génique. Le BKPyV code pour des microARN (miARN) qui agissent comme des régulateurs de la réplication virale. Un haut niveau d'expression de miARN

complémentaires à l'extrémité 3' de l'ARNm de l'AgT est responsable du contrôle de la réplication virale en agissant sur les mécanismes d'autorégulation (Broekema and Imperiale, 2013). De l'ADN de BKPyV a pu être isolé à partir de leucocytes, de prélèvements de cerveau et de ganglions lymphatiques, pouvant indiquer d'autres sites de persistance virale (Chatterjee et al., 2000; Vago et al., 1996).

D. Diversité génétique et antigénique chez le BKPyV

1. Génotypes de BKPyV et variabilité dans la région codant pour VP1

Il existe 4 génotypes de BKPyV (I, II, III et IV), identifiés sur le polymorphisme du gène codant pour la protéine de capsid VP1 (Jin et al., 1993; Krumbholz et al., 2008). La partie hypervariable se situe dans la région N terminale (aa 61 à aa 82) et est impliquée dans les interactions avec les récepteurs de type ganglioside, ainsi que dans la reconnaissance par les Ac neutralisants. Ces génotypes correspondent avec les différents sérotypes, mais le rôle de cette diversité antigénique dans l'évolution du BKPyV reste à déterminer. Le génotype I est le principal génotype retrouvé à travers le monde, de manière ubiquitaire, avec une séroprévalence de 46 à 82%, alors que le génotype IV, le deuxième génotype retrouvé en termes de séroprévalence, est communément associé aux populations du Nord-Est asiatique et d'Europe (Figure 4). Les génotypes II et III sont, quant à eux, plus rares (Luo et al., 2008). Les implications cliniques et immunologiques de l'existence de ces différents génotypes et sous-groupes restent, à ce jour, à éclaircir.

Le génotype I peut être divisé en sous-groupes Ia, Ib-1, Ib-2, et Ic sur la base de variations dans la séquence de l'ADN viral. Chacun de ces sous-groupes est relié à une région géographique : Ia à l'Afrique, Ib-1 au Sud-Est asiatique, Ib-2 à l'Europe et Ic au Nord-Est asiatique (Zheng et al., 2007). Le génotype IV est lui aussi subdivisé en sous-groupes : IVa-1, IVa-2, IVb-1, IVb-2, IVc-1 et IVc-2. Le génotype IVc-2 est le principal retrouvé chez les

Européens et les Américains, tandis que les autres sous-groupes du génotype IV sont retrouvés chez les populations asiatiques. Cette répartition géographique soutient la théorie de la co-migration du BKPyV avec les populations humaines (Zhong et al., 2009).

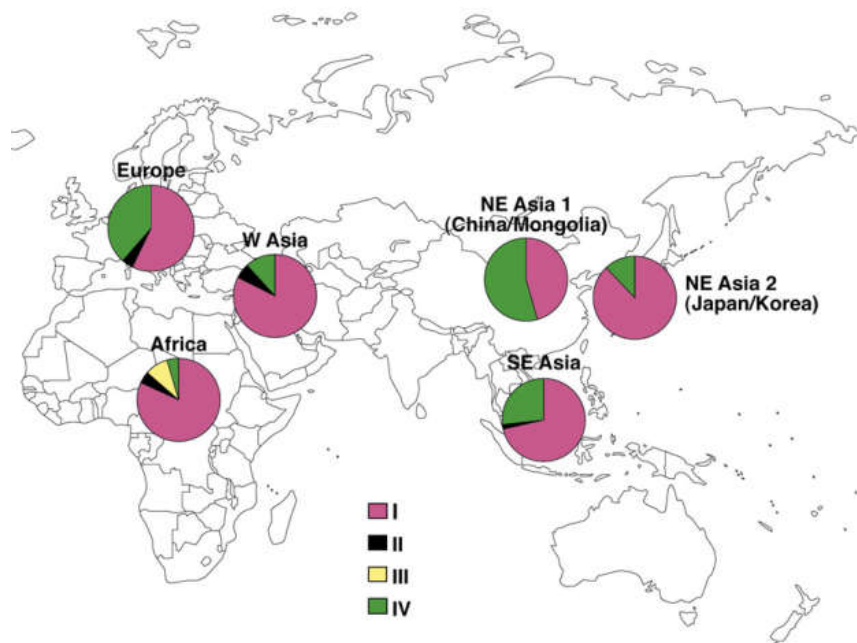


FIGURE 4 – REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES DIFFERENTS GENOTYPES DE BKPyV

(Zheng et al., 2007)

Cette répartition est également retrouvée chez les patients greffés rénaux et allogreffés de moelle osseuse du CHU de Nantes. Chez 178 patients, ayant bénéficié d'un séquençage dans la région du gène codant pour la protéine VP1, les génotypes Ib-1, Ib-2 et IV sont les plus fréquents, le génotype II est identifié chez 4 patients sur 178, et aucun génotype Ic ou III n'est détecté (Figure 5).

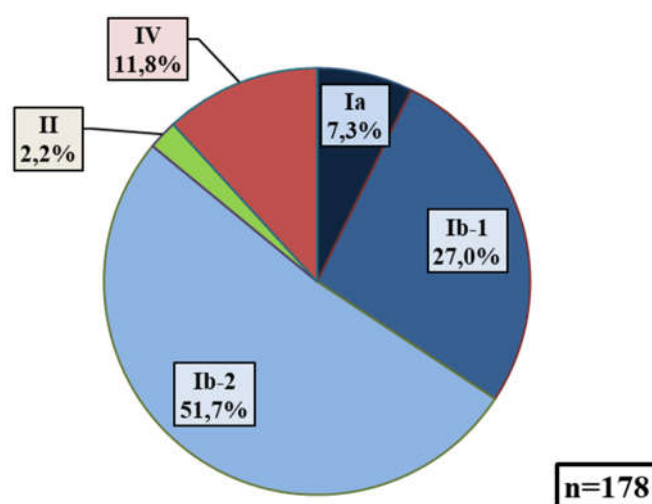


FIGURE 5 – REPARTITION DES GENOTYPES DE BKPyV AU SEIN DE LA COHORTE DU CHU DE NANTES

2. Variabilité dans la région codant pour l'AgT

La région codant pour l'AgT joue un rôle central dans le cycle du BKPyV en stimulant la réplication de l'ADN viral, en contrôlant l'expression des gènes précoces et tardifs et en assurant un environnement moléculaire optimal pour le virus en modulant l'expression d'un grand nombre de gènes cellulaires. En revanche, peu d'études se sont intéressées à la diversité dans la région codant l'AgT chez BKPyV, mais davantage chez SV40.

La souche Cin de BKPyV, identifiée chez un patient au stade SIDA et atteint d'une insuffisance rénale terminale, a montré une mutation Q169L dans le domaine de liaison à l'ADN de l'AgT (Smith et al., 1998). Chez SV40, cette mutation stabiliserait la liaison de l'AgT à l'ADN. Une autre étude a comparé les séquences en acides aminés entre 15 souches et la souche de référence Dunlop, ces souches ont montré de multiples mutations ponctuelles dont I217T et S260N, sans que l'impact de ces mutations ne soit investigué (Chen et al., 2004). Une étude de 2016, s'intéressant au virome des patients greffés rénaux a étudié le polymorphisme des souches de BKPyV retrouvés dans les urines de ces patients par NGS (Next-Generation Sequencing) et a identifié deux substitutions d'aa dans la région codant l'AgT : Leu→Pro et Ser→Gly. La prédiction de la structure tridimensionnelle protéique suggère qu'elles puissent

être à l'origine de modifications de la fonction de l'AgT (Rani et al., 2016). Des arbres phylogénétiques basés sur le gène codant l'AgT sont superposables aux arbres basés sur le gène codant VP1, et donc avec la diversité génotypique (Luo et al., 2009).

3. Variabilité dans la NCCR

La région NCCR présente un haut degré de variabilité génétique, par des réarrangements génétiques à type d'insertions-délétions, permettant de distinguer les souches natives archétypes (NCCRww) des souches réarrangées (NCCRrr). La forme archétype serait la forme à l'origine de la transmission du virus, étant détectée dans l'urine des sujets sains et dans celle des sujets ayant une infection active à BKPyV. Les variants NCCRrr semblent apparaître en cas de virémie prolongée et seraient associés à une réplication non contrôlée du virus, jusqu'à devenir dans certains cas la population virale dominante (Gosert et al., 2008). Les formes réarrangées ont une capacité répliquative augmentée *in vitro*, les associant *in vivo* à des charges virales plasmatiques plus élevées et des lésions histologiques plus sévères que les formes NCCRww. Il est possible, chez un même patient de détecter plusieurs quasi-espèces (Olsen et al., 2009). Les formes réarrangées peuvent être obtenues *in vitro* par passages successifs d'une souche archétype isolée d'un prélèvement urinaire sur culture de cellules HEK (Rubinstein et al., 1991).

E. Pouvoir pathogène

1. Épidémiologie, tropisme tissulaire

L'infection par BKPyV est commune dans l'enfance, avec une séroprévalence de 70% à l'âge de 10 ans, atteignant 80% en population générale (Knowles, 2006). L'infection primaire est généralement asymptomatique bien qu'il ait été suggéré qu'elle soit à l'origine de troubles respiratoires modérés (Goudsmit et al., 1982).

Le moyen de transmission du BKPyV est encore incertain. L'hypothèse d'une transmission respiratoire est appuyée par la détection d'ADN viral au sein du tractus respiratoire et des amygdales chez les enfants. Le virus atteindrait la circulation sanguine via le tissu amygdalien infecté, ce qui lui permettrait d'infecter les cellules mononucléées du sang périphérique, conduisant à la dissémination du virus vers des sites secondaires d'infection (dont l'épithélium rénal) (Chatterjee et al., 2000).

Après l'infection primaire, le virus persiste à vie sous forme épisomale dans ces sites secondaires, notamment dans le tractus urogénital (cellules tubulaires rénales et uroépithélium) ; d'autres sites de persistances ont été suggérés : le système nerveux central (Vago et al., 1996) ou les organes lymphoïdes (Chatterjee et al., 2000). Le virus ne provoque pas de pouvoir pathogène chez l'individu immunocompétent (Doerries, 2006) : dans certains cas, une virurie occasionnelle et asymptomatique pourra être détectée. En revanche, des réactivations ayant un retentissement clinique peuvent survenir chez le sujet immunodéprimé.

2. Manifestations cliniques chez l'immunodéprimé

Les principales manifestations cliniques liées au BKPyV surviennent chez les patients immunodéprimés. Les receveurs d'une greffe rénale peuvent présenter une néphropathie liée au BKPyV ou une sténose urétérale, tandis que les receveurs d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques peuvent présenter une cystite hémorragique.

a) Néphropathie associée au BK polyomavirus (NBKV)

Il s'agit d'une néphropathie tubulo-interstitielle survenant habituellement dans les 6 à 24 mois suivant une transplantation rénale avec une incidence de 1 à 7% la première année suivant la greffe (Ambalathingal et al., 2017) ; plus rarement, elle peut s'observer chez des receveurs d'organes solides autres que le rein.

L'histoire naturelle de l'infection débute par une réplication virale au niveau des cellules épithéliales du tractus réno-urinaire. Cette réplication peut s'objectiver par la détection d'une virurie, le patient restant cliniquement asymptomatique. En l'absence de contrôle par le système immunitaire, une réplication virale intense et prolongée peut provoquer une lyse des cellules épithéliales et des lésions de la membrane basale, aboutissant à l'apparition d'une virémie. Si la réplication virale persiste, la fonction rénale se détériore, avec la détection d'une virémie élevée. Les facteurs de risque de développer une NBKV sont présentés dans le Tableau 2, le facteur de risque principal étant le degré d'immunosuppression du patient.

Facteurs de risque de NBKV	
Liés au donneur	- Donneur décédé - Taux élevé d'Ac anti-BKPyV (lié à une exposition récente) - Nombre de mismatches HLA donneur/receveur - Polymorphisme génétique : mutations du gène MICA, mismatch donneur/receveur
Liés au receveur	- Âge élevé - Sexe masculin - Taux faible d'Ac anti-BKPyV, ou séronégativité (rare) - Polymorphisme génétique ?
Liés à la greffe	- Stents urétéraux - Co-infection virale - Exposition intense et/ou prolongée aux corticoïdes (notamment traitement des épisodes de rejet) - Traitements déplétants pour les lymphocytes - Doses élevées d'immunosuppresseurs - Association tacrolimus – MMF - Faible réponse immunitaire spécifique médiée par les lymphocytes T

TABLEAU 2 – FACTEURS DE RISQUE DE NEPHROPATHIE A BKPyV

(D'après Mazalrey et al., 2015; Tonnerre et al., 2016)

b) Cystite hémorragique

Le BKPyV est associé à la survenue de cystites hémorragiques principalement après une allogreffe de CSH. La clinique comporte une dysurie, des douleurs sus-pubiennes et différents degrés d'hématurie. Cette hématurie peut provoquer l'apparition de caillots, d'obstruction des voies urinaires, d'hémorragies et de défaillance rénale. Son incidence est de l'ordre de 5 à 15% des patients dans les deux mois suivant l'allogreffe (Dropulic and Jones, 2008). La difficulté

est diagnostique, puisque chez ces patients, d'autres causes peuvent être à l'origine d'une cystite hémorragique : soit toxiques (chimiothérapie, notamment contenant du cyclophosphamide), soit infectieuses (CMV, Adénovirus).

La cystite hémorragique serait la résultante de lésions de l'urothélium en lien avec certains traitements d'induction, associées à la réactivation virale lors de la phase d'aplasie, menant finalement à une réaction inflammatoire avec infiltrat lymphocytaire et destruction des cellules infectées au moment de la prise de greffe (LT cytotoxiques). Le diagnostic repose sur la détection de l'ADN de BKPyV dans les urines avec une virurie détectable chez environ 50% des greffés de CSH ; en cas de forte virurie, voire de virémie, le risque de développer une cystite hémorragique est plus important. Les réactivations de BKPyV seraient plus fréquentes avec les protocoles de greffe plus récents : cellules de sang de cordon, greffe de cellules souches haploidentiques (Gilis et al., 2014).

c) Sténose urétérale

Il s'agit de la forme clinique retrouvée chez le premier patient chez qui le BKPyV a été isolé (Gardner et al., 1971). Elle a par la suite été décrite chez des greffés de rein adultes ou pédiatriques, et chez des allogreffés de CSH.

d) Autres manifestations

D'autres manifestations cliniques, moins fréquentes, liées au BKPyV, ont été décrites, notamment pulmonaires ou neuroméningées chez des patients immunodéprimés ou présentant une comorbidité, comme l'infection par le VIH par exemple. Chez ces derniers, le BKPyV peut être impliqué dans une pathologie des glandes salivaires associant une inflammation (infiltrat lymphocytaire) à une fibrose (Burger-Calderon et al., 2014; Jeffers and Webster-Cyriaque, 2011).

L'oncogénicité potentielle du BKPyV est un sujet controversé, le lien entre ce virus et le cancer de la prostate et certaines tumeurs urothéliales est discuté (Dalianis and Hirsch, 2013). Les AgT et Agt peuvent théoriquement initier une transformation néoplasique en inhibant des répresseurs de tumeurs tels que p53 et pRb, ce qui augmenterait la prolifération cellulaire (Abend et al., 2009). Des complexes p53-AgT ont pu être détectés dans du tissu prostatique cancéreux, donc le BKPyV serait potentiellement un facteur de risque (Das et al., 2004). L'Agt favoriserait l'activation des MAP-kinases, ce qui contribuerait aussi à la prolifération cellulaire (Sontag et al., 1993). Il a été démontré que le génome viral persistait sous forme intégrée au génome cellulaire chez les rongeurs (Tognon et al., 2003), mais cela reste encore à démontrer chez l'Homme à l'heure actuelle. Récemment, dans un cas clinique de tumeur du greffon rénal, une intégration du génome de BKPyV à l'ADN cellulaire de la tumeur a été mise en évidence (Kenan et al., 2017). Le BKPyV est actuellement classé dans la catégorie 2B de la classification IARC, c'est-à-dire qu'il est considéré comme « peut-être cancérigène pour l'Homme » (Bouvard et al., 2012).

3. Diagnostic de l'infection

a) Techniques sérologiques

Les sérologies virales ne présentent pas d'intérêt majeur dans le suivi des patients transplantés en raison de la séroprévalence élevée (supérieure à 80% de la population) vis-à-vis du BKPyV. De plus, il n'existe pas de technique commerciale de détection des anticorps spécifiques de BKPyV.

Une étude a montré que les taux d'IgG spécifiques de BKPyV augmentaient significativement chez les transplantés rénaux présentant une virémie et d'autant plus que la virémie était élevée, tandis qu'il restait stable chez les patients sains et chez les transplantés rénaux non virémiques (Wunderink et al., 2017). Une autre étude s'est quant à elle intéressée aux anticorps neutralisants dirigés contre les différents génotypes de BKPyV. Elle a permis de

montrer que le risque de virémie, voire de NBKV, était augmenté en cas de réponse anticorps faible et retardée chez le receveur ou de mismatch entre les génotypes de la souche du donneur et de la souche répliquant chez le receveur (Solis et al., 2018).

b) Marqueurs directs

Quantification de l'ADN viral

La détection et la quantification de l'ADN viral dans les urines, dans le sang ou dans le plasma est la référence dans le suivi de la réactivation chez les patients transplantés. Une virémie prolongée chez un receveur de greffon rénal est associée à un risque élevé de développer une néphropathie liée au BKPyV. Une étude prospective (Hirsch et al., 2002) a montré que tous les receveurs présentant une NBKV avaient une charge virale plasmatique supérieure à 7700 cp/mL, c'est pourquoi le seuil de 4 log₁₀ cp/mL a été retenu comme seuil d'intervention thérapeutique (Hirsch et al., 2013). Les techniques de quantification moléculaire ont des performances généralement excellentes (kits commerciaux ou techniques « maison ») mais ne sont pas comparables entre elles, ce qui implique que le suivi d'un patient doit être effectué dans un même centre (Hoffman et al., 2008). Ce constat a amené l'OMS à développer un standard international de quantification du BKPyV grâce à une étude collaborative (voir paragraphe B. Standard international de quantification de l'OMS, page 33). Les caractéristiques des kits commercialisés sont comparées dans le Tableau 4 (page 32).

Quantification de l'ARNm de BKPyV

En transplantation rénale, des équipes de recherche s'intéressent aux ARNm urinaires comme source de biomarqueurs, l'étude du transcriptome étant le reflet de l'expression d'un gène, donc dans le cas d'un virus, de sa réplication active. La source principale d'ARNm urinaires est l'apoptose ou la nécrose des cellules du tractus urinaire. Dans ce contexte, la détection et/ou la quantification des ARNm de BKPyV dans les urines a été étudiée, notamment des ARNm codant pour VP1 (Dadhania et al., 2010). La quantification seule des ARNm de

BKPyV n'apporte pas de bénéfice par rapport à la quantification de son ADN (Astegiano et al., 2011). En revanche, l'utilisation des ARNm soulève des contraintes techniques liées à leur fragilité – contraintes de conservation des échantillons – ainsi qu'à la présence de RNases dans l'environnement, y compris dans l'urine humaine.

Haufen test

Le Polyomavirus-Haufen test est un biomarqueur non invasif utilisé dans la prédiction des NBKV avec une valeur prédictive positive supérieure à 90%. Il consiste en la détection d'agrégats (« *haufen* » en allemand) de BKPyV en microscopie électronique dans l'urine. Ces agrégats se forment dans les tubules rénaux à cause de la réplication virale, de la lyse cellulaire et de la libération de virions néoformés dans la lumière tubulaire. Il s'agit d'un outil pour le diagnostic d'une atteinte tissulaire (Singh et al., 2015).

c) Diagnostic anatomopathologique

La recherche des decoy cells dans les urines est outil non invasif de dépistage des infections à BKPyV. Les decoy cells sont un marqueur de réactivation et de réplication virale, en lien avec des charges virales élevées (Hirsch et al., 2009). Ce sont des cellules urothéliales infectées par BKPyV, dystrophiques et volumineuses. Elles sont observées après coloration de Papanicolaou (Figure 6), présentent une hyperbasophilie et contiennent de gros noyaux homogènes avec un aspect en verre dépoli donc l'inclusion centrale semble occuper tout le noyau. Il existe un risque de confusion avec certaines cellules carcinomateuses ou des cellules infectées par le CMV par exemple.

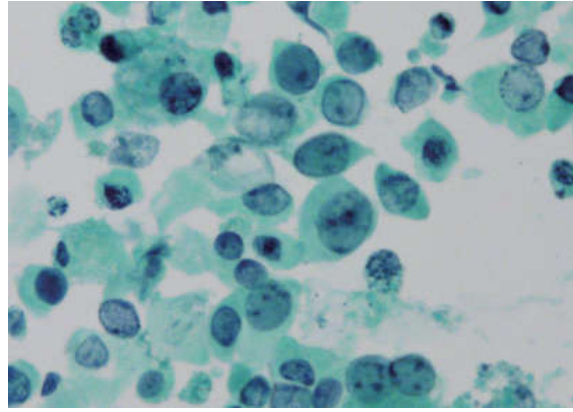


FIGURE 6 – DECOY CELLS OBSERVEES EN MICROSCOPIE OPTIQUE (COLORATION DE PAPANICOLAOU)

(Koh et al., 2012)

La **ponction biopsie rénale** – ou PBR – est une méthode invasive, présentant des risques de complications pour le patient (hémorragie, perte du greffon, etc.) mais il s’agit de la méthode de **diagnostic définitif** de néphropathie à BKPyV. Elle est réalisée en cas de virémie supérieure à $4 \log_{10}$ cp/mL persistante ou de preuve de dysfonction du greffon. Les lésions histologiques de NBKV sont classées en trois stades : A, B et C, présentés dans le Tableau 3 (Drachenberg et al., 2004). L’effet cytopathique du BKPyV sur les cellules épithéliales tubulaires consiste en un élargissement nucléaire et des inclusions basophiles virales. Une inflammation interstitielle peut y être associée. Si la NBKV persiste, elle peut mener à la formation de cicatrices du parenchyme rénal avec une atrophie tubulaire/fibrose interstitielle progressive. Le diagnostic de confirmation de NBKV est la détection des antigènes viraux par immunohistochimie, utilisant des anticorps dirigés contre l’AgT du SV40, qui croisent avec les AgT de BKPyV et de JCPyV. L’inconvénient de la ponction biopsie rénale, outre les risques inhérents au geste, est le risque d’erreurs d’échantillonnage, les lésions n’étant pas nécessairement homogènes au sein de l’organe.

Stade de NBKV	A	B	C
Effet cytopathogène	Modéré	→	Important
Lésions histologiques	Lésions minimales d'inflammation, d'atrophie tubulaire et de fibrose (<10%)	Lésions d'inflammation (10-50%), lésions d'atrophie tubulaire et de fibrose progressives	Lésions d'atrophie tubulaire et de fibrose sévères (> 50%) et irréversibles
Fonction rénale	Préservée	→	Dysfonction sévère

TABLEAU 3 – CLASSIFICATION ANATOMOPATHOLOGIQUE DES NBKV

4. Prise en charge thérapeutique

Il n'existe pas à ce jour de traitement antiviral spécifique du BKPyV, ni de traitement curatif, c'est pourquoi différentes stratégies peuvent être utilisées en cas de réplication virale intense. Le principal facteur de risque de réactivation étant l'immunosuppression, la première stratégie de prise en charge est la réduction graduelle de celle-ci : changement de classe d'immunosuppresseurs, ou réduction de posologie. En transplantation rénale, la stratégie d'immunosuppression classique associe des corticostéroïdes, un inhibiteur de calcineurine – ciclosporine A ou tacrolimus – et un inhibiteur de prolifération lymphocytaire (mycophénolate mofétil). Dans tous les cas, la corticothérapie sera réduite ou arrêtée et l'un des deux immunosuppresseurs aura sa posologie diminuée de 50%. Selon la gravité de l'atteinte, la réduction peut être plus importante, sachant que le risque sera de voir survenir un épisode de rejet aigu en cas de diminution trop importante.

Certaines molécules antivirales ont été étudiées pour leur activité sur le BKPyV, en tant que traitement adjuvant. C'est notamment le cas du cidofovir qui présenterait un bénéfice clinique potentiel mais qui reste peu utilisé en raison de sa néphrotoxicité. Le brincidofovir – la prodrogue du cidofovir, conjugué à un lipide – a montré lors des essais de phase III une incidence moindre de néphrotoxicité (Marty et al., 2013), son efficacité et sa sécurité d'emploi devraient être établies par des études cliniques.

Le léflunomide est un immunosuppresseur – utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde – qui aurait des propriétés antivirales contre BKPyV *in vitro*, il pourrait remplacer

le mycophénolate mofétil dans les protocoles d'immunosuppression après transplantation rénale. Il provoquerait une chute de virémie mais le mécanisme reste à démontrer (immunosuppression moins importante ou effet antiviral direct). Parmi ses effets indésirables, on retrouve le risque d'hépatite, de microangiopathies thrombotiques et de toxicité médullaire. Pour autant, il n'a pas montré d'effet bénéfique sur l'évolution du greffon (Guasch et al., 2010).

Les fluoroquinolones – antibiotiques agissant sur les topoisomérases bactériennes – peuvent inhiber la réplication de BKPyV *in vitro*, probablement en interférant sur l'activité hélicase de l'AgT, sans efficacité clinique démontrée (Sharma et al., 2011).

Les immunoglobulines intraveineuses contiennent des anticorps neutralisants dirigés contre BKPyV, elles peuvent donc être utilisées en traitement adjuvant, surtout en cas d'hypogammaglobulinémie.

Enfin, l'immunothérapie cellulaire est une voie prometteuse consistant à transférer des cellules T réactives pour le BKPyV afin de contrôler la réplication (Papadopoulou et al., 2014), mais qui est au stade d'optimisation technique des protocoles d'expansion des cellules T et de détermination des épitopes immunogènes.

II. TECHNIQUES MOLECULAIRES EN VIROLOGIE

A. Techniques de quantification de l'ADN viral appliquées au BKPyV

1. Techniques moléculaires en virologie et principe de la PCR

En virologie, la détection et la quantification virales reposent principalement sur des techniques de biologie moléculaire. En effet, la culture cellulaire a pu être utilisée pour le diagnostic d'infections liées à des virus présentant un effet cytopathogène caractéristique, mais elle présente des inconvénients techniques : comme le risque de contamination des cultures, la nécessité d'un personnel expérimenté, un temps technique important, etc. A l'heure actuelle, ces techniques sont de plus en plus abandonnées en routine dans les laboratoires de biologie médicale. En ce qui concerne le BKPyV, sa culture est possible sur des cellules épithéliales rénales, comme la lignée de rein de singe VERO, mais elle présente l'inconvénient d'être longue. De plus, l'effet cytopathogène n'est pas caractéristique, bien qu'il soit possible de détecter des antigènes viraux par immunofluorescence.

En routine, les techniques de détection et de quantification du génome viral les plus utilisées reposent sur la PCR – réaction de polymérase en chaîne – en temps réel, permettant l'amplification *in vitro* d'une séquence d'ADN ciblée, de manière exponentielle. La réaction de PCR utilise une paire d'oligonucléotides synthétiques, ou amorces, chacune s'hybridant à un brin de la cible d'ADN double brin, encadrant ainsi une séquence qui va être reproduite exponentiellement. Les amorces hybridées agissent comme un substrat pour l'ADN polymérase permettant la création d'un brin complémentaire par addition séquentielle de déoxynucléotides (dNTP). Chaque cycle de PCR se compose de trois étapes (Mackay et al., 2002) :

- La séparation des deux brins d'ADN, ou dénaturation, à une température supérieure à 90°C,
- L'hybridation des amorces sens et antisens aux brins d'ADN, à une température de 50 à 75°C,

- L'élongation des amorces par l'ADN polymérase à 72-78°C.

L'ADN polymérase la plus souvent utilisée pour les réactions de PCR est la Taq polymérase, dérivée de *Thermus aquaticus* – une bactérie aquatique et thermophile vivant près des sources d'eau chaude – en raison de sa thermorésistance particulièrement adaptée aux variations de température de la réaction (optimum thermique à 72°C). La réaction utilise un thermocycleur programmable, capable de contrôler le nombre de cycles, les écarts de température et le temps d'incubation à chaque étape.

En théorie, l'amplification est exponentielle car chaque brin d'ADN est doublé à chaque cycle (efficacité de la réaction égale à 2). En pratique, le rendement n'égale pas 100% et diminue au bout d'un certain nombre de cycles, atteignant un plateau (Figure 7). Cette phase de plateau s'explique par plusieurs facteurs :

- L'inactivation thermique partielle de l'ADN polymérase, en lien avec les températures élevées atteintes lors de chaque cycle,
- La réhybridation préférentielle de la cible avec elle-même plutôt qu'avec les amorces,
- L'activation de l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase,
- L'accumulation de pyrophosphates – résultant de la dénaturation thermique des dNTP – inhibant l'activité polymérase.

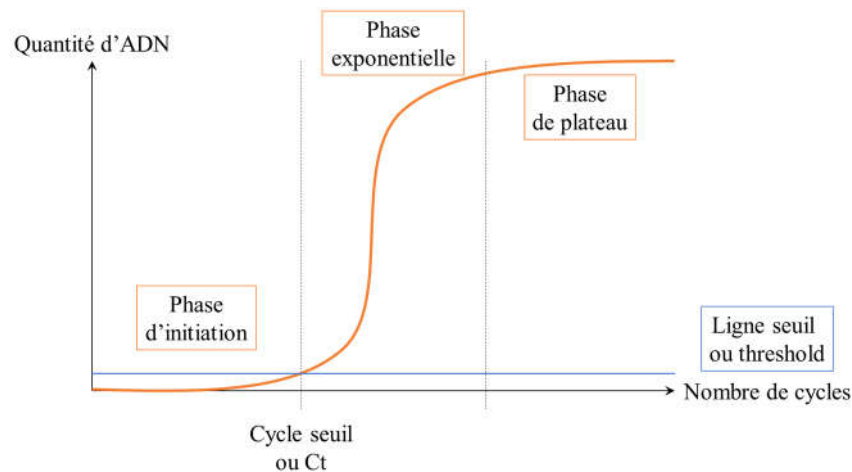


FIGURE 7 – PHASES DE LA REACTION DE PCR

2. Détection en temps réel

Le suivi de l'amplification par PCR en temps réel est rendu possible par la détection de l'accumulation du produit de PCR en temps réel ; le plus souvent, au moyen de la mesure du niveau de fluorescence à chaque longueur d'onde d'intérêt à un moment fixe du cycle de PCR. Un changement de l'intensité de fluorescence peut être relié à une accumulation du produit de PCR par plusieurs moyens. Tout d'abord, il est possible d'utiliser un fluorophore liant l'ADN double brin (comme le SYBR Green, qui présente une fluorescence à 530 nm uniquement en cas de liaison à l'ADN double brin). Le problème de ce mode de détection est son manque de spécificité – le signal sera positif et proportionnel à la quantité d'ADN en cas de liaison à n'importe quel ADN double brin, par exemple des dimères d'amorces –, ce qui rend son utilisation rare en virologie.

Il est donc préférable d'utiliser une sonde oligonucléotidique spécifique d'une séquence ciblée sur le produit de PCR. Plusieurs technologies existent à l'heure actuelle : sondes d'hydrolyse TaqMan, sondes d'hybridation FRET, sondes Molecular Beacons, etc. Parmi les plus utilisées figurent les sondes d'hydrolyse Taqman (Figure 8) dont la technologie repose sur le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) et sur l'activité 5'-3' exonucléasique de la Taq polymérase. Ces sondes portent en effet un fluorophore – ou *reporter*

– et un désactivateur – ou *quencher* – séparés par tout ou partie de la séquence oligonucléotidique. Le désactivateur absorbe la fluorescence émise par le fluorophore soumis à une source d'excitation, ce qui correspond au FRET ; le fluorophore est ensuite éloigné du désactivateur grâce au clivage par l'ADN polymérase. La température de fusion de la sonde doit être supérieure à celle des amorces, car l'hybridation de la sonde au brin d'ADN doit avoir lieu entre la dénaturation – environ 90°C – et l'hybridation des amorces – entre 50 et 75°C, selon les T_m des amorces. Il s'agit donc d'une technologie hautement spécifique, présentant l'avantage de permettre le développement de techniques multiplex en utilisant des fluorophores et des canaux de lecture différents.

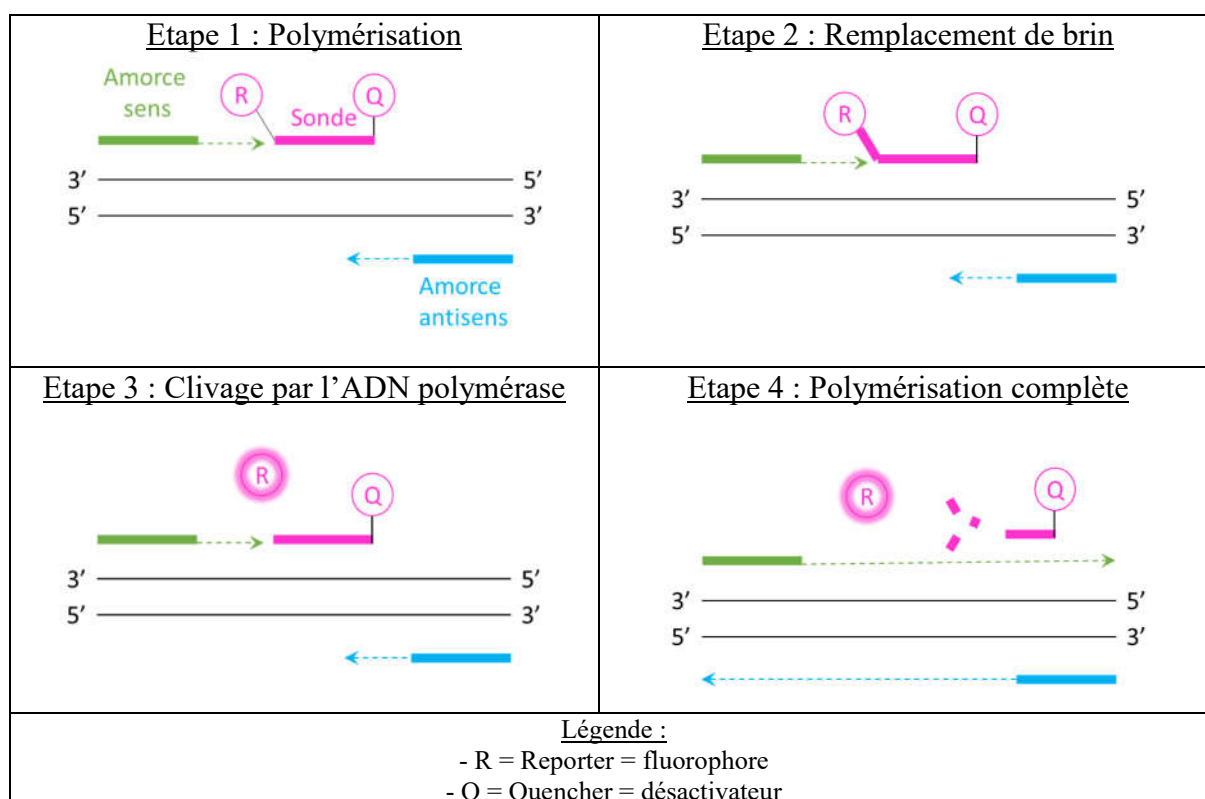


FIGURE 8 – REACTION UTILISANT LES SONDES D'HYDROLYSE TAQMAN

3. Principe de la PCR quantitative et standards de quantification

L'amplification en parallèle de dilutions de concentrations connues d'un standard permet la quantification absolue par l'obtention d'une courbe standard. La droite d'étalonnage ainsi obtenue exprime les variations du C_t en fonction de la quantité d'acide nucléique cible

contenu dans chaque point de gamme. La gamme est validée après le calcul de l'efficacité d'amplification et du coefficient de régression linéaire r ($r^2 \geq 0,99$). Cette droite permet d'extrapoler la quantité d'ADN initialement présente dans les échantillons.

Le standard de quantification doit comporter une séquence homologe à celle de la cible afin que le même amplicon puisse être amplifié avec le même couple d'amorces et la même sonde d'hybridation que le gène ciblé (Saunders et al., 2013). Le plus souvent, il s'agit d'une solution titrée de plasmides contenant la séquence d'intérêt ou de produits de PCR contenant les séquences du couple d'amorces utilisé. Il est nécessaire de connaître précisément la concentration du standard et que celle-ci soit reproductible et stable dans le temps. La détermination de la cette concentration peut se faire par un dosage spectrophotométrique UV, bien que la valeur obtenue soit approximative et très souvent surestimée (Tse and Capeau, 2003).

4. Application à la quantification du BKPyV

Les principaux kits de biologie moléculaire actuellement commercialisés pour la détection et/ou la quantification de l'ADN de BKPyV sont présentés dans le Tableau 4. Les régions du génome amplifiées diffèrent selon les techniques, ainsi que les matrices utilisables. La technique maison utilisée au CHU de Nantes repose sur l'amplification d'un fragment de 84 pb dans la région codant pour l'AgT et est utilisable sur des échantillons d'urine, de sang total sur EDTA et de LCR. Il s'agit d'une technique de quantification absolue permettant l'obtention de résultats exprimés en cp/mL ou en $\log_{10}$ cp/mL.

Les performances des techniques de quantification peuvent être mises en défaut pour certains génotypes, si la zone d'appariement des amorces et de la sonde contient des positions nucléotidiques sujettes à variations entre les différents génotypes (Randhawa et al., 2011; Sueur et al., 2014).

Nom du kit	Fournisseur	Région amplifiée	Quantification Unité	Echantillons analysables	Seuil de sensibilité	Marquage CE-IVD
Realquality® RS-BKV kit	AB Analitica (Italie)	AgT	Cp/mL	Sang total, plasma, urine	0,3 cp/μL d'extrait d'ADN	Oui
RealStar® BKV PCR Kit 1.2	Altona Diagnostics (Allemagne)	Non précisée	Cp/mL	Plasma, urine	0,712 cp/μL d'extrait d'ADN	Oui
BK virus R-gene® Quant kit	BioMérieux (France)	Agt	Cp/mL (avec possibilité de convertir en UI/mL)	- Sang total : 2,6 log ₁₀ cp/mL - Plasma : 2,3 log ₁₀ cp/mL - Urine : 2,5 log ₁₀ cp/mL		Oui
Quanty® BK	Clonit (Italie)	VP1	Cp/mL	Sang total EDTA, plasma, LCR et urine	1,408 cp/μL d'extrait d'ADN	Oui
Iam BKV Q-LAMP®	DiaSorin (Italie)	Non précisée	Oui, unité non précisée	Plasma et urine	Non précisé	Non précisé
BKV ELITe MGB® Kit	ELITechGroup (Italie)	AgT	Oui, unité non précisée	Plasma, urine et LCR	Non précisé	Oui
FTD Realtime® BKV	Fast-track diagnostics (Luxembourg)	Non précisée	Oui, unité non précisée	Urine, sang total EDTA, plasma et sérum	Non précisé	Oui
Simplexa® BKV	Focus diagnostics (Etats-Unis)	Région conservée du gène codant pour VP2	Cp/mL	Plasma et urine	510 cp/mL	Oui
GeneProof® BK Virus (BKV) PCR Kit	GeneProof a. s. (République Tchèque)	A la limite entre les gènes codant pour VP1 et VP2	Cp/μL	Sang total, plasma, LCR et urine	0,684 cp/μL 180,617 UI/mL	Oui
Fluorion® BK quantitative	Iontek (Turquie)	Agt	Cp/mL	Sérum, plasma et urine	32 cp/mL	Oui
Genesig® Advanced Kit Polyomavirus BK	Primerdesign (Royaume-Uni)	Région non codante	Cp/mL (avec possibilité de convertir en UI/mL)	Tous types d'échantillons	100 cp	Non précisé
RealCycler® kit BKV	Progenie Molecular (Espagne)	Non précisée	Non précisé Non précisée	Non précisé	Non précisé	Oui
artus® BK Virus RG PCR kit	Qiagen (Allemagne)	274 pb dans une région codant pour VP2 et VP3	Cp/mL	Plasma, urine	0,195 cp/μL d'extrait d'ADN	Oui
Versant® kPCR PLX BK Virus DNA Assay	Siemens (Allemagne)	Non précisée	Cp/mL	Plasma EDTA	114 cp/mL	Oui
Light Mix® Polyoma JC/BK	TIB MolBiol (Allemagne)	175 pb dans une région codant pour l'Agt	Oui, unité non précisée	Non précisé	Non précisé	Oui
Sentosa® SA BKV Quantitative PCR Test	Vela Diagnostics (Allemagne)	Non précisée	Cp/mL	Plasma, sérum et urine	187 cp/mL	Oui

TABLEAU 4 – KITS COMMERCIAUX DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DE L'ADN DE BKPYV

B. Standard international de quantification de l'OMS

En raison des difficultés de comparaison inter-laboratoires des quantifications de l'ADN de BKPyV, les laboratoires participent à des CQE : programmes QCMD, CQE des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, etc. Les résultats ainsi obtenus permettent de se comparer entre groupe de pairs et d'évaluer l'exactitude de la méthode.

Dans cette même finalité de comparaison inter-laboratoires, l'Organisation Mondiale de la Santé a mené une étude collaborative internationale dont les résultats ont été publiés en 2015 afin de mettre au point le premier standard international de quantification de l'ADN de BKPyV (Govind et al., 2015).

1. Mise au point du standard

L'objectif de ce standard de quantification est d'uniformiser les valeurs rendues entre les différentes techniques et les différents laboratoires, ce qui permettra pour les patients de pouvoir être suivis dans des laboratoires différents si besoin. Dans cette étude, deux candidats de génotype Ib-1 et Ib-2 ont été testés par 33 laboratoires de 15 pays différents, sous forme de préparations de particules virales complètes lyophilisées, obtenues à partir de culture sur une lignée cellulaire permissive MRC-5 (fibroblastes embryonnaires humains) (Tableau 5).

	Candidat 14/202	Candidat 14/212
Génotype	Ib-1	Ib-2
Obtention	Isolé de l'urine d'un patient allogreffé de cellules souches hématopoïétiques présentant une cystite hémorragique provenant des Pays-Bas	Stock de virus archivé en 1998 par le NIBSC

TABLEAU 5 – CARACTERISTIQUES DES CANDIDATS STANDARDS NIBSC

Ces préparations étaient purifiées de toute cellule par centrifugation (380g, 5 minutes). La charge virale du BKPyV a été déterminée au NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) en utilisant un kit commercial : BKV ELITE MGB kit (ELITechGroup,

Italie). A partir de ces deux candidats, 7 échantillons codés de A à G ont été préparés pour être évalués par les laboratoires participants (Tableau 6).

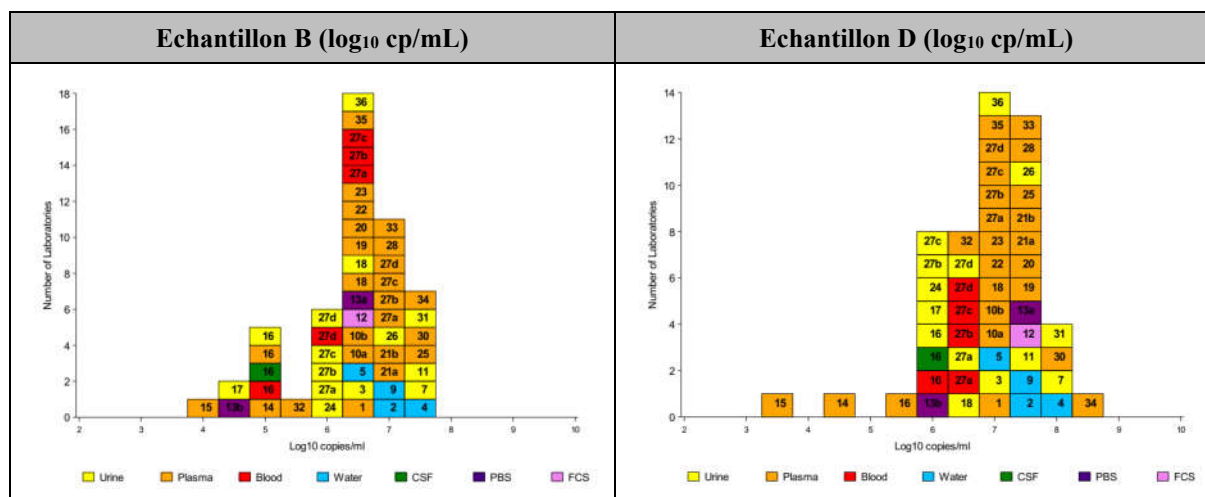
Echantillon	Nature	Charge virale estimée (log ₁₀ cp/mL)	Reconstitution	Température de stockage (°C)	Matrice de dilution	Résultats obtenus par les laboratoires (log ₁₀ cp/mL)	
						Moyenne	Ecart-type
A	Plasmide codant le génome de BKPyV	9,18 – 9,26	N.A.	- 20°C	Eau de qualité biologie moléculaire	8,97	0,85
B	Candidat 14/202 sous forme lyophilisée	6,73	1 mL d'eau de qualité biologie moléculaire (sans nucléase)	- 20°C	Matrice utilisée dans le laboratoire (plasma, urine, etc.)	6,62	0,65
C	Candidat 14/202 sous forme liquide	6,69	N.A.	- 70°C	Pas de dilution	6,71	0,77
D	Candidat 14/212 sous forme lyophilisée	6,75	1 mL d'eau de qualité biologie moléculaire (sans nucléase)	- 20°C	Matrice utilisée dans le laboratoire (plasma, urine, etc.)	7,17	0,61
E	Candidat 14/212 sous forme liquide	6,75	N.A.	- 70°C	Pas de dilution	7,21	0,71
F	Echantillon d'urine (allogreffé de CSH)	3,91	N.A.	- 70°C	Pas de dilution	2,67	0,88
G	Echantillon de plasma (allogreffé de CSH)	3,47	N.A.	- 70°C	Pas de dilution	2,99	0,72

TABLEAU 6 – CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS TESTES PAR LES LABORATOIRES PARTICIPANTS

(D'après Govind et al., 2015)

Les participants devaient analyser chaque échantillon en *duplicate*, dans 3 séries indépendantes, en utilisant leur technique de quantification de l'ADN de BKPyV de routine. Les échantillons lyophilisés (B et D) devaient être reconstitués dans 1 mL d'eau de qualité

biologie moléculaire (sans nucléase), puis testés purs et dilués en série (3 à 4 dilutions de raison 10) dans une matrice utilisée dans le laboratoire (plasma, urine, etc.) afin qu'au moins 2 des dilutions testées soient dans l'intervalle de linéarité. Les matrices utilisées par les laboratoires dans cette étude (Figure 9) étaient : de l'urine, du plasma, du sang, de l'eau, du LCR, du PBS (phosphate buffer saline) ou du SVF (sérum de veau foetal, ou FCS).



NB : chaque laboratoire participant est désigné par un code d'anonymat allant de 1 à 35

FIGURE 9 – ETUDE PRELIMINAIRE STANDARD OMS : RESULTATS EN FONCTION DE LA MATRICE UTILISEE

(D'après Govind et al., 2015)

Les variations inter-laboratoires les plus faibles ont été observées pour les échantillons B et D. De plus, il existait une bonne corrélation entre les valeurs obtenues pour les formes lyophilisées (B et D) et les formes liquides (C et E), indiquant l'absence de dégradation des candidats standards lors de la lyophilisation. La corrélation inter-laboratoires pour les échantillons C et E était améliorée quand la quantification était exprimée par rapport aux candidats standards (B ou D), ce qui montre que ces candidats sont utilisables pour améliorer la standardisation du test. Les échantillons cliniques (F et G) ont montré une variabilité considérable avec une large distribution des résultats ; à noter, cependant, que les concentrations testées étaient plus faibles qu'avec les autres échantillons. De plus, ces

échantillons n'ont pas bénéficié d'un génotypage et, de ce fait, des mismatches dans la liaison des amorces ne sont pas à exclure (Randhawa et al., 2011). La comparaison de l'effet des diluants utilisés sur la quantification a montré que l'urine et le plasma ne présentaient pas d'effet matrice. Pour les autres diluants, trop peu de données étaient disponibles pour que l'analyse soit robuste (Figure 9).

2. Utilisation du standard international

Le candidat 14/212 a été choisi comme premier standard international OMS pour les techniques d'amplification de l'ADN de BKPyV, avec une concentration de $7 \log_{10}$ UI/mL, car le génotype Ib-2 est plus ubiquitaire que le Ib-1. L'utilisation de particules virales complètes permet l'extraction du standard en parallèle des échantillons cliniques et permet la standardisation du processus de l'extraction à la quantification.

L'étude a également permis de tester la stabilité du standard : en conditions de stockage (-20°C), en conditions de laboratoire (de 4 à 20°C) et en conditions d'acheminement (fluctuations de température ambiante de 37 à 45°C). La qualité de la lyophilisation a été évaluée afin de satisfaire à une stabilité à long terme.

Pour l'établissement du facteur de conversion, le standard international doit donc être reconstitué dans 1 mL d'eau de qualité biologie moléculaire (sans nucléase), puis dilué au $1/10^6$ dans une matrice utilisée dans le laboratoire. Les aliquots sont ensuite congelés à -20°C , puis 4 jours de suite, un aliquot par matrice sera extrait en parallèle des échantillons cliniques, puis analysé en *triplicate* dans la série de qPCR BKPyV.

C. Validation d'une méthode de biologie moléculaire

1. Principes généraux

Depuis 2003, la norme NF EN ISO 15189 est destinée à favoriser une démarche commune pour le management de la qualité des laboratoires de biologie médicale, afin de mettre en œuvre des systèmes de management de la qualité fondés sur la norme ISO 9001. L'accréditation selon la norme NF ISO 15189 est devenue obligatoire pour tous les laboratoires de biologie médicale suite à l'ordonnance du 13 janvier 2010 (Journal officiel de la République française, 2010). L'accréditation se définit comme « la procédure selon laquelle un organisme accréditeur fournit une reconnaissance formelle de la compétence d'une personne ou d'un organisme à réaliser des activités spécifiées d'évaluation de la conformité », l'ensemble de ces activités correspondent à la portée d'accréditation (Comité Français d'Accréditation, 2015a). La version de la norme actuellement en vigueur date de décembre 2012 (Association Française de Normalisation (AFNOR), 2012). Le Cofrac – Comité Français d'Accréditation – est officiellement reconnu comme instance nationale d'accréditation par le décret n°2008-1401 du 19 décembre 2008 (Journal officiel de la République française, 2008). L'évaluation objective des preuves est effectuée lors d'un audit par l'organisme accréditeur.

Un examen de biologie médicale comporte trois phases : préanalytique, analytique et post-analytique (Figure 10). Ces différentes phases font l'objet d'une analyse des points critiques et d'une maîtrise des risques. Pour cela, la méthode AMDEC – Analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité – peut être utilisée ; l'indice de criticité d'un mode de défaillance correspond alors au produit de l'indice de fréquence, par l'indice de gravité, puis par l'indice de détection (Annexe 2, page 95).

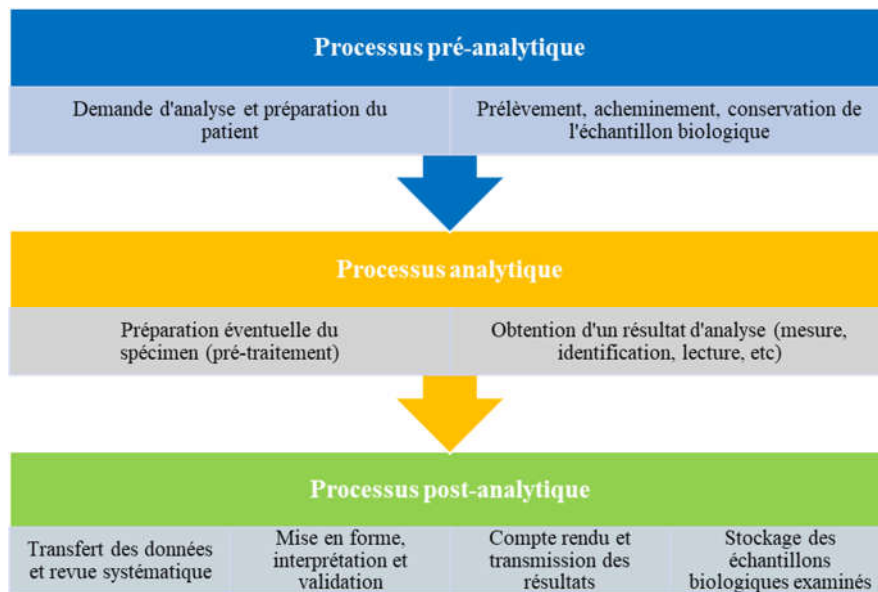


FIGURE 10 – PHASES D’UN EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE

Concernant la phase analytique d’un examen de biologie médicale, un laboratoire peut adopter des méthodes reconnues – **portée flexible standard A** – auquel cas la vérification de méthode consiste à vérifier les performances du système analytique lors de la mise en routine dans le laboratoire et à confirmer la fiabilité des résultats obtenus. Un laboratoire peut également utiliser des méthodes adaptées ou développées en interne – **portée flexible étendue B** –, dans ce cas, le laboratoire évalue, pour sa validation de méthode, l'ensemble des critères de qualité de la méthode susceptibles d'en démontrer la maîtrise (Comité Français d’Accréditation, 2015b).

2. Critères de qualité utilisés pour la validation de méthode

Les critères de performance de la méthode à accréditer seront déterminés par le laboratoire, par un essai sur site ou par une analyse de la bibliographie, en fonction du critère et de la portée d’accréditation. Ces critères seront comparés aux données de référence (fournisseur, bibliographie, sociétés savantes, etc.), ce qui permet de juger si les résultats sont acceptables ou non. Le laboratoire devra décrire les échantillons utilisés, et, en cas de discordance avec les performances annoncées par le fournisseur, cette discordance sera

investiguée. Les critères de qualité d'une méthode d'analyse sont illustrés sur la Figure 11 et définis dans les paragraphes suivants.

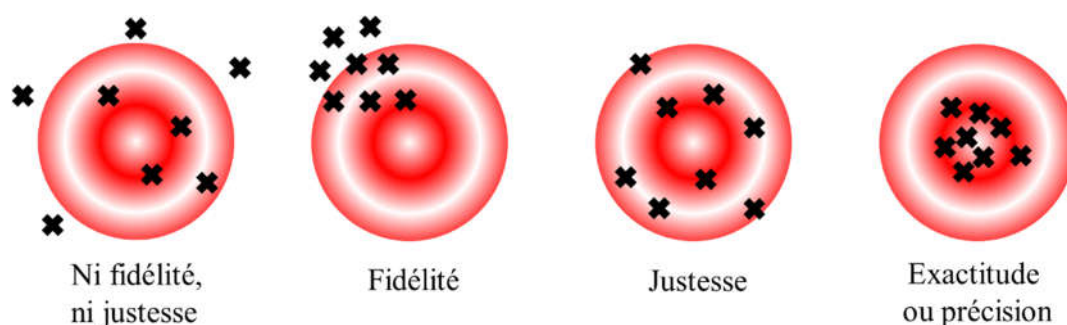


FIGURE 11 – SCHEMA D'ILLUSTRATION DES CRITERES DE QUALITE D'UNE METHODE D'ANALYSE

Lors d'une validation de méthode quantitative : la fidélité, la justesse, l'incertitude de mesure, la comparaison de méthodes, la robustesse, l'intervalle de mesure, les interférences, la contamination inter-échantillons ainsi que la stabilité des réactifs seront déterminés par des essais sur site (Comité Français d'Accréditation, 2015b).

a) Fidélité analytique

La notion de fidélité analytique permet d'établir avec quelle qualité une mesure donnée peut être reproduite quand un test est appliqué de manière répétée à de multiples aliquots d'un échantillon homogène (Burd, 2010). Elle consiste donc à évaluer l'étroitesse de l'accord entre des résultats de mesures indépendantes obtenues sous des conditions définies. La fidélité est reliée aux erreurs analytiques aléatoires, à savoir, les facteurs qui peuvent varier durant une opération normale du test. Elle est donc impactée par les étapes non-automatisées du processus analytique, qui risquent de varier significativement malgré l'utilisation des mêmes instruments (chronométrage, température, etc.). La fidélité n'est pas définie par une valeur quantitative mais par une expression qualitative (haute, moyenne ou basse).

Pour une expression numérique, il est plus adapté de parler d'infidélité, correspondant à la dispersion des résultats de mesures obtenues sous des conditions spécifiées. Il existe deux mesures extrêmes de la fidélité : la répétabilité et la reproductibilité.

Répétabilité

La répétabilité est calculée d'après des mesures répétées d'un même échantillon menées sous des conditions fixes : opérateur identique, lot de réactifs identique, instrument identique, dans un délai le plus court possible (Comité Français d'Accréditation, 2015b). Le but est de caractériser la meilleure performance possible, sous des conditions optimales. L'analyse doit être effectuée sur chaque matrice utilisée et à plusieurs niveaux de concentration.

Reproductibilité ou fidélité intermédiaire

La reproductibilité intra-laboratoire (ou fidélité intermédiaire) consiste à analyser des échantillons de concentration connue de manière répétée sous des conditions changeantes (variation d'au-moins un facteur : opérateur, lots de réactifs, temps...) sur une période d'au-moins 20 jours, avec au minimum 5 mesures par concentration. Généralement, les niveaux de concentration testés en reproductibilité sont identiques ou proches de ceux utilisés pour le calcul de répétabilité, permettant d'établir la robustesse de la méthode.

b) Robustesse

Une méthode d'analyse est dite robuste si celle-ci est fiable, dans des conditions normales d'utilisation. Il s'agit donc de mesurer la capacité de la méthode à ne pas être affectée par des variations minimales mais délibérées des paramètres de la méthode : température d'incubation, pH, etc.

c) Justesse – exactitude

La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (« valeur vraie »). La justesse peut être approchée

en comparant la moyenne de plusieurs mesures à une valeur cible qui sera assimilée à la valeur vraie. L'écart observé entre ces deux valeurs correspond au biais, qui peut être évalué à partir des résultats obtenus avec des échantillons de contrôle titrés ou des valeurs observées dans le cadre d'une comparaison inter-laboratoire de certains programmes de contrôle interne (externalisation des contrôles de qualité internes ou CQI). Dans le cas où l'externalisation des CQI n'existe pas, les résultats des contrôles de qualité externes comparés à la moyenne par groupe de pairs pourront être utilisés pour évaluer l'exactitude, si le nombre de participants est suffisant.

d) Comparaison de méthodes

La comparaison de méthodes consiste à évaluer la concordance entre deux techniques en comparant la moyenne des différences entre ces deux techniques, l'objectif étant qu'elle soit inférieure à $0,5 \log_{10}$ cp/mL pour une technique quantitative en virologie moléculaire (Comité qualité de la Société Française de Microbiologie (QUAMIC), 2014). La technique de comparaison est le plus souvent celle qui était précédemment utilisée au laboratoire, ou la méthode reconnue de référence. Elle repose sur l'analyse d'un minimum de 30 échantillons couvrant le domaine de quantification et les différents génotypes du virus étudié. Si des valeurs proches sont attendues entre les deux techniques, chaque échantillon sera testé une seule fois par technique ; dans le cas contraire, les échantillons seront testés en *duplicates*. La limite de la comparaison de méthodes est la valeur attendue, en effet, il n'y a pas de vraie valeur connue autre que celle qui avait été obtenue avec la technique existante (qui possède ses propres faiblesses).

e) Etendue de mesure

L'étendue de mesure est l'intervalle de valeurs dans lequel le laboratoire peut vérifier la précision de la méthode pour un test, donc l'intervalle dans lequel il est licite de rendre une

valeur quantitative. Cette étendue de mesure comprend donc : une limite de détection (LOD), une limite de quantification (LLOQ) et une limite supérieure de linéarité (Figure 12).

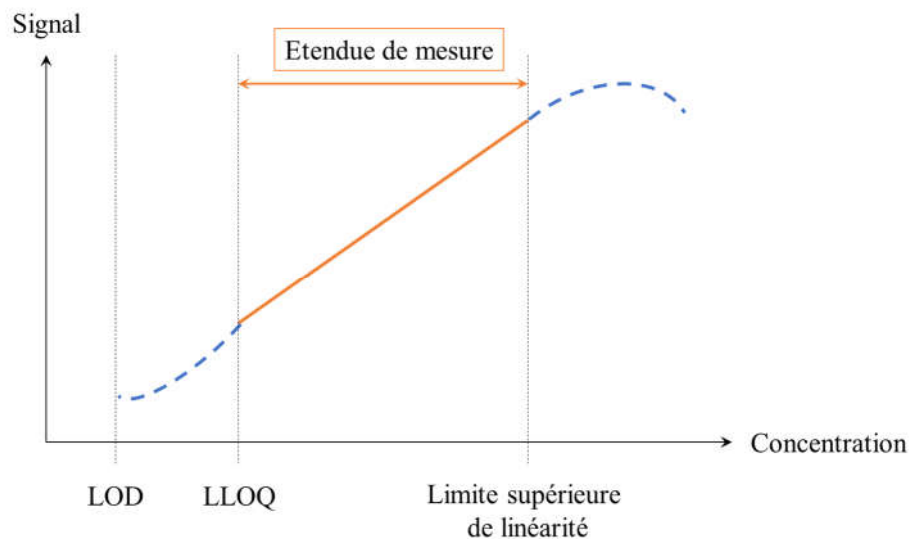


FIGURE 12 – ETENDUE DE MESURE D'UNE METHODE QUANTITATIVE

Limite supérieure de linéarité

La limite de linéarité correspond à la valeur de concentration la plus haute à partir de laquelle le signal de l'instrument sature. Pour la déterminer, le laboratoire doit tester une série de dilutions connues d'un échantillon patient (ayant une concentration haute) ou d'un standard. Chaque dilution doit être testée de manière répétée (2 à 4 réplicats), idéalement le même jour, et la gamme de dilutions doit comporter de 7 à 11 concentrations. Le but est de vérifier l'existence d'une relation linéaire entre les dilutions effectuées et les concentrations mesurées.

Limite de détection ou LOD

La limite de détection est la concentration en analyte la plus basse qui puisse être détectée, dans au moins 95% des cas, avec une précision acceptable, sans nécessairement être quantifiée (Burd, 2010). Elle correspond à la **sensibilité analytique** de la méthode, c'est-à-dire l'aptitude d'un test à détecter des concentrations très basses d'une substance donnée dans un échantillon biologique. Sa détermination se fait de manière empirique en effectuant des mesures

répétées de basses concentrations en analytes (12 mesures de 5 dilutions différentes), qui, après analyse statistique, permettront de calculer la LOD.

Limite de quantification ou LLOQ

La limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'incertitude connue. Il est possible de définir la limite de quantification comme étant la plus faible valeur de concentration utilisée dans la gamme de dilution lors du test de linéarité ; valeur pour laquelle le coefficient de variation n'excèdera pas la valeur recommandée. La LLOQ peut être égale à la LOD, si l'imprécision est acceptable au niveau de concentration de la LOD, mais elle est généralement supérieure à celle-ci.

f) Spécificité analytique

La spécificité analytique est la capacité d'un test à détecter seulement la cible moléculaire désirée et le fait que la quantification de cette cible ne soit pas affectée par une réactivité croisée par des acides nucléiques interférents ou des conditions liées à l'échantillon (Burd, 2010). Il s'agit donc d'un paramètre qui doit absolument être déterminé pour la validation d'une technique de biologie moléculaire.

L'étude de la réactivité croisée des amorces et des sondes doit inclure des organismes ayant une structure génétique similaire à celle de la cible, des organismes de la flore normale qui pourraient être présents dans l'échantillon, ainsi que des organismes qui causent des pathologies similaires ou des co-infections pertinentes sur le plan clinique.

L'étude des interférences permet quant à elle de rechercher l'effet, qu'un composant autre que l'analyte cible, a sur l'exactitude de la mesure de cet analyte. En biologie moléculaire, ces interférences peuvent influencer l'activité de la polymérase ou inhiber l'amplification des acides nucléiques. Il peut s'agir de substances endogènes (héparine contenue dans le

prélèvement) ou exogènes (gants poudrés, crème pour les mains, gel séparateur du tube...).

L'étape d'extraction de l'ADN permet souvent d'inactiver ou de retirer les substances interférentes.

III. OBJECTIFS

La technique de détection et de quantification de l'ADN de BKPyV utilisée au laboratoire de virologie du CHU de Nantes depuis 2003 présente des performances satisfaisantes. Mais, des résultats de contrôles de qualité externes des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (Comparaison inter-laboratoire BK virus – 2015) ont montré qu'elle sous-quantifiait le génotype II de 3,30 log₁₀ copies/mL. Ces résultats soulignaient la présence de mutations du génome de BKPyV au niveau des sites de liaison des amorces sens, antisens et de la sonde et précisait que ces mutations étaient fréquentes et présentes dans 81 à 100% des souches du génotype II. Une étude de 2011 a montré que la sensibilité de la détection de BKPyV est fonction du génotype viral et que l'efficacité de l'amplification est fonction du nombre de mismatches entre la cible virale et les séquences d'amorces de la technique de PCR (Randhawa et al., 2011).

L'objectif technique était donc de concevoir des amorces présentant une meilleure spécificité pour le génotype II, sans perdre en termes de sensibilité sur les autres génotypes. Dans un second temps, nous avons procédé à la validation de méthode de la qPCR BKPyV en vue d'une accréditation par le Comité Français d'Accréditation. Le troisième objectif a été de valider notre technique quantitative à l'aide du standard international de quantification mis au point par l'OMS. D'un point de vue clinique, l'impact de cette sous-quantification du génotype II a été étudié chez les patients connus infectés par un BKPyV de génotype II de la cohorte du CHU de Nantes.

IV. MATERIELS ET METHODES

A. Matériel

1. Patients

Les échantillons utilisés dans le cadre de cette étude proviennent de la surveillance virologique des patients transplantés de rein et ont été étudiés de manière rétrospective. Pour les échantillons utilisés lors de l'étude, cette surveillance était prévue à 1, 2, 3, 6, 9 et 12 mois post-transplantation, à l'occasion de consultations de suivi systématique. Aucun critère d'exclusion n'a été appliqué. Le statut sérologique du receveur et du donneur vis-à-vis du BK polyomavirus n'a pas été recherché. Le génotype de BKPyV infectant les patients a été déterminé par séquençage du gène codant pour VP1.

2. Prélèvements biologiques

Les prélèvements acheminés au laboratoire, en structure pré PCR, comprennent pour chaque patient un échantillon de 5 ml d'urines, et un ou deux tubes de 3 ou 7 ml de sang total EDTA. Urine (UR) et sang total EDTA (SE) sont conservés à -20°C en attendant l'étape d'extraction des acides nucléiques. Les extraits de SE et un aliquot d'urines pures sont conservés, après analyse, plusieurs années, en biothèque, à -20°C.

3. Amorces et sondes utilisées

Les amorces et la sonde ont été synthétisées par Eurogentec, fournies sous forme lyophilisées, reconstituées en eau distillée de façon à obtenir des solutions mères à la concentration de 200 μ M, puis conservées à -20°C.

4. Thermocycleur

L'appareil de PCR temps réel utilisé est le **LightCycler®96** (Roche Diagnostics). Il s'agit d'un thermocycleur relié à un système de fibres optiques pour la détection, avec un

système de chauffage par un module Peltier permettant l'utilisation de gradients de température (étendue maximale de 20°C). Le LC96 s'utilise avec des plaques de 96 puits réactionnels et permet la détection de 4 fluorochromes différents.

5. Contrôle interne

Le contrôle positif interne IPC DNA, qui permet de s'assurer de l'amplification, est commercialisé par Applied Biosystem (Taqman® Exogenous Internal Positive Control Reagents) et est fourni avec le mix IPC d'amplification spécifique contenant les amorces et une sonde marquée par le fluorochrome VIC. Sa séquence exacte n'est pas connue.

6. Composants du mélange réactionnel pour la PCR

Le Master Mix utilisé, Tampon TaqMan® Gene Expression Master Mix, est commercialisé par Life Technologies, et contient une Taq polymérase (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase), ainsi que les dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP) nécessaires à l'amplification. La présence d'Uracile-N-Glycosylase (UNG) permet de limiter le risque de contamination du mélange réactionnel par des amplicons d'une réaction antérieure.

7. Standard de quantification plasmidique

Un standard de quantification a été mis au point au laboratoire. Il contient le produit d'amplification de la qPCR BKPyV (Bressollette-Bodin et al., 2005) cloné dans un vecteur pGEM T Easy PCR cloning system (Promega, Charbonnières, France) et il est utilisé à chaque série afin d'établir la courbe standard de quantification. Celle-ci comporte quatre points de gamme : $5 \cdot 10^6$ cp/réaction, $5 \cdot 10^4$ cp/réaction, $5 \cdot 10^2$ cp/réaction et $5 \cdot 10^1$ cp/réaction, dont les valeurs de Ct (cycle seuil) sont suivies à chaque série. Elle permet le calcul du coefficient de détermination (R^2) par régression linéaire ainsi que le calcul de l'efficacité de la réaction (l'efficacité théorique étant de 2).

8. Contrôle de qualité interne

Un contrôle de qualité interne (CQI) commun à plusieurs PCR quantitatives ADN sur sang total (CMV, EBV, BKPyV et HHV6) a été mis en place au laboratoire. Il est fabriqué à partir de poches de sang qualifiées provenant de l'Etablissement Français du Sang et de suspensions virales dont la concentration en virus est connue. Des aliquots de sang contaminé sont ainsi préparés et leur concentration est ajustée jusqu'à la concentration souhaitée qui est de l'ordre de $3,5 \log_{10}$ cp/mL pour le BK polyomavirus. Ces aliquots sont ensuite extraits sur le QIAAsymphony SP quotidiennement et déposés à chaque série de qPCR BKPyV. La concentration optimale a été déterminée en avril 2016 à la suite d'essais de reproductibilité (moyenne à $3,31 \log_{10}$ cp/mL, CV à 5,57%, n=10) et les quantifications obtenues sont suivies à chaque série avec des valeurs acceptables allant de 2,81 à $3,81 \log_{10}$ cp/mL.

B. Méthodes

1. Extraction des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN viral à partir du sang total sur EDTA est réalisée en routine au laboratoire sur l'automate d'extraction QIAAsymphony SP (QIAGEN®), selon les recommandations du fabricant. Le processus d'extraction repose sur quatre étapes : la lyse cellulaire sous l'action de la protéinase K, la liaison des acides nucléiques sur des particules magnétiques (captées ensuite par une barre aimantée), suivies de plusieurs lavages successifs puis d'une étape d'élution dans un tampon. Un témoin d'extraction est réalisé au sein de chaque série avec du tampon PBS.

Les urines ne sont pas extraites en routine mais diluées au 1/20^e dans du tampon PBS, portées 8 minutes à ébullition (100°C) afin d'éliminer les substances inhibitrices de la PCR, puis centrifugées 5 minutes à 10000 rpm. En cas de présence d'un inhibiteur malgré ce pré-

traitement, elles seront rediluées ou extraites en utilisant le kit QIAasympyony DSP Virus/Pathogen.

2. Conception de nouvelles amorces

La séquence initialement amplifiée par la technique mise au point en 2003, d'une taille de 85 pb, correspond à une portion du gène précoce codant pour l'AgT, qui constitue une zone conservée et spécifique du génome du BKPyV. Les amorces sens (BKVRG1) et antisens (BKVRG2) alors utilisées ainsi que la sonde (BKVSRG) et leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 7. La sonde est marquée à chaque extrémité par un fluorochrome : Fam en 5' et BHQ en 3'.

	Taille	Tm (°C)	Séquence	Position*
Amorce sens BKVRG1	21 bases	64	5'-3' GACATAGCATGCAAGGGCAGT	4811-4831
Amorce antisens BKVRG2	21 bases	66	5'-3' CCTCTTTGCCCAGATACCCTG	4895-4875
Sonde BKVSRG	30 bases	86	5'Fam-CACAGAAGGCTTTTGGGAACAAATAGGCCA-BHQ3'	4833-4862

* La position correspond à la position sur la souche Dunlop de référence (GenBank accession n° VO1108)

TABLEAU 7 – SEQUENCES ET CARACTERISTIQUES DES AMORCES ET DE LA SONDE (TECHNIQUE INITIALE)

Les séquences de ces amorces et de la sonde ont été alignées sur les séquences GenBank des différents génotypes de BKPyV et pour certaines positions, les séquences différaient selon les génotypes (Annexe 1, page 86). Les mismatches observés au niveau de la séquence de la sonde ont été considérés comme étant négligeables et d'impact moindre sur la technique que celles des amorces sens et antisens, il n'a donc pas été testé de sonde avec une séquence différente. Deux couples d'amorces sens et antisens ont donc été conçus en se basant sur ces différences (matérialisées en bleu dans le Tableau 8) : un couple d'amorces BKVG2 spécifiques du génotype II et un couple d'amorces BKVDEG dégénérées (Tableau 9).

	Taille	T _m (°C)	Séquence	Fournisseur
Amorces spécifiques du génotype II (G2)				
Amorce sens BKVG2_RG1	21 bases	47	5'-3' GACATAGCATGCAAGGGCA ^A T	Eurogentec
Amorce antisens BKVG2_RG2	21 bases	47	5'-3' CCTCTTTGCCAGATAC ^{TT} TG	Eurogentec
Amorces dégénérées (DEG)				
Amorce sens BKVDEG_RG1	21 bases	49	5'-3' GACATAGCATGCAAGGGCA ^R T	Eurogentec
Amorce antisens BKVDEG_RG2	21 bases	49	5'-3' CCTCTTTGCCAGATAC ^{YY} TG	Eurogentec

TABLEAU 8 – SEQUENCES ET CARACTERISTIQUES DES AMORCES CONÇUES

Abréviation	Nucléotides
R	G ou A
K	G ou T
S	G ou C
W	A ou T
M	A ou C
Y	T ou C
D	G ou A ou T
V	G ou A ou C
B	G ou T ou C
H	A ou T ou C
N	G ou A ou T ou C

TABLEAU 9 – NOMENCLATURE INTERNATIONALE DES BASES DITES « DEGENERÉES »

Les amorces ainsi conçues ont été analysées à l'aide de l'outil OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyser> ; Integrated DNA Technologies) à la recherche de la formation de structures partiellement double brin (en épingles à cheveux), perturbant l'hybridation à la séquence à amplifier, et à la recherche de la formation de dimères d'amorces empêchant l'amplification par compétition.

3. Amplification par PCR

Les concentrations des composants du mélange réactionnel sont présentées dans le Tableau 10. Seule la séquence des amorces varie entre les techniques, les autres composants et

leurs concentrations respectives restent identiques à la technique précédemment utilisée au laboratoire.

	Concentration finale
Tampon TaqMan® Gene Expression Master Mix (Life Technologies) réf. 4369016	1X
Amorce sens (BKVRG1 ou BKVG2_RG1 ou BKVDEG_RG1)	0.5µM
Amorce antisens (BKVRG2 ou BKVG2_RG2 ou BKVDEG_RG2)	0.5µM
Sonde Taqman BKSRG	0.2µM
MgCl₂	4,5mM
IPC mix (sondes et amorces)	0.5X
IPC DNA	0.5X
Eau distillée stérile	QSP 20µL

TABLEAU 10 – COMPOSANTS DU MELANGE REACTIONNEL POUR LA PCR

Le mélange réactionnel est distribué sur la plaque à 96 puits à raison de 20µL par puits. Un volume de 5 µl d'acides nucléiques est déposé soit après extraction Qiagen, soit après chauffage-centrifugation pour les urines.

La programmation des cycles d'amplification comprend une première étape de préincubation (5 minutes à 50°C puis 10 minutes à 95°C) suivie de 45 cycles d'amplification de trois étapes : dénaturation pendant 20 secondes à 95°C, hybridation pendant 30 secondes à 57°C, élongation pendant 10 secondes à 72°C.

4. Critères de validation de la PCR

Tout d'abord, l'allure générale des courbes d'amplification est observée, elle permet de définir facilement le cycle à partir duquel la fluorescence passe la ligne de seuil ou *threshold* (cycle seuil Ct). Les courbes sont de type sigmoïde, comprenant un point d'inflexion net (correspondant au Ct), une phase exponentielle et une phase de saturation. Le Ct est déterminé par le logiciel d'analyse du LC96 avec un *threshold* automatisé.

Le témoin d'extraction PBS présent dans chaque série doit être négatif (Ct>45) afin d'écartier toute contamination du mélange réactionnel, des extraits ou des échantillons

primaires. L'amplification du contrôle interne IPC ($C_t < 40$) permet de vérifier l'absence d'inhibiteurs de PCR dans chaque puits. La gamme standard doit être amplifiée ($C_t < 40$) et les valeurs de C_t de chaque point d'étalonnage doit être comparée aux valeurs attendues pour au moins trois des quatre points, avec R^2 supérieur ou égal à 0,98 et une efficacité de la réaction comprise entre 1,8 et 2,2. Le CQI sera validé si son C_t est compris dans les bornes acceptées et sa quantification est de plus ou moins 0,5 $\log_{10}$ cp/mL par rapport à la moyenne flottante, ce qui permet de valider l'ensemble du processus analytique de l'extraction à la quantification.

V. RESULTATS

A. Optimisation de la technique existante

1. Choix des amorces

Après conception des couples d'amorces BKVG2 et BKVDEG, celles-ci ont été testées comparativement à la technique du laboratoire (amorces BKVR utilisées en routine), dans la même série afin de limiter les variations analytiques et sur les mêmes échantillons : un extrait de sang total EDTA et une urine bouillie d'un patient connu infecté avec un génotype II de BKPyV ainsi qu'une urine bouillie d'un patient connu infecté avec un génotype I de BKPyV. Dans cette série, les points de gamme plasmidique ont également été testés avec chaque couple d'amorces.

Echantillon	Amorces BKVR		Amorces BKVG2		Amorces BKVDEG	
	Ct	Concentration (cp/réaction)	Ct	Concentration (cp/réaction)	Ct	Concentration (cp/réaction)
Sang génotype II	33,9	5	23,2	5288	23,48	4423
Urine génotype II	30,74	39	16,25	492712	17,14	275915
Urine génotype I	18,78	95026	35,26	2	20	42730
Standard 5·10 ⁶ cp/réaction	12,65	5166283	20,76	26119	12,76	4823004
Standard 5·10 ⁴ cp/réaction	19,72	51427	27,53	315	19,67	52888
Standard 5·10 ² cp/réaction	26,95	458	34,5	3	27,05	431
Standard 5·10 ¹ cp/réaction	30,21	55	38,16	0	30,26	53
Témoin négatif	Négatif	N.A.	Négatif	N.A.	Négatif	N.A.
Chaque contrôle interne d'amplification IPC était positif dans cette série.						

TABLEAU 11 – COMPARAISON DES COUPLES D'AMORCES : VALEURS DES CYCLES SEUILS (Ct) ET DES CONCENTRATIONS CALCULEES

Les amorces BKVG2 améliorent la quantification des échantillons de génotype II, en revanche, elles ne permettent pas une quantification correcte ni de l'échantillon de génotype I, ni du standard de quantification plasmidique (Tableau 11). Les amorces BKVDEG, quant à elles, quantifient le standard plasmidique de manière comparable aux amorces BKVR et, à la

fois, améliorent la quantification des échantillons de génotype II en conservant une quantification correcte de l'échantillon de génotype I. Elles ont donc été choisies pour optimiser la technique de quantification de l'ADN de BKPyV. Les performances de notre technique BKVDEG sur le génotype I ont été comparées à la technique BKVR lors de l'essai de comparaison de méthodes (4. Comparaison de méthodes, page 57).

2. Détermination de la température d'amplification

Les amorces BKVDEG présentant une différence importante de températures de fusion (T_m) avec les amorces BKVR, il était nécessaire de vérifier si la température d'amplification était optimale ; le T_m de la sonde restant nettement supérieur aux T_m des amorces testées. Pour cela, nous avons testé les amorces en utilisant un gradient de température allant de 53°C à 60,9°C sur le LC96, à l'aide d'échantillons de 2 concentrations de BKPyV génotype I et de 2 concentrations de BKPyV génotype II. Les C_t obtenus sont présentés dans la Figure 13 et le Tableau 12.

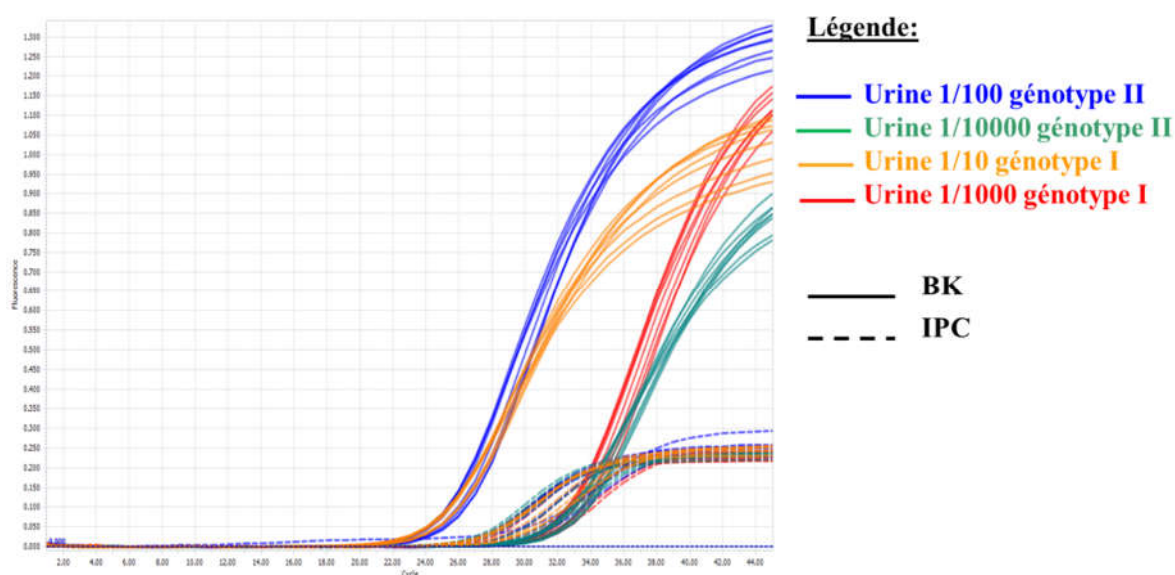


FIGURE 13 – ESSAI EN GRADIENT DE TEMPERATURE : COURBES D'AMPLIFICATION

Température d'hybridation	53°C	53,5°C	54,5°C	55,6°C	57°C	58,3°C	59,7°C	60,9°C	Différence entre valeurs extrêmes
Echantillon	Nombre de cycles seuil (Ct)								
Urine 1/100 génotype II	24,74	24,68	24,76	24,26	24,07	23,99	24,03	23,97	0,79
Urine 1/10000 génotype II	32,66	32,56	32,4	32,2	31,62	31,75	31,48	31,41	1,25
Urine 1/10 génotype I	25,26	25,21	24,99	24,75	24,29	24,11	24,12	24,11	1,15
Urine 1/1000 génotype I	32,66	32,32	32,36	31,88	31,63	31,67	31,41	31,44	1,25

TABLEAU 12 – ESSAI EN GRADIENT DE TEMPERATURE : VALEURS DE CT

On observe des différences de Ct très faibles entre chaque température pour les 4 échantillons, avec une différence maximale de l'ordre de 1,25 Ct. Le but de cet essai est de déterminer la température pour laquelle les Ct observés sont les plus faibles. Or, à partir de 57°C jusqu'à 60,9°C, la variation entre les Ct, pour une concentration et un génotype donnés, est minime. Au vu de ces résultats, la température d'hybridation à 57°C, qui est celle habituellement utilisée au laboratoire pour l'amplification de tous les virus à ADN, a pu être conservée.

B. Validation de méthode de PCR quantitative en virologie

Des essais ont ensuite été réalisés pour déterminer les performances analytiques de la technique, en vue de son accréditation en portée flexible étendue B, en décembre 2017 (Annexe 3, page 99).

1. Fidélité analytique

a) Répétabilité

L'essai de répétabilité a été réalisé en analysant 3 échantillons de patients, dix fois chacun, dans la même série. Le niveau 1 correspond à une urine prélevée le 12 juin 2017, après dilution au 1/20^e en PBS et ébullition, pour laquelle le résultat obtenu avec les amorces BKVR était de 7,6 log₁₀ cp/mL. Le niveau 2 correspond à un extrait d'ADN à partir d'un échantillon

de sang total EDTA du 22 mai 2017 rendu à 3,4 log₁₀ cp/mL. Le niveau 3 est un extrait d'ADN à partir de sang total EDTA du 24 avril 2017, rendu à 4,2 log₁₀ cp/mL. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 13.

Echantillon	n	Moyenne (log ₁₀ cp/mL)	Ecart-type (log ₁₀ cp/mL)	Moyenne (Ct)	Ecart-type (Ct)	CV (%)
Niveau 1	10	7,37	0,05	24,54	0,19	0,8
Niveau 2	10	3,55	0,10	32,36	0,33	1,0
Niveau 3	10	4,40	0,08	29,50	0,30	1,0

TABLEAU 13 – ESSAI DE REPETABILITE

Les critères fixés pour la conformité de l'essai de répétabilité sont : un coefficient de variation – ou CV – inférieur ou égal à 5% en Ct et un écart-type inférieur à 0,25 en log₁₀ cp/mL (Comité qualité de la Société Française de Microbiologie (QUAMIC), 2014). Les résultats de la répétabilité sont donc conformes aux critères fixés.

b) Reproductibilité ou fidélité intermédiaire

L'essai de reproductibilité a été réalisé en utilisant les points de gamme (standard plasmidique) testés lors de chaque série. Ainsi, l'essai fait varier les conditions analytiques : opérateurs, lots de mix réactionnels, lots de standard plasmidique, sur une période de temps supérieure à 20 jours. Les critères fixés pour la conformité de l'essai est un CV inférieur ou égal à 5% en Ct. Les résultats sont conformes aux critères fixés (Tableau 14).

Echantillon	n	Moyenne (Ct)	Ecart-type (Ct)	CV (%)
Niveau 1 : 5·10 ⁶ cp/réaction	30	14,15	0,23	1,6
Niveau 2 : 5·10 ⁴ cp/réaction	30	21,44	0,23	1,1
Niveau 3 : 5·10 ² cp/réaction	30	28,40	0,32	1,1
Niveau 4 : 5·10 ¹ cp/réaction	30	31,78	0,46	1,4

TABLEAU 14 – ESSAI DE REPRODUCTIBILITE

Ces résultats permettent de démontrer l'absence de variabilité inter-opérateurs, par ailleurs confirmée par le suivi, à chaque série, du CQI et de la gamme.

2. Robustesse

La technique utilisée est robuste car les coefficients de variation des résultats de reproductibilité sont proches de ceux des résultats de répétabilité, à niveau de concentration égal. Or la reproductibilité a été calculée sur une période de temps supérieure à 20 jours, avec des opérateurs différents et des conditions normales.

La stabilité du lot de mix suit la stabilité la plus courte des différents réactifs utilisés. La stabilité des réactifs est également validée à chaque série de PCR par la validation des 4 points de gamme et du CQI qui doivent être dans les valeurs attendues.

3. Justesse – exactitude

Dans le cas de la qPCR BKPyV, il n'existe pas de CQI externalisés, c'est pourquoi les résultats des contrôles de qualité externes comparés à la moyenne par groupe de pairs ont été utilisés (résultats présentés en Annexe 3, page 99). L'ensemble des résultats obtenus avec le programme QCMD est conforme, avec un biais inférieur à 10% et des différences entre les valeurs du laboratoire et celles du groupe de pairs toujours inférieures au seuil de 0,5 log₁₀ cp/mL. De plus, le score quantitatif obtenu sur le contrôle de qualité européen QCMD 2017 est de 0 pour tous les échantillons positifs, ce qui signifie moins d'un écart-type par rapport à la valeur consensus du groupe de pairs.

4. Comparaison de méthodes

La comparaison de méthodes a été effectuée par rapport à la méthode précédemment utilisée au laboratoire (amorces BKVR), car il n'existe pas de technique de référence pour la quantification de l'ADN de BKPyV. Au total, 50 échantillons ont été retestés avec les amorces BKVDEG. Les échantillons réanalysés étaient : soit des extraits de SE de patients, soit des urines de patients, soit des extraits de CQE, conservés à -20°C. La répartition des échantillons retestés en fonction de leur nature et de leur génotype est présentée dans le Tableau 15. Aucun

échantillon de génotype II n'a été utilisé dans la comparaison de méthodes en raison de la sous-quantification de ce génotype par les amorces BKVR.

Génotype \ Matrice	Urines	Sang total	Plasma	Milieu de transport	Extrait	Total
Sous-groupe Ia	2	2	0	0	0	4
Sous-groupe Ib-1	4	2	2	0	0	8
Sous-groupe Ib-2	2	2	18	2	0	24
Génotype I (sous-groupe non déterminé)	2	1	1	0	1	5
Génotype I (total)	10	7	21	2	1	41
Génotype IV	3	2	1	0	0	6
Génotype non déterminé	0	1	1	0	1	3
Total	13	10	23	2	2	50

TABLEAU 15 – COMPARAISON DE METHODES : ECHANTILLONS UTILISES

La relation est linéaire entre les résultats obtenus par les deux techniques, pour tous les génotypes (hors génotype II) testés, avec une pente de la droite de régression à 1,06 et une ordonnée à l'origine égale à 0,27 (Figure 14). Aucun point déviant n'a été observé. L'étendue des charges virales des échantillons utilisés est de 1,80 à 8,50 log₁₀ cp/mL.

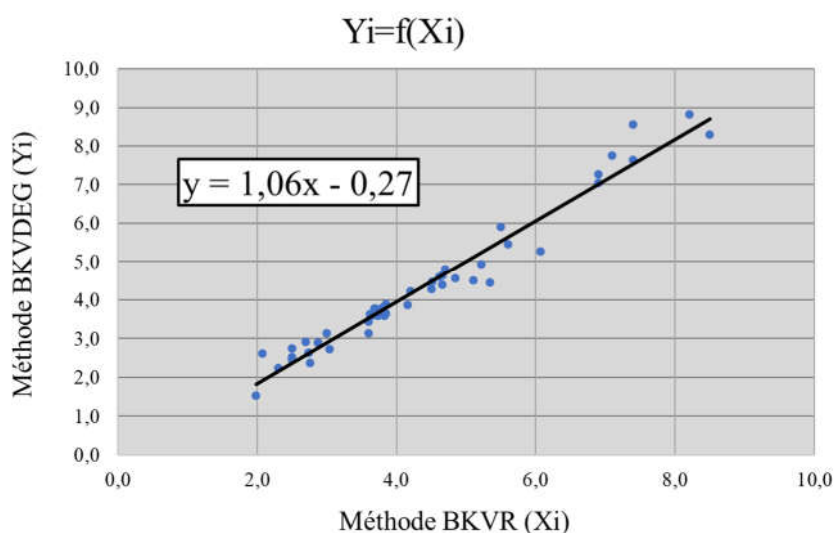


FIGURE 14 – COMPARAISON DE METHODES : DROITE DE CORRELATION

La corrélation entre les valeurs obtenues – en $\log_{10}$ cp/mL – a été étudiée. L'un des critères de conformité est que la moyenne des différences entre les deux techniques soit inférieure à 0,5 $\log_{10}$ cp/mL (Comité qualité de la Société Française de Microbiologie (QUAMIC), 2014), dans le cas de notre technique, cette moyenne est de 0,04 $\log_{10}$ cp/mL, ce qui est donc conforme (Tableau 16).

	n	Moyenne des différences ($\log_{10}$ cp/mL)	Valeur moyenne minimale ($\log_{10}$ cp/mL)	Valeur moyenne maximale ($\log_{10}$ cp/mL)
Sous-groupe Ia	4	0,03	2,30	8,40
Sous-groupe Ib-1	8	-0,25	1,80	8,00
Sous-groupe Ib-2	24	0,04	2,50	8,50
Génotype I (sous-groupe non déterminé)	5	0,50	4,00	5,70
Génotype I (total)	41	0,04	1,80	8,50
Génotype IV	6	-0,07	2,50	7,10
Génotype non déterminé	3	0,23	3,80	5,50
Total	50	0,04	1,80	8,50

TABLEAU 16 – COMPARAISON DE METHODES : RESULTATS PAR GENOTYPE

5. Etendue de mesure

L'étendue de mesure a été déterminée en réalisant une gamme de concentration comprenant 9 concentrations différentes de standard plasmidique : $5 \cdot 10^8$, $5 \cdot 10^7$, $5 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^2$, 50 et 5 cp/réaction ; cette gamme a permis de tester la linéarité de la technique et de déterminer la limite supérieure de linéarité. Pour la détermination de la LOD et de la LLOQ, nous avons testé une gamme de concentrations plus basses – gamme « faible » –, à savoir : 12,5, 5, 2,5, 1 et 0,5 cp/réaction.

a) Limite supérieure de linéarité

Chaque concentration de la gamme de linéarité a été testée 3 fois dans la même série, ce qui a permis de calculer le coefficient de variation pour chaque *triplicate* (Tableau 17). La technique était linéaire jusqu'à la plus haute concentration testée ($CV < 5\%$), d'où une limite supérieure de linéarité fixée à 8,70 $\log_{10}$ cp/réaction soit 10,70 $\log_{10}$ cp/mL de sang. En

revanche, la concentration la plus basse testée (5 cp/réaction) présentait un CV trop élevé pour être acceptable.

Dilution (cp/réaction)	5	50	5·10 ²	5·10 ³	5·10 ⁴	5·10 ⁵	5·10 ⁶	5·10 ⁷	5·10 ⁸
Concentration (log ₁₀ cp/réaction)	0,70	1,70	2,70	3,70	4,70	5,70	6,70	7,70	8,70
Réplicat 1	0,70	2,01	2,94	3,90	4,92	5,87	6,81	7,61	8,61
Réplicat 2	1,11	2,09	2,95	3,88	4,86	5,87	6,90	7,62	8,70
Réplicat 3	1,15	1,97	2,90	3,93	4,88	5,89	6,88	7,60	8,70
Moyenne	0,99	2,03	2,93	3,90	4,89	5,87	6,86	7,61	8,67
Ecart-type	0,25	0,06	0,02	0,02	0,03	0,01	0,04	0,01	0,05
CV%	25,22	3,02	0,82	0,55	0,61	0,17	0,68	0,13	0,62

TABLEAU 17 – ESSAI DE LINEARITE

b) Limite de détection ou LOD

Dans le but de déterminer la limite de détection, ou LOD, nous avons testé 12 réplicats de chaque concentration d'une gamme représentant des valeurs faibles de quantification (Tableau 18).

Concentration théorique (cp/réaction)	12,5	5	2,5	1	0,5
Concentration théorique (log ₁₀ cp/réaction)	1,10	0,70	0,40	0,00	-0,30
Réplicat 1	1,29	0,91	0,59	0,30	-0,05
Réplicat 2	0,89	1,02	0,08	N	N
Réplicat 3	1,40	0,93	0,36	0,23	N
Réplicat 4	1,34	0,76	0,53	0,26	N
Réplicat 5	1,17	0,78	0,65	0,11	0,20
Réplicat 6	1,30	0,30	0,00	N	N
Réplicat 7	1,37	0,57	0,00	-0,22	0,18
Réplicat 8	1,13	0,66	0,86	N	N
Réplicat 9	1,16	0,83	N	N	N
Réplicat 10	0,93	0,72	0,52	0,34	N
Réplicat 11	1,27	1,04	0,73	0,30	0,08
Réplicat 12	1,27	0,73	0,00	N	N
Pourcentage de positifs	100%	100%	92%	58%	33%
Valeur de la table de Finney	NA	NA	6,41	5,2	4,56
Moyenne (log ₁₀ cp/réaction)	1,21	0,77	0,39	0,19	0,10
Ecart-type (log ₁₀ cp/réaction)	0,16	0,20	0,32	0,20	0,11
CV (%)	14%	26%	82%	103%	109%

TABLEAU 18 – CALCUL DE LA LIMITE DE DETECTION : RESULTATS OBTENUS AVEC LA GAMME « FAIBLE »

La LOD correspond à la concentration pour laquelle 95% des passages sont positifs. Après avoir déterminé le pourcentage de positivité pour chaque concentration, ce pourcentage a été converti en valeur de la table de Finney (Annexe 4, page 103 ; Finney, 1952). Le graphe des valeurs de la table de Finney en fonction des valeurs de concentration est présenté dans la Figure 15. A l'aide d'une régression linéaire, la valeur de concentration théorique pour laquelle valeur de la table de Finney serait égale à 6,64 – *i.e.* 95% des passages positifs – a été déterminée. La LOD calculée est donc de 0,50 log₁₀ cp/réaction soit 3,14 cp/réaction, donc 314 cp/mL de sang, correspondant à la sensibilité analytique de la méthode.

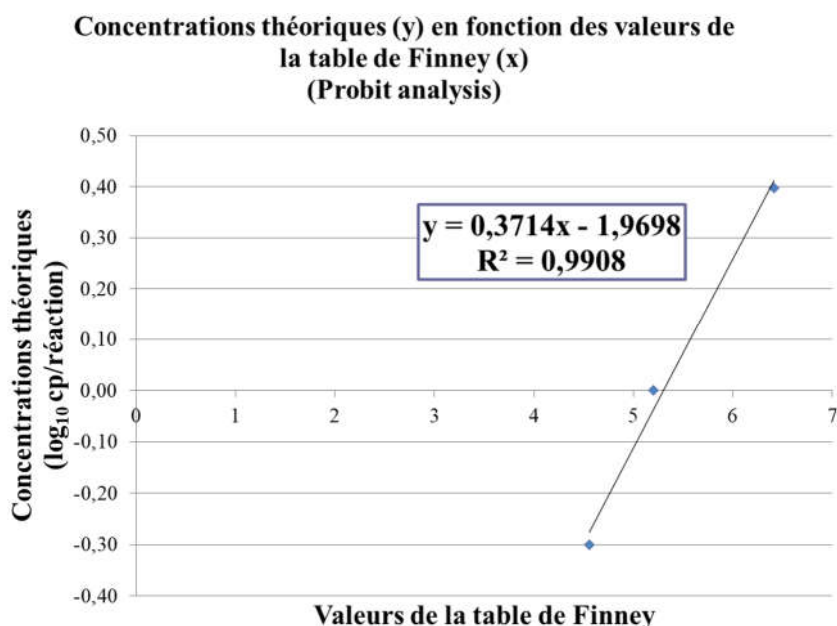


FIGURE 15 – CALCUL DE LA LIMITE DE DETECTION : PROBIT ANALYSIS

c) Limite de quantification ou LLOQ

La gamme utilisée a permis de démontrer la linéarité de la technique avec des CV acceptables sur une étendue allant de 8,70 log₁₀ cp/réaction à 5 cp/réaction. La limite de quantification a donc été déterminée en prenant le dernier point de la gamme faible (utilisée pour déterminer la LOD) pour lequel le pourcentage de positifs est supérieur à 95%. La LLOQ est donc de 5 cp/réaction soit 500 cp/mL de sang.

6. Spécificité analytique

Les séquences des amorces BKRG1 et BKRG2 et de la sonde BKSRG ont été analysées avec l'outil BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et n'ont montré aucune réactivité croisée théorique avec d'autres organismes que le BKPyV. En pratique, leur réactivité croisée a été testée avec certains virus à ADN, en utilisant les témoins positifs des PCR de routine du laboratoire pour JCPyV, VZV, HSV1, HSV2, EBV, CMV, Parvovirus B19, HHV6, HHV8 et Adenovirus, ne présentant alors aucune amplification. L'absence de substances interférentes dans les extraits, et notamment d'inhibiteurs de PCR, est mise en évidence pour chaque tube grâce à l'ajout au spécimen d'une séquence de contrôle IPC, mesurée dans le canal VIC, qui est le témoin d'amplification de la technique. Afin d'exclure toute inhibition de PCR par de l'héparine, les prélèvements de sang à analyser sont effectués sur des tubes EDTA.

7. Incertitude de mesure

L'incertitude de mesure a été déterminée à partir des résultats du CQI (valeurs acceptées allant de 2,8 à 3,8 log₁₀ cp/mL ; moyenne = 3,18 log₁₀ cp/mL) et des résultats de contrôles externes de qualité (programme QCMD) dans une fourchette de valeurs proches des valeurs attendues du CQI. L'incertitude composée ainsi obtenue est de +/- 0,25 log₁₀ cp/mL et l'incertitude élargie de +/- 0,51 log₁₀ cp/mL, pour un résultat quantitatif à 3,18 log₁₀ cp/mL. La valeur cible attendue de l'incertitude de mesure est à 0,5 log₁₀ cp/mL. Ce résultat est donc considéré comme acceptable.

8. Contamination inter-échantillons

Un test de contamination inter-échantillon a été réalisé sur 30 dépôts suivant la séquence suivante : 3 dépôts consécutifs de niveau haut (échantillon d'urine positif à 6 log₁₀ cp/mL), suivis de 3 dépôts consécutifs d'eau pour préparations injectables ; cette séquence étant répétée 5 fois. Tous les dépôts supposés négatifs ne présentent pas de courbe d'amplification, ce qui a permis de conclure à l'absence de contamination inter-échantillons.

C. Standard international de quantification de l'OMS

Afin de calculer le facteur de conversion, le standard international a été reconstitué dans 1 mL d'eau stérile, puis dilué au $1/10^6$ parallèlement dans du sang total EDTA et dans de l'urine. Les aliquots ont été congelés à -20°C , puis analysés en *triplicate* 4 jours de suite, après extraction pour le sang total EDTA, et après dilution-ébullition pour les urines (Figure 16). La quantification théorique du standard est de $1,58 \cdot 10^7$ UI/mL.

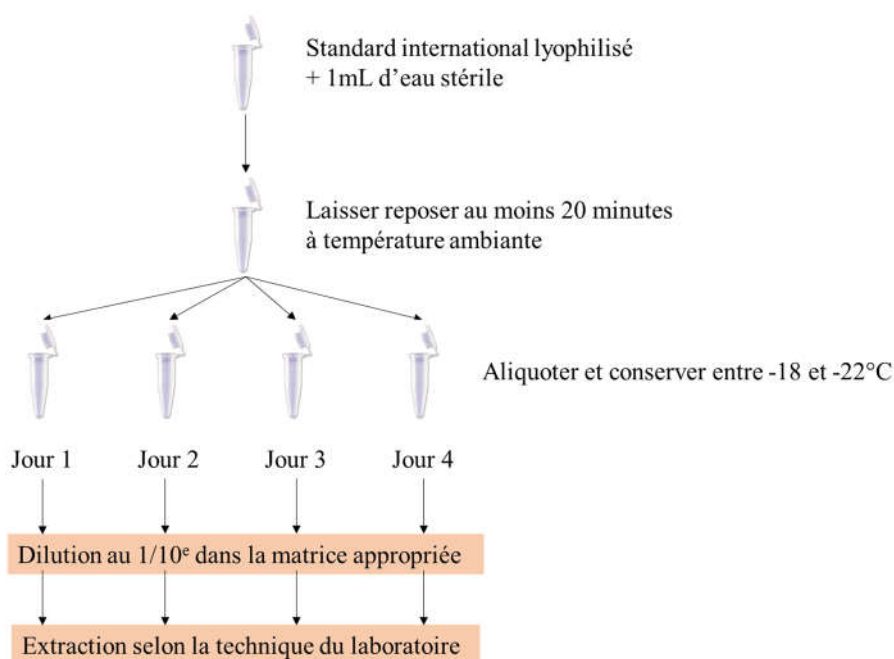


FIGURE 16 – PROTOCOLE POUR LA DETERMINATION DU FACTEUR DE CONVERSION DU STANDARD NIBSC

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 19. Le facteur de conversion est déterminé en établissant la moyenne des quantifications obtenues par matrice sur les 4 jours, puis en divisant la quantification théorique du standard (diluée au $1/10^6$) par cette moyenne. Les facteurs de conversion obtenus sont de 3,41 pour le sang total EDTA et de 30,89 pour les urines diluées puis bouillies. Au vu de ces résultats, les urines ont été retestées avec une étape d'extraction par le kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen, le facteur de conversion alors obtenu est de 8,79.

	Sang EDTA		Urines diluées – bouillies		Urines après extraction QIA DSP	
Quantification	cp/mL	log ₁₀ cp/mL	cp/mL	log ₁₀ cp/mL	cp/mL	log ₁₀ cp/mL
JOUR 1	489000	5,69	58960	4,77	189024	5,28
	417800	5,62	62080	4,79	186528	5,27
	373800	5,57	56760	4,75	162336	5,21
JOUR 2	479400	5,68	66640	4,82	180480	5,26
	495400	5,69	45320	4,66	175776	5,24
	518700	5,71	26248	4,42	166752	5,22
JOUR 3	479400	5,68	23992	4,38	175776	5,24
	431700	5,64	25000	4,40	203328	5,31
	495400	5,69	31020	4,49	217248	5,34
JOUR 4	464000	5,67	94880	4,98	167808	5,22
	455000	5,66	73360	4,87	170112	5,23
	473200	5,68	51520	4,71	167808	5,22
Moyenne	464400	5,67	51315	4,71	180248	5,26
Facteur de conversion	3,41		30,89		8,79	

TABLEAU 19 – DETERMINATION DU FACTEUR DE CONVERSION

Ces résultats nous ont amené à vérifier l'influence de l'extraction sur la quantification du BKPyV dans les urines. Nous avons donc comparé, dans une même série de qPCR BKPyV, la quantification obtenue pour des échantillons d'urines après dilution au 1/20^e et ébullition et après extraction par le kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen (Tableau 20).

Numéro d'échantillon	Après dilution – ébullition		Après extraction QIA Symphony		Différences (log ₁₀ cp/mL)
	Quantification (log ₁₀ cp/mL)	IPC (Ct)	Quantification (log ₁₀ cp/mL)	IPC (Ct)	
2420337	4,4	31,15	3,5	28,79	1,1
2420569	8,4	30,49	8,4	28,59	0,0
2360369	8,7	30,87	7,1	28,76	1,4
2360949	4,8	30,59	5,5	28,79	-0,7
2370450	4,2	30,4	5,3	28,77	-1,1
2400979	7,6	30,29	6,9	28,79	0,7
2331153	7,6	30,22	6,2	29,02	1,4
2340855	5,5	30,56	3,6	28,85	1,9
2340914	8,9	30,59	9,4	29,01	-0,5
2351451	7,9	30,43	8,0	28,54	0,1

TABLEAU 20 – DIFFERENCES DE QUANTIFICATION SELON LE PRE-TRAITEMENT DES URINES

Cette expérience a permis de montrer l'absence de sous-quantification pour les urines diluées au 1/20^e et bouillies. Cependant, des variations plus ou moins importantes de quantification entre les deux techniques ont été observées, pouvant être liées à une précision moindre dans le cas des urines diluées. L'absence d'inhibiteur est mise en évidence par des Ct du contrôle interne IPC acceptables, selon nos critères de validation, et comparables selon les techniques.

D. Application au suivi des patients de la cohorte infectés par un BKPyV de génotype II

Les résultats observés au cours de l'essai ayant abouti au choix des amorces ont montré une supériorité des amorces BKVDEG sur le génotype II par rapport aux résultats obtenus avec les amorces BKVR, et ce, malgré une conservation prolongée des échantillons à -20°C. Nous avons donc réanalysé les échantillons des 4 patients connus porteurs du génotype II, quel que soit le résultat du test de routine initial avec les amorces BKVR.

Au total, 56 échantillons du suivi de ces patients ont pu être de nouveau testés. 56% des échantillons initialement négatifs ont obtenu un résultat positif avec les amorces BKVDEG (valeur moyenne = 3,9 log₁₀ cp/mL ; n = 23). Les échantillons connus positifs ont, eux, montré une sous-quantification moyenne de l'ordre de 3,2 log₁₀ cp/mL (n = 15) avec les anciennes amorces, par rapport aux amorces BKVDEG.

1. Patient LeG

Il s'agit d'un patient de sexe masculin greffé de rein en octobre 2009 sur une insuffisance rénale chronique obstructive et hypertensive à l'âge de 63 ans. Les suites de la greffe ont été simples. Le statut vis-à-vis du CMV était D⁺/R⁻ – donneur séropositif, receveur séronégatif – ce qui a justifié une prophylaxie par Valganciclovir. Le traitement immunosuppresseur comportait du tacrolimus (9,5 mg/jour), du MMF (2 g/jour) et des

corticoïdes (arrêtés en janvier 2010). Le suivi des charges virales de BKPyV chez ce patient sont présentées dans la Figure 17.

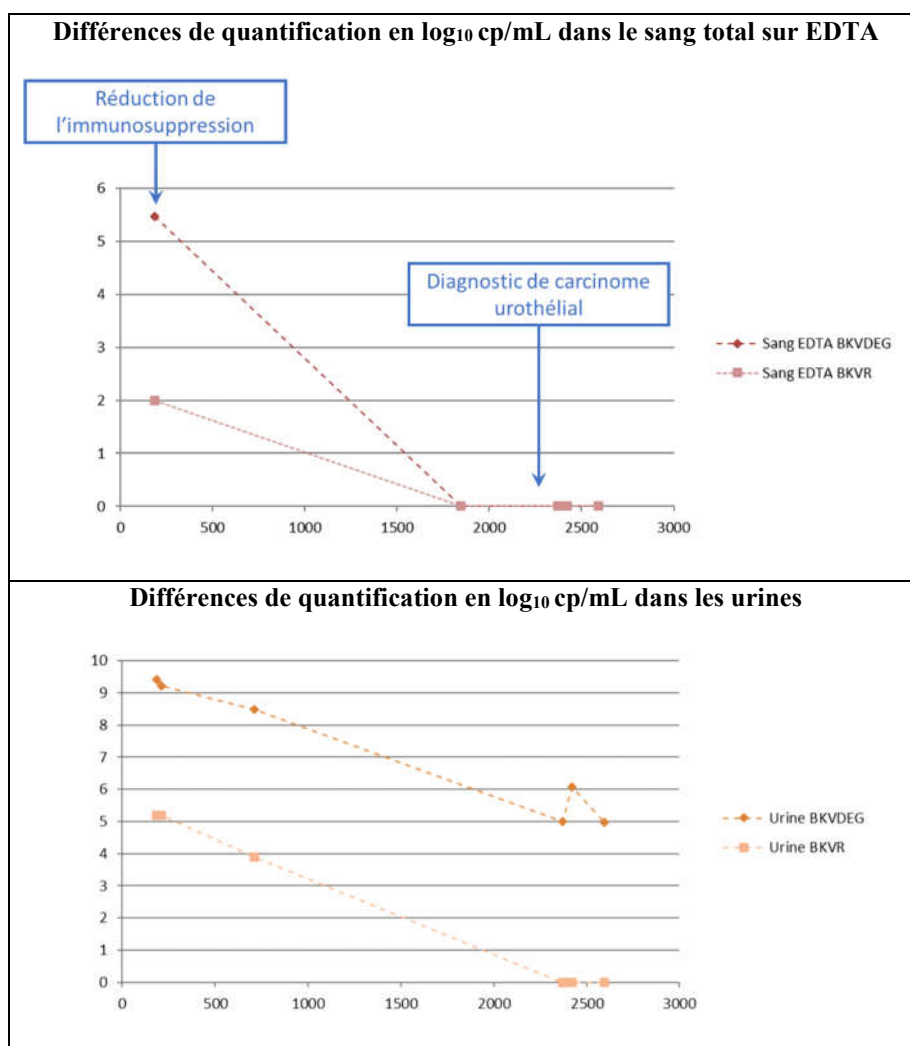


FIGURE 17 – ANALYSE DES PATIENTS DE GENOTYPE II : SUIVI DU PATIENT LEG

En ce qui concerne la réplication de BKPyV chez ce patient, elle a été suivie en post-greffe puis lors d'épisodes d'hématurie en 2016. En post-greffe (environ 200 jours), le patient a présenté une virurie à 5,2 log₁₀ cp/mL et une virémie à 2 log₁₀ cp/mL. Après recontrôle avec les amorces BKVDEG, les charges virales étaient en fait mesurées à 9,4 log₁₀ cp/mL dans les urines avec une virémie à 5,5 log₁₀ cp/mL, ce qui est au-dessus du seuil d'intervention thérapeutique. Le traitement immunosuppresseur a tout de même été diminué : 5 mg/jour de tacrolimus et diminution du MMF de 1,5 à 1 g/jour. Cet épisode a été résolutif puisque les autres

échantillons sanguins du suivi qui étaient alors négatifs le sont aussi avec les amorces BKVDEG.

En août 2016, ce patient a été diagnostiqué avec un carcinome urothélial micropapillaire avec dysplasie de haut grade, découvert dans un contexte d'hématurie. A l'époque, la virurie BKPyV avait été rendue négative. Après réanalyse avec les nouvelles amorces, elle était en fait à environ 5 log₁₀ cp/mL. Mais l'hypothèse d'une cystite hémorragique à BKPyV a été écartée au vu des arguments anatomopathologiques. En effet, en juillet 2016, l'analyse histologique des urines montrait l'absence de Decoy cells mais la présence de cellules urothéliales très atypiques en faveur de cellules dysplasiques de haut grade. Il a bénéficié d'une ponction biopsie rénale en octobre 2016 montrant des plages de fibrose avec de nombreux tubes atrophiques mais l'absence de marquage immunohistochimique par les Ac anti-AgT, ce qui n'exclut pas une NBKV.

2. Patiente MeP

MeP est une patiente de sexe féminin âgée de 50 ans lors de sa transplantation rénale de janvier 2013, faisant suite à une insuffisance rénale chronique probablement d'origine vasculaire, découverte en 2006, sur un terrain d'hypertension artérielle ancienne. L'immunosuppression comprenait de la ciclosporine, du MMF et des corticoïdes. Dans les suites de la greffe, la patiente, infectée par le virus de l'hépatite C, a présenté une répllication modérée sans cytolysse. Tous les échantillons du suivi de cette patiente n'ont pas pu être réanalysés (Figure 18).

La patiente a présenté une virurie à 3,6 log₁₀ cp/mL sans virémie à un mois de sa greffe, ces valeurs étant très probablement sous-estimées du fait du manque de spécificité des amorces pour le génotype II. Une réanalyse des échantillons sang et urines à 70 jours de la

transplantation, rendus négatifs avec les amorces BKVR, a montré une virurie à 6,3 log₁₀ cp/mL sans virémie.

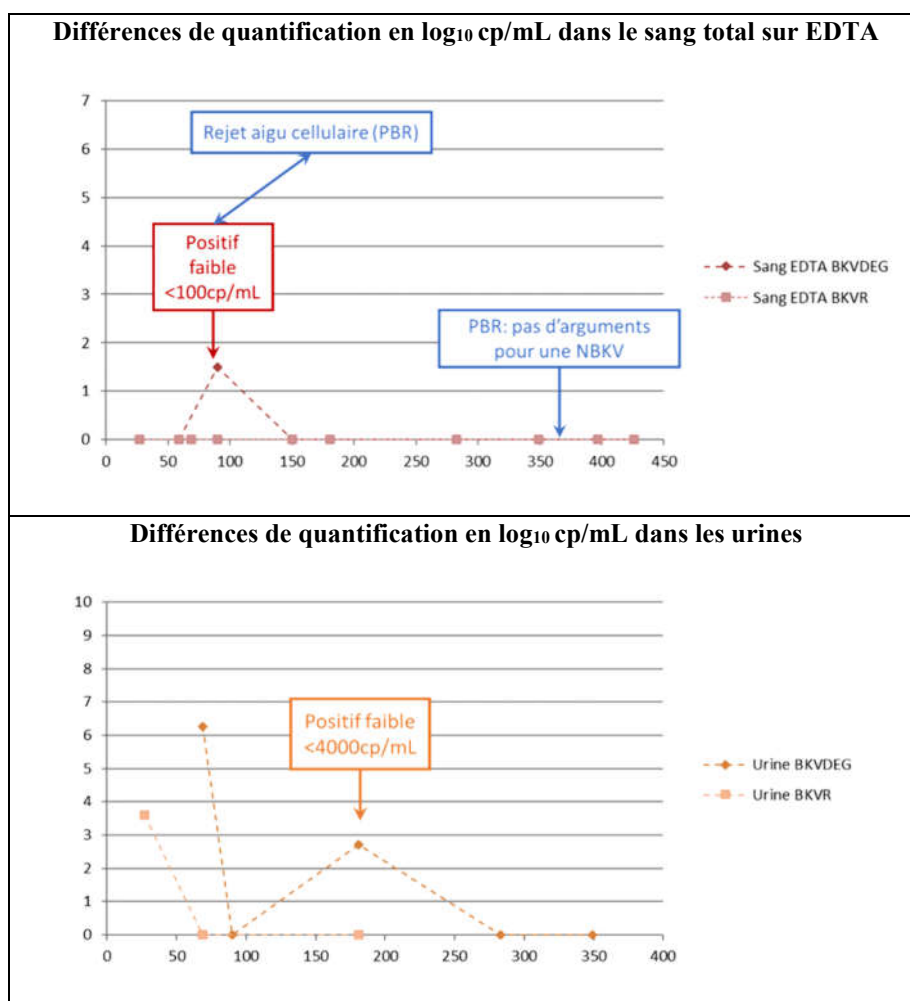


FIGURE 18 – ANALYSE DES PATIENTS DE GENOTYPE II : SUIVI DE LA PATIENTE MEP

Une PBR réalisée en avril 2013 (3 mois post-transplantation) a montré un rejet aigu cellulaire de grade IIb, ainsi que des lésions de FI/AT de grade I, probablement déjà présentes chez le donneur. Une autre PBR réalisée en février 2014 (1 an post-transplantation) montrait seulement une FI/AT de grade I discrètement inflammatoire, sans argument pour une néphropathie à BKPyV.

La patiente a subi une détérioration de son état de santé marquée par une répllication de son hépatite C, une pneumopathie, des poussées hypertensives et une sténose de l'artère du greffon ayant mené à son décès en 2014.

3. Patient ChD

Ce patient de sexe masculin a été greffé de rein en novembre 2012 à l'âge de 69 ans sur une néphropathie diabétique. Le statut vis-à-vis du CMV était D⁺/R⁺ ce qui a justifié une prophylaxie par Valganciclovir.

Lors du suivi initial de la réplication de BKPyV, le patient a présenté une virurie à un mois de la greffe, à 4,1 log₁₀ cp/mL. A 70 jours post-greffe, il présentait une virémie à 2,6 log₁₀ cp/mL associée à une virurie à 4,5 log₁₀ cp/mL. Tous les prélèvements réalisés par la suite étaient négatifs. Les résultats obtenus lors de la réanalyse à l'aide des amorces BKVDEG sont présentés dans la Figure 19. On observe que dès 70 jours post-greffe, le patient présentait une virémie supérieure à 4 log₁₀ cp/mL, ce qui correspond à une réactivation très précoce.

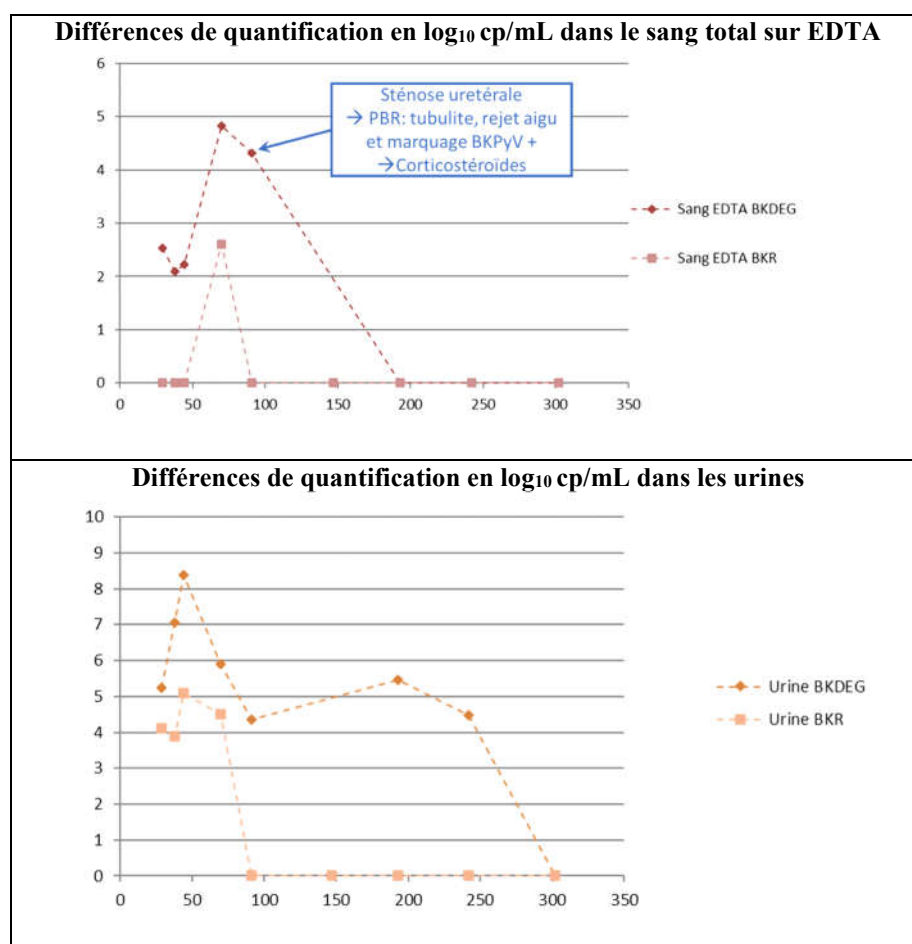


FIGURE 19 – ANALYSE DES PATIENTS DE GENOTYPE II : SUIVI DU PATIENT ChD

A 2 mois de sa greffe, le patient a présenté une récurrence d'hydronéphrose du greffon. A 3 mois post-greffe, il a présenté une sténose du bas uretère du greffon. La PBR alors réalisée a montré un rejet aigu cellulaire grade Ib avec un aspect de tubulite et quelques noyaux de cellules épithéliales tubulaires marquées par les Ac anti-AgT. Le marquage n'a pas été retenu comme significatif car la qPCR BKPyV réalisée dans le sang et dans les urines ce jour-là était négative, or, après réanalyse par les amorces BKVDEG, il s'avère que le patient présentait une virémie à $4,3 \log_{10}$ cp/mL associée à une virurie à $4,3 \log_{10}$ cp/mL, ce qui est au-delà du seuil d'intervention thérapeutique. L'épisode de rejet a été alors pris en charge par des corticoïdes à forte dose.

A 5 mois de sa greffe, il a présenté une réactivation à CMV traitée initialement par ganciclovir, puis relayé par valganciclovir à forte dose. A 8 mois de la greffe, il a subi une néphrectomie de son rein droit (rein propre) sur une pyonéphrose récidivante responsable d'une septicémie. La fonction du greffon s'est progressivement dégradée jusqu'à un retour en dialyse à 14 mois de la greffe.

4. Patient LeA

Ce patient de sexe masculin a été greffé de rein une première fois en 2001, des suites d'une glomérulonéphrite mésangio-proliférative. Il a alors bénéficié d'une seconde greffe rénale en juillet 2012, après un an de retour en dialyse dans le cadre d'une glomérulopathie qui n'a pas été associée à une récurrence de la maladie initiale. L'immunosuppression comportait du tacrolimus à 3 mg/jour, du MMF à 1440 mg/jour et des corticoïdes. Le statut vis-à-vis du CMV était D⁺/R⁻, justifiant une prophylaxie par Valganciclovir. Le patient a présenté une primo-infection CMV à 8 mois de la greffe, résistante au ganciclovir, traitée par foscarnet et par immunoglobulines intraveineuses. Le patient a conservé une PCR CMV positive, et a donc bénéficié d'une réduction de son immunosuppression. Une autre problématique, dans les suites de cette seconde greffe rénale, a été une élévation de sa créatininémie (Figure 20), sans signes

de rejet, et sans étiologie retrouvée, nécessitant un retour en dialyse en février 2017. De plus, il a développé des DSA, des anticorps dirigés contre les épitopes HLA du greffon.

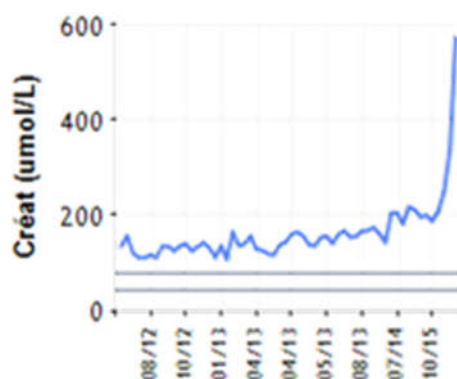


FIGURE 20 – SUIVI DE LA CREATININEMIE DU PATIENT LEA (EN µMOL/L)

La PBR post-greffe et la PBR à un an de la greffe étaient sans particularités. A 2 ans post-greffe, celle-ci présentait des lésions de tubulite, sans marquage par les Ac anti-AgT et sans arguments pour un rejet humoral. A 3 ans de sa greffe, le patient présentait une tubulopathie aigüe modérée avec fixation diffuse de complément et de DSA, ne permettant pas d'affirmer un rejet aigu humoral.

Concernant la réplication du BKPyV, le patient a présenté une virémie à 2,5 log₁₀ cp/mL à 6 mois post-greffe, qui, après réanalyse par les amorces BKVDEG, était en fait de 5,7 log₁₀ cp/mL. A ce moment-là, son traitement immunosuppresseur comportait du tacrolimus à 2,5 mg/jour et du MMF à 720 mg/jour. Cette virémie a persisté au même niveau pour ne repasser sous le seuil d'intervention thérapeutique qu'à partir du 12^{ème} mois post-greffe (Figure 21). L'immunosuppression avait été diminuée à 9 mois de la greffe à 2 mg/jour de tacrolimus et le MMF avait alors été arrêté. Cette réplication a été prolongée avec une virémie détectable – après réanalyse par les amorces BKVDEG – jusqu'à 2 ans post-greffe.

En 2017, ce patient a été inscrit sur liste d'attente pour une 3^{ème} transplantation rénale. Il présente alors une chorioretinite post-corticothérapie avec une quasi-cécité d'un œil, ce qui contre-indique chez lui toute nouvelle prise de corticoïdes.

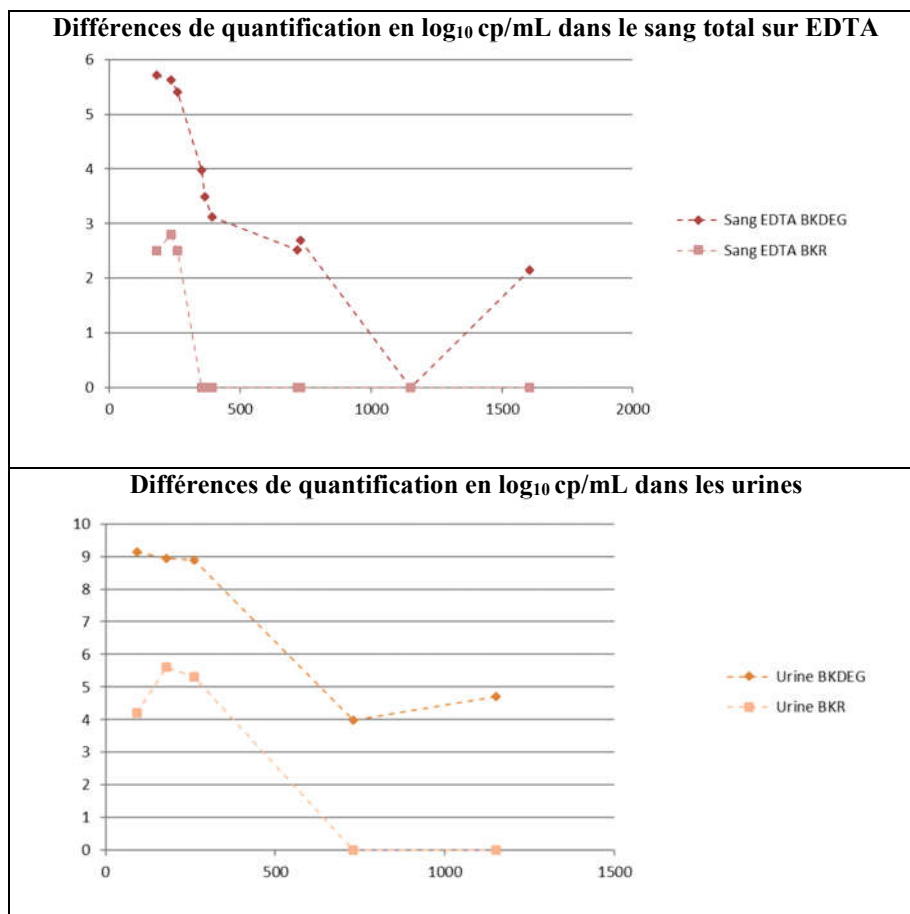


FIGURE 21 – ANALYSE DES PATIENTS DE GENOTYPE II : SUIVI DU PATIENT LEA

VI. DISCUSSION

La quantification de la charge virale du BKPyV dans le sang et dans les urines est une méthode de diagnostic non invasif indispensable au suivi de certaines populations immunodéprimées telles que les greffés rénaux et les allogreffés de CSH. La technique précédemment utilisée au CHU de Nantes sous-quantifiait le génotype II. Cette sous-quantification spécifique de génotype est en lien avec la diversité de la région T du génome de BKPyV qui est corrélée à la diversité génotypique observée dans la région VP1 (Luo et al., 2009).

L'objectif principal était de concevoir des amorces présentant une meilleure spécificité pour le génotype II, sans perdre en termes de sensibilité sur les autres génotypes. Dans un second temps, nous avons procédé à la validation de méthode de la qPCR BKPyV en vue de son accréditation. Le troisième objectif a été de valider notre technique quantitative à l'aide du standard international de quantification mis au point par l'OMS. D'un point de vue clinique, l'impact de cette sous-quantification du génotype II a été étudié chez les patients connus infectés par un BKPyV de génotype II de la cohorte du CHU de Nantes.

Nous avons d'abord comparé les séquences des souches de référence représentatives de chaque génotype dans la zone d'appariement des amorces de la qPCR BKPyV. Nous avons ainsi identifié les mutations de polymorphisme correspondant aux différents génotypes et conçu de nouvelles amorces : BKVDEG – amorces dégénérées – et BKVG2 – spécifiques de génotype II. La première expérience nous a permis d'observer une bonne amplification de tous les génotypes, y compris le génotype II, avec les amorces dégénérées. Avec les amorces BKVG2, le standard plasmidique est sous-quantifié car il a été obtenu à partir du produit de PCR d'un génotype I.

Nous avons ensuite procédé à la validation de méthode qui nous a permis d'obtenir l'accréditation en portée B, selon la norme NF ISO 15189, de la technique utilisant les amorces BKVDEG, sur le sang total EDTA, en décembre 2017. La technique était conforme sur l'ensemble des critères de qualité testés. La répétabilité et la reproductibilité étaient conformes avec des CV inférieurs à 5% et la technique est robuste. L'exactitude était conforme avec des biais inférieurs à 10%. La technique est spécifique du BKPyV et la corrélation avec la technique BKVR est bonne sur les génotypes non II testés. Concernant l'étendue de mesure, la limite supérieure de linéarité est de $10,70 \log_{10}$ cp/mL, la limite de quantification de 500 cp/mL et la limite de détection de l'ordre de 300 cp/mL. L'absence de contamination inter-échantillons a été testée par un essai de contamination. L'analyse de risques selon la méthode AMDEC a permis de mettre en évidence certaines étapes critiques et de proposer des actions afin d'y remédier. Par exemple, lors du dépôt des extraits, le technicien utilise une feuille de route et positionne les échantillons à déposer dans l'ordre de cette feuille de route. Le poste de travail doit être organisé de façon à ne pas déposer deux fois le même échantillon, ou deux fois dans le même puits, ou oublier de déposer un échantillon. De plus, le volume étant faible (5 μ L), un contrôle visuel du cône avant dépôt est donc essentiel. L'ensemble de ces pratiques sont transmises aux techniciens lors de l'habilitation au poste et sont nommées « bonnes pratiques de dépôt ». L'analyse de risques a aussi permis de régulariser le passage d'une plaque de contrôle sur l'automate LC96 afin de s'affranchir de dysfonctionnements de l'automate. Les urines n'ont pas été soumises à l'accréditation en raison du pré-traitement des échantillons par dilution et ébullition qui semble plus difficilement accréditable. De plus, les exigences en termes de précision et de sensibilité de la quantification sont moindres quand il s'agit d'évaluer la virurie. Enfin, en accord avec les cliniciens, le suivi des patients transplantés de rein de la cohorte du CHU de Nantes a été modifié récemment, dans le but de limiter les examens complémentaires. Désormais, la surveillance a lieu à 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 et 24 mois sur

prélèvement de sang total sur EDTA uniquement. Un aliquot d'urines est tout de même prélevé et conservé en biothèque sans analyse.

Nous avons évalué les conséquences cliniques de la sous-quantification du génotype II chez 4 patients adultes transplantés de rein et suivis à Nantes. Le faible nombre de patients infectés par un génotype II dans notre cohorte est probablement représentatif de la faible prévalence de ce génotype à l'échelon mondial, mais également, d'une sous-détection du génotype II par la technique jusqu'alors utilisée en routine. L'utilisation des amorces BKVDEG en routine permettra certainement l'identification de nouveaux patients porteurs du BKPyV pour lesquels il sera nécessaire d'effectuer un séquençage de la région codant pour VP1 afin de déterminer leur génotype.

Pour le patient LeG, le traitement immunosuppresseur avait été diminué lors de la détection initiale de la virémie, même sans qu'elle atteigne le seuil d'alerte de 4 log₁₀ cp/mL. Chez ce patient, c'est le diagnostic de carcinome urothélial micropapillaire qui pose la question d'un lien éventuel avec la répllication du BKPyV. Afin d'investiguer plus avant le cas de M. LeG, il serait intéressant de rechercher les échantillons de biopsies tumorales de ce patient afin de les tester avec notre qPCR BKPyV, voire, de rechercher une éventuelle intégration du BKPyV au génome tumoral. Une étude rétrospective multicentrique s'intéressant au risque relatif de carcinome urothélial associé à l'infection par BKPyV chez les transplantés rénaux a mis en évidence un risque plus élevé de développer un carcinome urothélial en cas d'infection par le BKPyV, mais sans qu'il ne soit statistiquement significatif (Rogers et al., 2017).

Dans le cas du patient ChD, la sous-quantification par les amorces BKVR a induit une erreur de prise en charge thérapeutique, menant à l'utilisation de corticoïdes à forte dose au lieu d'une réduction de l'immunosuppression lors de la virémie à BKPyV. Chez ce patient, une sténose urétérale pouvant être reliée au BKPyV a été observée.

Pour les deux autres patients, la sous-quantification du BKPyV n'a pas évolué vers des complications de l'infection : la ré-analyse avec les nouvelles amorces n'a pas mis en évidence de virémie élevée prolongée pour MeP, et il n'y avait pas de signes évocateurs de NBKV. De même, pour le patient LeA, l'analyse le marquage anti-AgT était négatif à 2 ans post-greffe, et la dysfonction du greffon est apparue longtemps après la négativation de la virémie.

Enfin, nous avons testé le standard international NIBSC afin de pouvoir exprimer les charges virales BKPyV en UI/mL au laboratoire. Le standard a été testé soit après dilution en sang total soit après dilution en urines et des réplicats ont été extraits et analysés 4 jours de suite. Les facteurs de conversion obtenus pour passer des copies aux UI sont de 3,41 pour le sang total EDTA extrait sur QIA Symphony et de 30,89 pour les urines diluées puis bouillies. Ce facteur de conversion étant très élevé dans les urines, le standard dilué en urines a été réanalysé avec une étape d'extraction par le kit QIA Symphony DSP Virus/Pathogen, permettant cette fois d'obtenir un facteur de conversion de 8,79. Les Ct du contrôle interne IPC étaient acceptables et proches dans les deux cas (respectivement de 29 Ct *versus* 31 Ct), ce qui a permis de conclure à l'absence d'inhibiteur. Une comparaison de la quantification entre les urines diluées et bouillies et les urines extraites n'a pas permis de mettre en évidence de sous-quantification des urines non extraites, ce qui n'explique donc pas une telle différence de facteur de conversion. La stabilité du standard international n'a pas été testée à une température de 100°C, donc on ne peut pas exclure une dégradation du standard lors de l'ébullition, sans que cela n'explique la différence de facteur de conversion entre le sang et les urines après extraction. Il est possible d'évoquer un effet matrice devant de tels résultats, mais l'étude préliminaire n'a pas permis de le mettre en évidence, bien qu'une étude sur différentes matrices et sur plusieurs niveaux de concentration serait plus robuste (Govind et al., 2015).

Une étude récente (Bateman et al., 2017) a évalué le standard international ainsi que d'autres standards commercialisés par PCR quantitative, *droplet digital* PCR – ou ddPCR – et par NGS.

Le standard international serait composé de multiples sous-populations de BKPyV, en lien avec l'instabilité des *Polyomaviridae* en culture. Cette étude a analysé les sous-populations présentes dans le standard WHO par NGS et a montré qu'environ 70% des séquences présentaient une délétion dans la région AgT. Par ailleurs, la comparaison par ddPCR différentielle VP1/AgT a montré que le nombre de gouttelettes VP1 était environ 4 fois plus élevé que le nombre de gouttelettes AgT. Un séquençage n'aurait pas permis d'identifier le mécanisme à l'origine de ces différences de quantification, parce qu'il n'y a pas de mutations dans la séquence des amorces ou de la sonde. Il avait déjà été montré, avec le JCPyV que lors des passages en culture, des délétions survenaient fréquemment, et notamment dans la région codant l'AgT (Grinnell et al., 1983). De même, le standard JCPyV semble contenir un mélange de populations virales dont des séquences délétées dans la région AgT (Greninger et al., 2017). Si notre PCR ne détecte que les séquences des sous-populations qui ont gardé la région AgT, le facteur de conversion calculé risque d'être faussement élevé. Si effectivement l'utilisation du standard international vise à homogénéiser les résultats de qPCR, il est nécessaire de s'assurer qu'il n'y a pas de variation inhérente à la région amplifiée. Dans un premier temps, nous allons quantifier le standard WHO avec une autre PCR maison qui cible la région VP1. Et nous soumettrons les résultats du QCMD BKPyV en copies et en UI/ml afin de valider, ou non, le facteur de conversion calculé.

Pour conclure, la technique de PCR quantitative en temps réel BKPyV a pu être optimisée afin de s'affranchir des variations inter-génotypes précédemment observées. D'un point de vue clinique, certaines viruries faibles (inférieures à 5 log₁₀ cp/mL) n'ont pas été détectées à cause de la sous-quantification du génotype II. Cette modification technique a également permis d'optimiser la prise en charge des patients de génotype II, même si ce génotype semble peu fréquent dans nos populations de transplantés. La technique ainsi modifiée a obtenu l'accréditation selon la norme NF ISO 15189 en portée B au mois de décembre 2017.

En revanche, la mise en place en routine de la quantification à l'aide du standard international de l'OMS nécessite des investigations complémentaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abend, J.R., Jiang, M., and Imperiale, M.J. (2009). BK Virus and Human Cancer: Innocent until Proven Guilty. *Semin. Cancer Biol.* 19, 252–260.
- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M.A.A., Dalianis, T., Ramqvist, T., and Andersson, B. (2007). Identification of a Third Human Polyomavirus. *J. Virol.* 81, 4130–4136.
- Ambalathingal, G.R., Francis, R.S., Smyth, M.J., Smith, C., and Khanna, R. (2017). BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 503–528.
- Association Française de Normalisation (AFNOR) (2012). Norme NF EN ISO 15189: Exigences concernant la qualité et la compétence.
- Astegiano, S., Bergallo, M., Terlizzi, M.E., Sidoti, F., Gambarino, S., Messina, M., Costa, C., Segoloni, G.P., and Cavallo, R. (2011). Combined Measurement of Serum DNA and Urine VP1 Messenger RNA in Monitoring BK Virus Replication in Kidney Graft Recipients. *Transplant. Proc.* 43, 1052–1054.
- Bateman, A.C., Greninger, A.L., Atienza, E.E., Limaye, A.P., Jerome, K.R., and Cook, L. (2017). Quantification of BK Virus Standards by Quantitative Real-Time PCR and Droplet Digital PCR Is Confounded by Multiple Virus Populations in the WHO BKV International Standard. *Clin. Chem.* 63, 761–769.
- Bouvard, V., Baan, R.A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., and Straif, K. (2012). Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol.* 13, 339–340.
- Bressollette-Bodin, C., Coste-Burel, M., Hourmant, M., Seville, V., Andre-Garnier, E., and Imbert-Marcille, B.M. (2005). A Prospective Longitudinal Study of BK Virus Infection in 104 Renal Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.* 5, 1926–1933.
- Broekema, N.M., and Imperiale, M.J. (2013). miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8200–8205.
- Burd, E.M. (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 550–576.
- Burger-Calderon, R., Madden, V., Hallett, R.A., Gingerich, A.D., Nickeleit, V., and Webster-Cyriaque, J. (2014). Replication of Oral BK Virus in Human Salivary Gland Cells. *J. Virol.* 88, 559–573.
- Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M.C.W., Daugherty, M.D., Moens, U., Ramqvist, T., John, R., and Ehlers, B. (2016). A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 161, 1739–1750.
- Chatterjee, M., Weyandt, T.B., and Frisque, R.J. (2000). Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *J. Med. Virol.* 60.

Chen, Y., Sharp, P.M., Fowkes, M., Kocher, O., Joseph, J.T., and Koralnik, I.J. (2004). Analysis of 15 novel full-length BK virus sequences from three individuals: evidence of a high intra-strain genetic diversity. *J. Gen. Virol.* 85, 2651–2663.

Comité Français d'Accréditation (2015a). Guide technique d'accréditation en biologie médicale (SH GTA 01).

Comité Français d'Accréditation (2015b). Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale (SH GTA 04).

Comité qualité de la Société Française de Microbiologie (QUAMIC) (2014). Recommandations.

Dadhania, D., Snopkowski, C., Ding, R., Muthukumar, T., Lee, J., Bang, H., Sharma, V.K., Seshan, S., August, P., Kapur, S., et al. (2010). Validation of Noninvasive Diagnosis of BK Virus Nephropathy and Identification of Prognostic Biomarkers. *Transplantation* 90, 189–197.

Dalianis, T., and Hirsch, H.H. (2013). Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology* 437, 63–72.

Das, D., Shah, R.B., and Imperiale, M.J. (2004). Detection and expression of human BK virus sequences in neoplastic prostate tissues. *Oncogene* 23, 7031–7046.

DeCaprio, J.A., and Garcea, R.L. (2013). A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 264–276.

Doerries, K. (2006). Human Polyomavirus JC and BK Persistent Infection. *Polyomaviruses Hum. Dis.* 102–116.

Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C., Hirsch, H.H., Wali, R., Crowder, C., Nogueira, J., Cangro, C.B., Mendley, S., Mian, A., and Ramos, E. (2004). Histological Patterns of Polyomavirus Nephropathy: Correlation with Graft Outcome and Viral Load. *Am. J. Transplant.* 4, 2082–2092.

Dropulic, L.K., and Jones, R.J. (2008). Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 41, 11–18.

Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., and Moore, P.S. (2008). Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* 319, 1096–1100.

Finney, D.J. (1952). *Probit Analysis*. Camb. Univ. Press.

Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V., and Hulme, B. (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1253–1257.

Gaynor, A.M., Nissen, M.D., Whiley, D.M., Mackay, I.M., Lambert, S.B., Wu, G., Brennan, D.C., Storch, G.A., Sloots, T.P., and Wang, D. (2007). Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections. *PLOS Pathog.* 3, e64.

Gheit, T., Dutta, S., Oliver, J., Robitaille, A., Hampras, S., Combes, J.-D., McKay-Chopin, S., Le Calvez-Kelm, F., Fenske, N., Cherpelis, B., et al. (2017). Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus. *Virology* 506, 45–54.

- Gilis, L., Morisset, S., Billaud, G., Ducastelle-Leprêtre, S., Labussière-Wallet, H., Nicolini, F.-E., Barraco, F., Detrait, M., Thomas, X., Tedone, N., et al. (2014). High burden of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 49, 664–670.
- Gosert, R., Rinaldo, C.H., Funk, G.A., Egli, A., Ramos, E., Drachenberg, C.B., and Hirsch, H.H. (2008). 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.
- Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P., van Strien, A., and van der Noordaa, J. (1982). The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J. Med. Virol.* 10, 91–99.
- Govind, S., Hockley, J., and Morris, C. (2015). Collaborative study to establish the 1st WHO international standard for BKV DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays.
- Greninger, A.L., Bateman, A.C., Atienza, E.E., Wendt, S., Makhsous, N., Jerome, K.R., and Cook, L. (2017). Copy Number Heterogeneity of JC Virus Standards. *J. Clin. Microbiol.* 55, 824–831.
- Grinnell, B.W., Martin, J.D., Padgett, B.L., and Walker, D.L. (1983). Naturally occurring and passage-induced variation in the genome of JC virus. *Prog. Clin. Biol. Res.* 105, 61–77.
- Guasch, A., Roy-chaudhury, P., Woodle, E.S., Fitzsimmons, W., Holman, J., and First, M.R. (2010). Assessment of Efficacy and Safety of Fk778 in Comparison With Standard Care in Renal Transplant Recipients With Untreated Bk Nephropathy. *Transplantation* 90, 891–897.
- Helle, F., Brochot, E., Handala, L., Martin, E., Castelain, S., Francois, C., and Duverlie, G. (2017). Biology of the BKPyV: An Update. *Viruses* 9.
- Hirsch, H.H., Knowles, W., Dickenmann, M., Passweg, J., Klimkait, T., Mihatsch, M.J., and Steiger, J. (2002). Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 347, 488–496.
- Hirsch, H.H., Randhawa, P., and the AST Infectious Diseases Community of Practice (2009). BK Virus in Solid Organ Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.* 9, S136–S146.
- Hirsch, H.H., Randhawa, P., and the AST Infectious Diseases Community of Practice (2013). BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 179–188.
- Hoffman, N.G., Cook, L., Atienza, E.E., Limaye, A.P., and Jerome, K.R. (2008). Marked Variability of BK Virus Load Measurement Using Quantitative Real-Time PCR among Commonly Used Assays. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2671–2680.
- Hurdiss, D.L., Morgan, E.L., Thompson, R.F., Prescott, E.L., Panou, M.M., Macdonald, A., and Ranson, N.A. (2016). New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure* 24, 528–536.
- Jeffers, L., and Webster-Cyriaque, J.Y. (2011). Viruses and Salivary Gland Disease (SGD). *Adv. Dent. Res.* 23, 79–83.

Jiang, M., Abend, J.R., Tsai, B., and Imperiale, M.J. (2009). Early Events during BK Virus Entry and Disassembly. *J. Virol.* 83, 1350–1358.

Jin, L., Gibson, P.E., Booth, J.C., and Clewley, J.P. (1993). Genomic typing of BK virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *J. Med. Virol.* 41, 11–17.

Journal officiel de la République française (2008). Décret n° 2008-1401 du 19 décembre 2008 relatif à l'accréditation et à l'évaluation de conformité pris en application de l'article 137 de la loi n° 2008-776 du 4 août 2008 de modernisation de l'économie.

Journal officiel de la République française (2010). Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.

Kenan, D.J., Mieczkowski, P.A., Latulippe, E., Côté, I., Singh, H.K., and Nickeleit, V. (2017). BK Polyomavirus Genomic Integration and Large T Antigen Expression: Evolving Paradigms in Human Oncogenesis. *Am. J. Transplant.* 17, 1674–1680.

Knowles, W.A. (2006). Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv. Exp. Med. Biol.* 577, 19–45.

Koh, M.J., Lim, B.J., Noh, S., Kim, Y.H., and Jeong, H.J. (2012). Urinary decoy cell grading and its clinical implications. *Korean J. Pathol.* 46, 233–236.

Korup, S., Rietscher, J., Calvignac-Spencer, S., Trusch, F., Hofmann, J., Moens, U., Sauer, I., Voigt, S., Schmuck, R., and Ehlers, B. (2013). Identification of a Novel Human Polyomavirus in Organs of the Gastrointestinal Tract. *PLOS ONE* 8, e58021.

Krumbholz, A., Bininda-Emonds, O.R.P., Wutzler, P., and Zell, R. (2008). Evolution of four BK virus subtypes. *Infect. Genet. Evol.* 8, 632–643.

Lim, E.S., Reyes, A., Antonio, M., Saha, D., Ikumapayi, U.N., Adeyemi, M., Stine, O.C., Skelton, R., Brennan, D.C., Mkakosya, R.S., et al. (2013). Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology* 436, 295–303.

Low, J.A., Magnuson, B., Tsai, B., and Imperiale, M.J. (2006). Identification of Gangliosides GD1b and GT1b as Receptors for BK Virus. *J. Virol.* 80, 1361–1366.

Luo, C., Bueno, M., Kant, J., and Randhawa, P. (2008). Biologic diversity of polyomavirus BK genomic sequences: Implications for molecular diagnostic laboratories. *J. Med. Virol.* 80, 1850–1857.

Luo, C., Bueno, M., Kant, J., Martinson, J., and Randhawa, P. (2009). Genotyping Schemes for Polyomavirus BK, Using Gene-Specific Phylogenetic Trees and Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *J. Virol.* 83, 2285–2297.

Mackay, I.M., Arden, K.E., and Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30, 1292–1305.

Marty, F.M., Winston, D.J., Rowley, S.D., Vance, E., Papanicolaou, G.A., Mullane, K.M., Brundage, T.M., Robertson, A.T., Godkin, S., Momméja-Marin, H., et al. (2013). CMX001 to

Prevent Cytomegalovirus Disease in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 369, 1227–1236.

Mazalrey, S., Ilroy, D.M., and Bressollette-Bodin, C. (2015). Le polyomavirus BK. Interactions virus-cellule, réponse immunitaire antivirale, pathogenèse virale. *Virologie* 19, 207–224.

Meijden, E. van der, Janssens, R.W.A., Lauber, C., Bavinck, J.N.B., Gorbalenya, A.E., and Feltkamp, M.C.W. (2010). Discovery of a New Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa in an Immunocompromized Patient. *PLoS Pathog.* 6.

Mishra, N., Pereira, M., Rhodes, R.H., An, P., Pipas, J.M., Jain, K., Kapoor, A., Briese, T., Faust, P.L., and Lipkin, W.I. (2014). Identification of a Novel Polyomavirus in a Pancreatic Transplant Recipient With Retinal Blindness and Vasculitic Myopathy. *J. Infect. Dis.* 210, 1595–1599.

Moriyama, T., Marquez, J.P., Wakatsuki, T., and Sorokin, A. (2007). Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *J. Virol.* 81, 8552–8562.

Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E., and Kasamatsu, H. (2002). Interaction of the Vp3 Nuclear Localization Signal with the Importin $\alpha 2/\beta$ Heterodimer Directs Nuclear Entry of Infecting Simian Virus 40. *J. Virol.* 76, 9368–9377.

Nakanishi, A., Itoh, N., Li, P.P., Handa, H., Liddington, R.C., and Kasamatsu, H. (2007). Minor Capsid Proteins of Simian Virus 40 Are Dispensable for Nucleocapsid Assembly and Cell Entry but Are Required for Nuclear Entry of the Viral Genome. *J. Virol.* 81, 3778–3785.

Olsen, G.-H., Hirsch, H.H., and Rinaldo, C.H. (2009). Functional analysis of polyomavirus BK non-coding control region quasispecies from kidney transplant recipients. *J. Med. Virol.* 81, 1959–1967.

Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J., and Dessel, B.H. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1257–1260.

Papadopoulou, A., Gerdemann, U., Katari, U.L., Tzannou, I., Liu, H., Martinez, C., Leung, K., Carrum, G., Gee, A.P., Vera, J.F., et al. (2014). Activity of broad-spectrum T-cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV and HHV6 infections after HSCT. *Sci. Transl. Med.* 6, 242ra83.

Randhawa, P., Kant, J., Shapiro, R., Tan, H., Basu, A., and Luo, C. (2011). Impact of Genomic Sequence Variability on Quantitative PCR Assays for Diagnosis of Polyomavirus BK Infection. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4072–4076.

Rani, A., Ranjan, R., McGee, H.S., Metwally, A., Hajjiri, Z., Brennan, D.C., Finn, P.W., and Perkins, D.L. (2016). A diverse virome in kidney transplant patients contains multiple viral subtypes with distinct polymorphisms. *Sci. Rep.* 6, 33327.

van Regenmortel, M.H., Mayo, M.A., Fauquet, C.M., and Maniloff, J. (2000). Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch. Virol.* 145, 2227–2232.

Rogers, R., Gohh, R., and Noska, A. (2017). Urothelial cell carcinoma after BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients: A cohort study of veterans. *Transpl. Infect. Dis.* 19.

- Rubinstein, R., Schoonakker, B.C., and Harley, E.H. (1991). Recurring theme of changes in the transcriptional control region of BK virus during adaptation to cell culture. *J. Virol.* 65, 1600–1604.
- Saunders, N., Zambon, M., Sharp, I., Siddiqui, R., Bermingham, A., Ellis, J., Vipond, B., Sails, A., Moran-Gilad, J., Marsh, P., et al. (2013). Guidance on the development and validation of diagnostic tests that depend on nucleic acid amplification and detection. *J. Clin. Virol.* 56, 344–354.
- Schowalter, R.M., Pastrana, D.V., Pumphrey, K.A., Moyer, A.L., and Buck, C.B. (2010). Merkel Cell Polyomavirus and Two Previously Unknown Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin. *Cell Host Microbe* 7, 509–515.
- Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kühn, J., Hengel, H., and Ehlers, B. (2011). A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus. *J. Virol.* 85, 4586–4590.
- Sharma, B.N., Li, R., Bernhoff, E., Gutteberg, T.J., and Rinaldo, C.H. (2011). Fluoroquinolones inhibit human polyomavirus BK (BKV) replication in primary human kidney cells. *Antiviral Res.* 92, 115–123.
- Siebrasse, E.A., Reyes, A., Lim, E.S., Zhao, G., Mkakosya, R.S., Manary, M.J., Gordon, J.I., and Wang, D. (2012). Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool. *J. Virol.* 86, 10321–10326.
- Singh, H.K., Reisner, H., Derebail, V.K., Kozłowski, T., and Nickenleit, V. (2015). Polyomavirus Nephropathy: Quantitative Urinary Polyomavirus-Haufen Testing Accurately Predicts the Degree of Intrarenal Viral Disease. *Transplantation* 99, 609–615.
- Smith, R.D., Galla, J.H., Skahan, K., Anderson, P., Linnemann, C.C., Ault, G.S., Ryschkewitsch, C.F., and Stoner, G.L. (1998). Tubulointerstitial Nephritis Due to a Mutant Polyomavirus BK Virus Strain, BKV(Cin), Causing End-Stage Renal Disease. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1660–1665.
- Solis, M., Velay, A., Porcher, R., Domingo-Calap, P., Soulier, E., Joly, M., Meddeb, M., Kack-Kack, W., Moulin, B., Bahram, S., et al. (2018). Neutralizing Antibody-Mediated Response and Risk of BK Virus-Associated Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 29, 326–334.
- Sontag, E., Fedorov, S., Kamibayashi, C., Robbins, D., Cobb, M., and Mumby, M. (1993). The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 75, 887–897.
- Sueur, C., Solis, M., Meddeb, M., Soulier, E., Domingo-Calap, P., Lepiller, Q., Freitag, R., Bahram, S., Caillard, S., Barth, H., et al. (2014). Toward Standardization of BK Virus Monitoring: Evaluation of the BK Virus R-gene Kit for Quantification of BK Viral Load in Urine, Whole-Blood, and Plasma Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 52, 4298–4304.
- Tognon, M., Corallini, A., Martini, F., Negrini, M., and Barbanti-Brodano, G. (2003). Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene* 22, 5192–5200.

Tonnerre, P., Gérard, N., Gavlovsky, P.-J., Mazalrey, S., Hourmant, M., Cheneau, M.-L., Cesbron-Gautier, A., Renaudin, K., Bressollette-Bodin, C., and Charreau, B. (2016). MICA Mutant A5.1 Influences BK Polyomavirus Reactivation and Associated Nephropathy After Kidney Transplantation. *J. Infect. Dis.* 214, 807–816.

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

Vago, L., Cinque, P., Sala, E., Nebuloni, M., Caldarelli, R., Racca, S., Ferrante, P., Trabottoni, G., and Costanzi, G. (1996). JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of AIDS patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* 12, 139–146.

White, M.K., Safak, M., and Khalili, K. (2009). Regulation of Gene Expression in Primate Polyomaviruses. *J. Virol.* 83, 10846–10856.

Wunderink, H.F., van der Meijden, E., van der Blij-de Brouwer, C.S., Zaaijer, H.L., Kroes, A.C.M., van Zwet, E.W., Rotmans, J.I., and Feltkamp, M.C.W. (2017). Stability of BK polyomavirus IgG seroreactivity and its correlation with preceding viremia. *J. Clin. Virol.* 90, 46–51.

Zheng, H.-Y., Nishimoto, Y., Chen, Q., Hasegawa, M., Zhong, S., Ikegaya, H., Ohno, N., Sugimoto, C., Takasaka, T., Kitamura, T., et al. (2007). Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect.* 9, 204–213.

Zhong, S., Randhawa, P.S., Ikegaya, H., Chen, Q., Zheng, H.-Y., Suzuki, M., Takeuchi, T., Shibuya, A., Kitamura, T., and Yogo, Y. (2009). Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. *J. Gen. Virol.* 90, 144–152.

ANNEXES

ANNEXE 1 – ALIGNEMENT DES SEQUENCES DES AMORCES ET DE LA SONDE SUR LES SEQUENCES GENBANK DES DIFFERENTS GENOTYPES DE BKPyV.

Légende : Position de l'amorce BKRG1
Position de l'amorce BKRG2
Position de la sonde BKSRG
Séquence codant pour VP1
Séquence codant pour l'AgT
Mismatches observés

Génotype Accession GenBank	Séquence nucléotidique de la souche de BKPyV						
Génotype Ia N°AB263926	1	gcctcggcct	cttatatatt	ataaaaaaaaa	aggccacagg	gaggagctgc	ttacccatgg
	61	aatgcagcca	aaccatgacc	tcaggaagga	aagtgcata	ctgggcaggc	agccagtggc
	121	agttaatagt	gaaaccccg	ccctaaaatt	ctcaataaaa	cacaagagga	agtggaact
	181	ggccaaagga	gtggaagca	gccagacaga	catgttttgc	gagcctagga	atcttggcct
	241	tgtcccccagt	taaactggac	aaaggccatg	gttctgcgcc	agctgtcacg	acaagcttct
	301	gtgaaagtgt	gtaaaacctg	gactggaaca	aaaaaaagag	ctcagaggat	ttttatTTTT
	361	atttttagagc	ttttgctgga	attttgtaga	ggtgaagaca	gtgtagacgg	gaaaaacaaa
	421	agtaccactg	ctttacctgc	tgtaaaagac	tctgtaaaag	actcctaggt	aagtaatccc
	481	ttttttttt	tatttccagg	ttcatgggtg	ctgctctagc	acttttgggg	gacctagtgt
	541	ccagtgtatc	tgaggctgct	gctgccacag	gattttcagt	ggctgaaatt	gctgctgggg
	601	aggctgctgc	tgctatagaa	gttcaaattg	catcccttgc	tactgtagag	ggcataacaa
	661	gtacctcaga	ggctatagct	gctataggcc	taactcctca	aacatatgct	gtaattgctg
	721	gtgctcctgg	ggctattgct	gggtttgctg	ctttaattca	aactgttagt	ggtattagtt
	781	ccttggtcga	agtagggtat	aggttcttta	gtgattggga	tcacaaagtt	tccactgtag
	841	gcctctatca	gcaatcaggc	atggcttttg	aattgtttta	ccagatgag	tactatgata
	901	ttctgtttcc	tggtgtaaat	acttttggtt	ataatattca	ataccttgat	cctaggcatt
	961	ggggctccttc	tttgtttgct	actatttccc	aggctttgtg	gcattgttatt	agggatgata
	1021	taccttctat	aacctcacag	gaattgcaga	gaagaacaga	aagatttttt	agagactcct
	1081	tggctagatt	tttgagga	actacctgga	ccattgttaa	tgccctata	aacttttata
	1141	attatattca	acaatattat	tctgatttgt	cccctattag	gcctcaatg	gttagacaag
	1201	tagctgaaag	ggaaggtacc	cgtgtacatt	ttggccatag	ttatagtata	gatgatgctg
	1261	acagtataga	agaagttaca	caaagaatgg	atttaagaaa	tcaacaaagt	gtacattcag
	1321	gagagtattat	agaaaaaact	attgccccag	gaggtgctaa	tcaagaact	gtcctcaact
	1381	ggatgttgcc	tttacttcta	ggcctgtacg	ggactgtaac	acctgctctt	gaagcatatg
	1441	aagatggccc	caaccaaaag	aaaaggagag	tgtccagggg	cagctcccaa	aaagccaaag
	1501	gaaccctgtc	aagtgcacaa	actactaata	aaaggaggag	tagaagtctt	agaagttaaa
	1561	actggggtga	atgctattac	agaggtagaa	tgcttcctaa	accagaaat	gggggatcca
	1621	gatgaaaacc	ttaggggcct	tagtctaaag	ctaagtgtct	aaaatgactt	tagcagtgat
	1681	agcccagaga	gaaaaatgct	tccctgtttac	agcacagcaa	gaattccctt	gcccatttta
	1741	aatgaggacc	taacctgtgg	aaatctactg	atgtggggag	ctgtaactgt	acaaacagag
	1801	gttattggaa	taactagcat	gcttaacctt	catgcagggt	cacaaaaagt	gcattagcat
	1861	ggtggaggaa	aacctattca	aggcagtaat	ttccactttt	ttgctgttgg	tggagacccc
	1921	ttggaaatgc	agggagtgtc	aatgaattac	aggacaaagt	accagatggg	tactataacc
	1981	cctaaaaacc	caacagccca	gtcccaggta	atgaatactg	accataaggg	ctatattgac
	2041	aaaaacaatt	cttatccagt	tgagtgtctg	gttctgtatc	ccagtagaaa	tgaaaatagt
	2101	aggtattttg	ggactttcac	aggaggggaa	aatgttcccc	cagtacttca	tgtgaccaac
	2161	acagctacca	cagtgttgct	agatgaacag	ggtgtggggc	ccctttgtaa	agctgatagc
	2221	ctgtatgttt	cagctgtgta	tatttgtggc	ctgtttacta	acagctctgg	aacacacacg
	2281	tggagaggcc	ttgcaagata	ttttaagatc	cgccctgaga	aaagatctgt	aaagaatcct
	2341	taccacaatt	cctttttgct	aagtgcacct	ataaacagga	gaaccagag	agtggatggg
	2401	cagcctatgt	atggtatgga	atcccaggta	gaggagggtt	gggtgtttga	tggcacagaa
	2461	agacttccag	gggacccaga	tatgataaga	tataattgaca	aaacagggca	attgcaaac
	2521	aaaatgcttt	aaacaggtgc	ttttattgta	catatacatt	taataaagt	tgcttttcta
	2581	taagccactt	tttaagctgt	gttatttttg	gggtgggtgt	ttaggctctt	taaaacactg
	2641	aaagccttta	cacaaatgta	actcttgact	atgggggtct	gacctttggg	aatcttcagc
	2701	aggggctgaa	gtatctgaga	cttggaagaa	gcattgtgat	tgggattcag	tgtctgatcc
	2761	atgtccagag	tcttcagttt	ctgaatcctc	ttctcttctg	atatcaagaa	tacatttccc
	2821	catgcatata	ttatatctta	tccttgaaaa	agtatacata	cttatctcag	aatccagcct
	2881	ttccttccat	tgaacaattc	tagattgtat	atctgttgca	aaatcagcta	caggcctaaa
	2941	ccaaattagc	agtagcaaca	aggtoattcc	actttgtaga	attctttttt	caagtaaaaa
	3001	ctctgagttt	tgttaaggatt	ttcttaata	tattttgggc	ctaaaatcta	tttgtcttac
	3061	aaatctagct	tgcaagggtt	tagggacagg	atactcatto	attgttaacca	agcctggtgg
	3121	aaatatgttg	gttcttttgt	ttaaatgttt	cttttctaaa	tttactttta	cacttccatc

	3181 taaataatct ctcaaactgt ctaaattggt tattocatgt cctgaaggca aatcctttga 3241 ttcagccccc gtccctttta catcttcaaa aacaaccatg tactgatcta tagctacacc 3301 tagctcaaaag gtttagccttt ccatgggtag gtttacattt cctccacaaa 3361 atctaataac cctgcagcta gtgtgtgttt tccactatca atgggacott taaataacca 3421 gtatcttctt ttaggtacat tgaaaacaat acagtgcata aatcaataa taacagaatc 3481 catttttaggt agcaaacagt gcagccaagc aacacctgcc atatatgtt ctagtacagc 3541 atttccatga gctccaaata ttaaattccat ttatctaat atatgattga atctttctgt 3601 tagcatttct tccctgggtc tatgaagggt atctactctt ttcttagcta aaactgtatc 3661 tactgcttgc tgacaaatac ttttttgatt tttactttct gcaaagataa tagcatttgc 3721 aaagtgcctt tcatgatact taaagtgata aggttggctt tttttctgac actttttaca 3781 ctccctctaca ttgtattgaa attctaaata catacctaat aataaaaaac catctcaca 3841 ctttgtctct actgcatact cagtaattaa tttccaagac acctgctttg tttcttcagg 3901 ctcttctggg ttaaaatcat gctcctttta gcccccttga atgctttctt ctatagtagt 3961 gtatggctct ctagttaagg cactatatag taagtattcc ttattaacac ccttacaat 4021 taaaaaatac aggttacaca gcttttgaca gaagttatta atgtgcagaa ctctatgtct 4081 atgtggagtt aaaaagaata taatattatg ccagcacac atgtgtctac taataaaagt 4141 tacagaatat ttttccataa gttttttata cagaatttga gctttttctt tagtagtata 4201 cacagcaaaag caggcaaggg ttctattact aaatacagct tgactaagaa actgggttag 4261 atcacaggga agtcttttag ggtctttctac ctttctttt ttctgggtg gtgttagtg 4321 ttgagaatct gctgttgcct cttcatcact ggcaaacata tcttcatggt aaaaataagtc 4381 ttcaccccat ttttcattaa aggaactcca ccaggactcc cactcttctg ttccataggt 4441 tggcacctat aaaaaaata attacttagg gctttttaat attttattat ttatctaaat 4501 ataagttagt taccttaagg ctttagatct ctgaaggag tttctccaa tttttgacc 4561 caccattgca gagtttcttc agttaggtct aagccaaacc actgtgtgaa gcagtcaatg 4621 cagtagcaat ctatccaaac caagggtctt tttcttaaaa attttctatt taaatgcctt 4681 aatctaagct gacatagcat gcaagggcag tgcacagaag gcttttttga acaaataggt 4741 ctttcttgc agtaagggt atctgggcaa agaggaaaat cagcacaac ccttagctga 4801 ctccagggtc caaaatcagg ctatgagct acctttacat ctgctccat ttttttat 4861 aaagtattca ttctcttcat tttatctctg tgcctccctt tgcagggtg aaattcctta 4921 cacttcttta aataagcttt tctcatthaag ggaagatttc ccaggcagc tctttcaagg 4981 cctaaaaggt ccatgagctc catggtattc tccctgttaa gcactttatc catttttgca 5041 aaaaattgca aaagaatagg gatttcccca aatagttttg taggcctca gaaaaagcct 5101 ccacaccctt actacttgag agaaagggtg gaggcagagg cg
Génotype Ib1 N° AB211369 4691-4711 4755-4775 4713-4742	1 gcctcggcct cttatatatt ataaaaaaa aggccacagg gaggagctgc taacccatgg 61 aatgtagcca aaccatgacc tcaggaagga aagtgcata ctgggcagcc agccagtggc 121 agttaatagt gaaaccccg cctaaaaatt ctcaataaaa cacaagagga agtggaact 181 ggccaaagga gtggaagca gccagacaga catgttttgc gagcctagga atcttggcct 241 tgtcccagct taaactggac aaaggccatg gttctgcgcc agctgtcagc acaagcttot 301 gtgaaagtga gtaaaacctg gactggaaca aaaaaaggg ctcagagga tttttttt 361 atttttagagc ttttgcctga atttgtaga ggtgaagaca gtgtagacgg gaaaaacaaa 421 agtaccactg ctttacctgc tgtaaaagac tctgtaaaag actcctaggt aagtaatccc 481 tttttttttg tttttccagg ttgatgggtg ctgctctagc acttttgggg gacctagtgt 541 ccagtgtatc tgaggctgct gctgccacag gattttcagt ggctgaaatt gctgctgggg 601 aggcgtgctg tctatagaaa ttccaattg catccttgc tactgtagag gcataacaa 661 gtacctcaga ggctatagct gctataggcc taactcctca aacatatgct gtaattgctg 721 gtgctcctgg ggctattgct gggtttgctg ctttaattca aactgttact ggtattagtt 781 ccttggctca agtagggtat aggtttttta gtgattggga tcacaaagtt tccactgtag 841 gcctctatca gcaatcagcg attgctttgg aattgtttta ccagatgag tactatgata 901 ttttgtttcc tgggtgaaat acttttgtta ataatttca atacctgat cctaggcatt 961 ggggtccttc cttgtttgct actatttccc aggcctttgt gcatgttatt agggatgata 1021 tacctgctat aacctcaca gaattgcaaa gaagaacaga aagatttttt agagactcct 1081 tggctagatt tttggaggaa actacctgga caattgtaaa tgcctcataa aacttttata 1141 attatattca agaattatt tctgatcttt cccctattag gcctcaatg gttagacaag 1201 tggctgaaag ggaaggtacc cgtgtacatt ttggccatac ttatagata gatgatgctg 1261 acagtataga agaagttaca caaagaatgg acttaagaaa tcaacaaact gtacattcag 1321 gagagtttat agaaaaaact attgccccag gaggtgctaa tcaagaact gcctcctaat 1381 ggatgttgcc tttacttcta ggctgtacg ggactgtaac acctgctctt gaagcatatg 1441 aagatggccc caaccaaaag aaaaggagag tgtccagggg cagctcccaa aaagccaaag 1501 gaaccogtgc aagtgcacaa actactaata aaaggaggag tagaagttct agaagttaa 1561 actggggtag atgctataac agaggtagaa tgccttctaa accagaaat ggggatcca 1621 gatgaaaacc ttaggggctt tagtctaaag ctaagtgtg aaaaatgact tagcagtgat 1681 agcccagaaa gaaaaatgct tccctgttac agcacagcaa gaattccctt cccaatttta 1741 aatgaggacc taacctgtgg aaatctactg atgtgggagg ctgtaactgt acaaacagag 1801 gtcattggaa taactagcat gcttaacctt catgcagggt cacaaaaagt gcatgacat 1861 ggtggaggta aacctattca aggcagtaat ttccactctt ttgctgttgg ttggagcccc 1921 ttggaatgac agggagtgtc aatgaattac aggaaccaag accagatgg tactataacc 1981 ccaaaaaacc caacagccca gtcccaggta atgaatactg accataaggg ctatttggac 2041 aaaaaacata cttatocagg ttagtgctgg gttcctgat ctagtagaaa tgaaaatac 2101 aggtattttg ggactttcac aggggggaa aatgttcccc cagtacttca tgtgaccaac 2161 acagctacca cagtgttgc agatgaacag ggtgtggggc ctctttgtaa agctgatagc 2221 ctgtatgttt cagctgtgta tatttgtggc ctgtttacta acagctctgg aacacaacag 2281 tggagaggcc ttgcaagata ttttaagatt cgctgagaa aaaaatcctt aaaaatcct 2341 tacccaatct cctttttgct aagtgcactt ataacaggga gaaccagag agtggatggg 2401 cagcctatgt atggtatgga atcccaggta gaagggtta ggggttttga ttggcacagaa 2461 agacttccag gggacccaga tatgataaga tatattgata acaaggaca attgcaaac 2521 aaaatgctgt aaacaggtgc ttttattgta catatacatt taataaagtc tgcctttgta 2581 taagccactt ttaagcttgt gtatttttgg ggggtgtgtt ttaggccttt taaaacattg

	2641 aaagccttta cacaaatgca actcttgact atgggggtct aaccttttggg aatottcagc 2701 aggggctgaa gtatctgaga cttgggaaga gcatttgtat tgggattcag tgcttgatcc 2761 atgtccagag tcttcagttt ctgaatcttc ttctotttgg atactcaagaa tacattttccc 2821 catgcatata ttatatattca tccctgaaaa agtatacata cttatctcag aatccagcct 2881 ttccctccat tcaacaattc tagattgtat atctgttgca aaatcagcta caggccataaa 2941 ccaaattagc agtagcaaca aggtcattcc actttgtaaa attctttttt caagtaaaaa 3001 ctctgagttt tgtaaggatt ttcttaataa tattttgggt ctataatcta cctgtcttac 3061 aaatctagcc tgcagggttt taggaacagg ataactcattc attgtaacca ggctgtgtgg 3121 aaatatttgg gttcttttgt ttaaatgttt cttttctaaa ttaaccttaa cacttccatc 3181 taaataatct ctcaaaactgt ctaaattgtt tattccatgt cctgaaggca aatcctttga 3241 ttcagccctt gttcctttta catcttcaaa aacaacctg tactgatcta tagctacacc 3301 tagttcaaag gttagccttt ccatgggtag gtttacattt aaggctttac cttccacaaa 3361 atctaataac cctgcagcta gtgtgtgttt tccactatca atgggacctt taaataacca 3421 gtatcttctt tttaggtacat taaaaacaat acagtgcata aaatcaataa taacagaatc 3481 cattttaggt agcaaacagt gcagccaagg aacacctgcc ataatgttt ctagtcagc 3541 atttccatga gctccaaaata ttaaatccat tttatctaata atagtattaa atctttctgt 3601 tagcatttct tctctgttca tatgaagggt atctactctt tttttagcta aaactgtatc 3661 tactgttgc tgacaaaatac ttttttgatt tttactttct gcaaaaatag tagcatttgc 3721 aaaatgcttt tcatgatac taaagtata aggttggtct attttctgac actttttaca 3781 ctcttctaca ttgtattgaa attctaaata catacccaat aataaaaaaca catcctcaca 3841 ctttgtctct actgcatact cagtaattaa tttccaagac acctgctttg tttcttcagg 3901 ctcttctggg ttaaaatcat gctcctttaa gcccccttga atgctttctt ctattgtatg 3961 gtatggatct ctagttaagg cactatatag taagtattcc ttattaacac ccttacaat 4021 taaaaaacta aaggtagaca gcttttgaca gaaattatta attgcagaaa ctctatgtct 4081 atgtggagtt aaaaagaata taatattatg cccagcacac atgtgtctac taataaaagt 4141 tacagaatat ttttccataa gttttttata cagaatttga gctttttctt tagtagtata 4201 cacagcaaa caggcaaggg ttctattact aaatacagct tgactaagaa actgggttag 4261 atcagaagga aagtcttttag ggtcttctac cttctctctt tctgtgggtg ctgtggagtg 4321 ttgagaatct gctgttgctt cttcatcact ggcaaacata tcttcatggc aaaataaatc 4381 ttcatcccat ttttcattaa aggagctcca ccaggactcc cactctcttg ttccataggt 4441 tggcacctat aaaaaaata attacttagg gcctttaaat attttcttat ttatctaata 4501 ataagttagt taccttaaaag ctttagatct ctgaaggag ttctccaat tatttgacc 4561 caccattgca gagtttcttc agttaggtct aagccaaacc actgtgtgaa gcagtcaatg 4621 cagttagcaat ctatccaaac caagggtctt tttcttaaaa attttctatt taatgcctt 4681 aatctaagct gacatagcat gcaagggcag tgcacagaag gcttttttga acaaataggg 4741 caatccttgc agtaagggtt atctggggcaa agaggaaaat cagcacaaac ccttagagta 4801 ctccaggttc caaaatcagg ctgatgagct acctttacat cctgtctccat ttttttatat 4861 aaagtattca ttctcttcat tttatcctcg tgcacctctt tgcagggtg aaattcctta 4921 cacttcetta aataggtttt tctcattaag ggaaggttcc cccaggcagc tctttcaagg 4981 cctaaaaggt ccatgagctc catggattct tccctgttaa gcactttatc catttttgca 5041 aaaattgcaa aagaataggg atttcccaa atatttttgc taggcctcag aaaaagcctc 5101 cacaccctta ctacttgaga gaaagggtgg aggcagaggg g
Génotype Ib2 N°AB263918 4691-4711 4755-4775 4713-4742	1 gcctcggcct cttatatatt ataaaaaaa aggccacagg gaggagctgc ttaccatagg 61 aatgcagcca aacctgacc tcagggaagg aagtgcata gctggcagcc agccagtggc 121 agttaatagt gaaaccccg cctgaaatt ctcaaataaa cacaagagga agtggaact 181 ggccaaagga gtggaagca gccagacaga catgttttgc gggcctagga atcttgccct 241 tgtcccccag taaactggac aaaggccatg gttctgcgcc agctgtcacg acaagcttct 301 gtgaaacttg gtaaaacctg gactggaaaca aaaaaaagag ctcagaggat ttttattttt 361 attttagagc ttttcttgga attttgtaga ggtgaagaca gtgtagacgg gaaaaacaaa 421 agtaccactg ctttaacctgc tgtaaaagac tctgtaaaag actcctaggt aagtaatccc 481 tttttttttg tatttccagg ttgatgggtg ctgctctagc acttttgggg gacctagtgt 541 ccagtgtatc tgagctgctt gctgccacag gattttcagt gctgctgggg gctgctgggg 601 aggctgctgc tgctatagaa gttcaaattg catcccttgc tactgtagag ggcataacaa 661 gtacctcaga ggctatagct gctataggcc taactcctca aacatagtct gtaattgctg 721 gtgctcctgg ggctattgtt gggtttgctg ctttaattca aactgttact ggtattagtt 781 ccttggtcca agtagggat aggtttttta gtgattgga tcacaaagtt tccactgtag 841 gcctctatca gcaatcaggc atggcttttg aattgtttaa cccagatgag tactatgata 901 tattgtttcc tgggttaaat acttttgtaa ataattttca ataccttgat cctagccatt 961 ggggtccttc tttgtttgct actatttctc aggtttgtg gcatgttatt agggatgata 1021 tacctgctat aacctcacaa gaattgcata gaagaacaga aagatttttt agagactcct 1081 tggctagatt tttggaggaa actacctgga caattgtaaa tgcacctata aacttttata 1141 attatattca agaattattt tctgatcttt cccctattag gcctcaatg gttagacaag 1201 tagctgaaag ggaaggatcc cgtgtacatt ttggccatac ttatagtata gatgatgctg 1261 acagtataga agaagttaca caaagaatgg acttaagaaa tcacaaaact gtacattcag 1321 gagagtttat agaaaaaact attgccccag gaggtgctaa tcaaaagaact gtcctcaat 1381 ggatgttgcc tttacttcta ggctgtacg ggactgtaac acctgctctt gaagcatatg 1441 aagatggccc caacaaaaag aaaaggagag tgtccagggg cagctcccaa aaagccaaag 1501 gaacccgtgc aagtgccaaa actactaata aaaggaggag tagaagttct agaagttaaa 1561 actgggctag atgctataac agaggtagaa tgccttctaa acccagaaat ggggatccca 1621 gatgaaaacc ttaggggctt tagtctaaag ctaagtgtctg aaaatgactt tagcagtgat 1681 agcccagaca gaaaaatgct tccctgttac agcacagcaa gaattccctt ccccaattta 1741 aatgaggacc taacctgtgg aaatctactg atgtggaggg ctgtaaacag acaaacagag 1801 gtcattggaa taactagcat gcttaacctt catgcagggt cacaaaaagt gcatgagcat 1861 ggtggaggta aacctattca aggcagtaat ttccactttt ttgctgttgg ttgagacccc 1921 ttggaattgc agggagtgtt aatgaattac aggaacaaag acccagaagg tactataacc 1981 ccaaaaaacg caacagccca gtcccaagta atgaatactg accataaggc ctattttggc 2041 aaaaacaatg cttatccagt tgagtgtctg attcctgac ccagtagaaa tgaataatct

	2101 aggtatTTTT ggactttcac aggaggggaa aatgttcccc cagtacttca tgtgaccaac 2161 acagctacca cagtgttgct agatgaacag ggtgtggggc ctctttgtaa agctgatagc 2221 ctgtatgttt cagctgtggc tatttgtggc ctgtttacta acacacaacag 2281 tggagaggcc ttgcaagata ttttaagatt cgctgagaa aaagatctgt aaaaaatcct 2341 taccgaattt cctttttgct aagtgcactt ataacacagga gaaccacagag agtggtatggg 2401 cagcctatgt atggatatga atcccaggta gaagaggtta ggggtgttga tggcacagaa 2461 agacttccag gggaccacaga tatgataaga tatattgaca aacaaggaca attgcaaacc 2521 aaaaatgcttt aaacagggtgc ttttattgtt gatatacatt taataaatgc tgccttttga 2581 gaagccagtt ttaagcctgt gttatTTTT gggtgggtgtt ttaggccttt taaaacactg 2641 aaagccttta cacaatgca actcctgact atgggggtct gacctttggg aatcctcagc 2701 aggggctgaa gtatctgaga cttgggaaga gcattgtgat tgggattcag tgcttgatcc 2761 atgtccagag tcttcagttt ctgaaatctt ttctcttgta atatcaagaa tacattttcc 2821 catgcatata ttatatTTTca tccctgaaaa agtatacata ctatctcag aatccagcct 2881 ttccctccat tcaacaattc tagattgtat atctgttgca aaatcagcta caggcctaaa 2941 ccaaatgagc gttagcaaca aggtcattcc actttgtaga attccttttt caagtaagaa 3001 ctctgagttt tgtaaggatt ttcttaata tttttgggc ctaaaatcta tctgtcttac 3061 aaatctagcc tgcagggttt tagggacagg atactcattc attgtaacca ggctgtgtgg 3121 aaatatTTTg gttcttttgt ttaaattgtt cttttctaaa ttaaccttaa cacttccatc 3181 taaataatct ctcaactgt tcaaatTTTt tattocatgt actgaagca aatccttga 3241 ttcagctcct gttcctTTTt catcttcaaa aacaacctg tactgatcta tagctacacc 3301 tagttcaaa gtttagcctt ccatgggtag gtttacattt aaagctttac ctccacacaa 3361 atctaataac cctgcagcta gtgtgtttt tccactatca atgggacctt taaaatacca 3421 gtatcttctt ttaggtagat taaaaacaat acagtgcaaa aaatcaata taacagaatc 3481 catttttagt agcaaacagt gcagccaagc aacacctgcc atatatTTt ctaatacagc 3541 atttccatga gcccacaata ttaaatccat tttatctaata atatgattaa atctttctgt 3601 tagcatttct tctctagtca tatgaaggct atctactctt tttttagcta aaactgtatc 3661 tactgcttgc tgacaaatac ttttttgatt tttactttct gcaaagatag tagcatttgc 3721 aaaatgcttt tcatgatact taaagtgata aggttggctt ttttctgac actttttaca 3781 ctctcttaca ttgtattgaa attctaaata catacctaata aataaaaaa catctcaca 3841 ctttgtttct actgcatact cagtaattaa tttccaagag acctgctttg tttcttcagg 3901 ctctcttggg ttaaaatcat gctcctttaa gcccttga atgctttctt ctattgtatg 3961 gtatggtagt ctagttaagg cactatatag taagtattcc ttattacac ccttacaat 4021 taaaaaacta aaggtagaca gcttttgaca gaaattatta attgcagaaa ctctatgtct 4081 atgtggagtt aaaaaagaata taatattatg ccagcacac atgtgtctac taataaaagt 4141 tacagaatat ttttccataa gttttttata cagaatttga gcttttctt tagtagtata 4201 cacagcaaa caggcaagg tttcttactt aaatacagct tgactaagaa actggttag 4261 atcagaagga aagtctttag ggtctttctac ctttctttt ttcttgggtg gtgttgagtg 4321 ttgagaatct gctgttgcct cttcatcact ggcaaacata tcttcatggc aaaaataatc 4381 ttcattccat ttttcattaa aggaactcca ccaggactcc cactcttctg ttccataggt 4441 tggcacttat aaaaacaata attacttagg gcctttaaatt attttattat ttactaaat 4501 ataaggtagt taccttaaag ctttagatct ctgaaggag ttttccaat tatttgacc 4561 caccattgca gagtttcttc agttaggctt aagccaaacc actgtgtgaa gcagtaaatg 4621 cagtagcaat ctatccaaac caagggtctt tttcttaaaa attttctatt taaatgcctt 4681 aatctaagct gacatagcat gcaagggcag tgacagaaag gcttttttga acaaataggc 4741 cattccttgc agtaagggt atctgggcaa agaggaaaat cagcacaac ctctgagcta 4801 ctccagggttc caaaatcagg ctgatgagct acctttacat cttgctccat ttttttatat 4861 aaagtattca ttctcttcat tttatcctcg tcgccccctt tgcagggtg aaattcctta 4921 cacttctcta aataggcttt tctcattaag ggaaggtttc ccaggcagc cttttcaagg 4981 cccaaaaggt ccatgagctc catggactct tccctgttaa gcactttatc catttttgca 5041 aaaattgcaa aagaatagg atttcccaa atagttttgc taggcctcag aaaaagcctc 5101 cacaccctta ctacttgaga gaaagggtgg aggcagagcg g
Génotype Ic N°AB211377 4683-4703 4747-4734 4705-4734 4728 : t → g	1 gctcggcct cttatatatt ataaaaaaa aggccacagg gaggagctgc ttaccatgg 61 aatgcagcca aaccaggaag gaaagtgcac gactgggcag ccagccagtg gcagttaata 121 gtgaaactcc gccctaaaaa ttcttaaata aacacaagag gaagtggaaa ctggccaaag 181 gagtggaag tagccagaca gacatgtttt gcgagcctgg gaatgttggc cttgtcccca 241 gttaactgg acaaaggcca tggttctgcg ccagctgtca caacaagctt ctgtgaaagt 301 tagtaaaacc tggactggaa caaaaaaaag agctcagagg atttttattt ttattttaga 361 gcttttgctg gaattttgta gagtggaaga cagtgtagac gggaaaaaca aaagtaccac 421 tgctttacct gctgtaaaag actctgtaaa agactcctag gtaagtaatc cctttttttt 481 tgtatttcca ggttgatggg tgctgctcta gcacttttgg gggacctagt tgccagtga 541 tctgaggctg ctgctgccac aggatTTTca gtggctgaaa ttgctgctgg ggaggctgct 601 gctgctatag aagttcaaat tgcacccctt gctactgtag agggcataac aagtacctca 661 gaggctatag ctgctatagg cctaactcct caaacatatg ctgtaattgc tgggtgctcct 721 ggggctattg ctgggtttgc tgctttaaatt caaactgtta ctggtgttag ttccctggct 781 caagtagggg atagggtctt tagtgattgg gatcacaaag tttccactgt aggcctctat 841 cagcaatcag gcatggcttt ggaattgttt aaccagatg agtactatga tattttgttt 901 cctggtgtaa atacttttgt aaataatatt caataccttg atcctagga ttggggctcct 961 tctttgtttg ctactatttc ccaggctttg tggcatgtta ttagggtaga taccctgct 1021 ataaccctac aagaattaca aagaagaaca gaaagatttt ttagagactc cttggctaga 1081 tttttggagg aaactacctg gacaattgta aatgcccta taactttta taattatatt 1141 caggaatatt attctgatct ttccctatt aggcctcaa tggtagaca agtagctgaa 1201 agggaaggta cccgtgtaca ttttggccat acttatagta tagatgtgc tgacagtata 1261 gaagaagtta cacaaagaat ggacttaaga aatcaacaaa gtatacttc aggagagttt 1321 atagaaaaaa ctattgcccc aggaggtgct aatcaaagaa ctgctcctca atggatgttg 1381 cctttacttc taggcctgta cgggactgta acactgctc ttgaagcata tgaagatggc 1441 cccaacaaa agaaaggag agtgcacag ggcagctccc aaaaagcaca aggaacccgt 1501 gcaagtgcca aaactactaa taaaaggagg agtagaagtt ctagaagta aaactgggt

	1561 agatgctata acagaggtag aatgcttcct aaaccagaa atgggggato cagatgaaaa 1621 ccttaggggc tttagtctaa agctaagtgt tgaatatgac ttttagcagt atagcccaca 1681 gagaaaaaat cttccctgtt acagcacagc aagaattccc ctccccaatt tgaattagga 1741 cctaacctgt ggaaatctac taatgtggga ggctgtaact gtacaaacag aggttattgg 1801 aataactagc atgcttaacc ttcatgcagg gtcacaaaaa gtacatgagc atggttgagg 1861 gaagcctatt caaggcagta atttccactt ctttgcgtgt ggtggagacc ccttggaat 1921 gcagggagtg ctaatgaatt acaggacaaa gtaccagaa ggtactataa ctccaaaaa 1981 cccaacagcc cagtcccagg taatgaatac tgaccataag gcctatttgg acaaaaaaca 2041 tgcttatcca gttgagtgcg ggattcctga tcccagtaga aatgaaaaata ctaggatatt 2101 tgggactttg acaggagggg aaaaagtctc ccagctactt catgtgacca acacagctac 2161 cacagtgttg ctatagtaac aggtgtgtgg gcctctttgt aaagctgata gccgttatgt 2221 ttcagctgct gatatttgtg gcctgtttac taacagctct ggaacacaac agtggagagg 2281 ccttgcaaga tttttaaga ttgcctgag aaaaagatct gtaagaatc cttaccaaat 2341 ttcccttttg ctaagtgacc ttataaacag gagaaccag agagtggatg ggcagcctat 2401 gtatggtagt gaatccagg tagaagaggt cagggtgttt taggcagatg aaaaacttcc 2461 aggggaccca gatatgata gatataatga caaacaagga caattgcaaa ccaaaatgct 2521 ttaaacaggt gcttttattg tacatatata tttataaat gctgcttttg tataagtcac 2581 ttttaagctt gtgttatttt gggggtgtgt ttttaggcct tttaaaaaac tgggaagcct 2641 tacacaaatg caactcttga ctatgggggt ctgacctttg ggaactctca gaagggctg 2701 aagtatctga gactgggaa gagcattgtg attgggattc agtgcttgat ccatgtccag 2761 agtcttcagt ttctgaatct tcttctcttg tgatatcaag aatacatttc ccatgcata 2821 tattatattt catccttgaa aaagtataca tacttatctc agaatccagc ctttctcttc 2881 attcaacaat tctagattgt atatctgttg caaaatcagc taacggccta aaccaattta 2941 gcagtagcaa taaggctatt ccactttgta agattctttt ttcaagtaag aactctgagt 3001 tttgtaagga ttttcttaaa tatatttttg gcctaaaaatc tatctgtctt acaaatctag 3061 cctgcagggt ttttagggaca ggatactcat tcattgtaac caagcctgga ggaatatatt 3121 ggggtctttt gtttaaatgt ttcttttcta aattaacctt aacactctca tctaaataat 3181 ctctgagact ggctaaatgt gttattccat gtccggaagg gtaactcttt gattcagccc 3241 ctgtcccttt tacatcttca aaaaacaacca tgtactgac tatagctaca cctagtcca 3301 aggttagcct ttccatgggt aggtttacat ttaaggcttt acctccacac aaatctaata 3361 accctgcagc tagtgtgttt ttccactat caataggacc tttaaataac cagtatcttc 3421 tttttggtag gttaaaaaca atacagtgca aaaaatcaaa tatacagaa tctatttag 3481 gtagcaaaac gtgcagccaa gcaacacctg ccataatatt ttctagtaca gcatttccat 3541 gagctccaaa tattaaatcc attttatcta atatatgatt aaatctttct gttagcattt 3601 cttctctggt catatgaagg gtatctactc tttttttagc taaaactgta tctactgctt 3661 gctgacaaat acttttttga tttttacttt ctgcaagat ctgcaatttt gcaaatgct 3721 tttcatgata cttaaagtga taaggttgggt cttttttctg acacttttta cactcctota 3781 cattgtattg aaattctaaa tacataccta ataataaaaa cacatctctca cactttgtct 3841 ctactgcata ctcaagtaatt aatttccaag acacctgctt tgtttcttca ggcctctctg 3901 ggttaaaaatc atgctccttt aagccccctt gaatgcttct tcttatgtta tggtaggat 3961 ctctagttaa ggcactatat agtaagtatt ccttattaac accottacaa attaaaaaac 4021 taaaggtaca cagcttttga cagaaattat taattgcaga aactctatgt ctatgtggag 4081 ttaaaaagaa tataatatta tgcccagcac acatgtgtct actaataaaa gttacagaat 4141 atttttccat aagtttttta tacagaattt gagcttttct ttagtagtta tacacagcaa 4201 agcaggcaag ggttctatta ctaaatacag cttgactaag aaactggtgt agatcagaag 4261 gaaagtcttt aggtctctct acctttcttt ttttcttggg tggcggtgag tgttgagaat 4321 ctgctgttgc ttcttcatca ctggcaaaac tatcttcatg gcaaaaataa tcttcatccc 4381 atttttcaat aaaggaactc caccaggact cccactcttc tgttccatg gttggcact 4441 agaaaaaaa taattactta gggcctttta ctattttatt atttctctaa atataagtta 4501 gttaccttaa agcttttagat ctctgaagg agtttctcca attatttggg cccaccattg 4561 cagagtttct tcagtttagt ctaagccaaa ccactgtgtg aagcagtcaa tgcagtagca 4621 atctatocaa accaagggtc cttttcttaa aaattttcta ttaaatgcc ttaattcaag 4681 ctgacatagc atgcaagggc agtgacaga aggttttttg gaacaaag gagcattcctt 4741 gcagtaacag gtatctgggc aaagaggaaa atcagcaca accctctgagc tactccaggt 4801 tccaaaatca ggctgatggg ctacctttac atcctgctcc atttttttat ataaagtatt 4861 cattctcttc attttatcct cgtcgccccc tttgtcagg tgaaattcct tacactcct 4921 taaataggct tttctcatta agggaagggt tccccagga gctctttcaa ggccataaag 4981 gtccatgagc tccatggatt cttccctgtt aagcaactta tccatttttg caaaaattgc 5041 aaaagaatag ggatttcccc aaatagtttt gctaggcctc agaaaaagcc tccacacct 5101 tactacttga gagaaagggt ggaggcagag gcg
Génotype II N°AB263920 4678-4698 4742-4762 4700-4729 4697 : g→a 4703 : a→t 4744-4745 : gg→aa	1 gcctcggcct cttatatatt ataaaaaaa aggccacagg gaggagctgc ttaccatgg 61 aatgcagcca aacctgacc tcaggaagca agtgcatgac tgggcagcca gccagtggca 121 gttaatagtg aaacccgcgc cctaaccattc tcaataaaac acaagaggaa gtggaaactg 181 tccaaaggag tggaagcagc ccagacagac atgttttgcg agcctaagaa ccttggcctt 241 gtccccagtt aatactggac aaaggccatg gttctgcgcc agctgtcacg acagtgtatc 301 gtgaaaattg gtaaaacctg gactggaact aaaaaagag ctacagaggat ttttattttt 361 attttagagc ttttgcgtga attttgtaga ggtgaagaca gtgtagacgg gaaaaacaaa 421 agtaccactg ctgtaaaaga cctgtataaa gactcctagg taagtaatgc ttttttttgg 481 tatttccagg ttgtaggggt ctgctctagc acttttgggg gacctagtgt ccaggttatc 541 tgaggctgct gctgccacag gattttcagt ggctgaaatt gctgctgggg aggctgctgc 601 tgccatagaa gttcaaatgt catcccttgc tactgtagag gccataacaa ctacctcaga 661 ggctatagct gctataggcc taacacctca aacatagct gtaattgctg gtgtccagg 721 ggctattgct ggggttgcgt ctttaattca aactgttact ggtattagtt ctttggctca 781 agtagggtat aggtttttta gtgattggga tcacaaagtt tccactgtag gcctttatca 841 gcaatcaggc atggtcttgg aattgtttta ccagatgag tactatgata ttttgtttoc 901 tgggtgtaaat acttttgtaa ataatttca atacttagat cctaggcatt ggggtccttc

	961	tttgtttgct	actattttctc	aggctttgtg	gcatgtttatt	agagatgata	tacctgctat
	1021	aacttcacaa	gaattgcaaa	ggagaacaga	aagattttttt	agggactctt	tggttagatt
	1081	tttggaagaa	accacctgga	caatttgtaa	tgccoctgta	aacttttata	attatatcoa
	1141	ggattattat	tctaatttgt	cccttattag	gccttcaatg	gttaggcaag	tagctgaaag
	1201	ggaaggtacc	catgtaaatt	ttggccatac	ctacagcata	gatgatgctg	acagtataga
	1261	agaagttacc	caaagaatag	agttaagaaa	taaggaaaag	gtacattcag	gagagtttat
	1321	agaaaaaact	attgccccag	gaggtgctaa	tcaaagaact	gtcctcfaat	ggatgttgcc
	1381	tttgcttcta	ggcctgtacg	ggactgtaac	acctgctctt	gaagcatatg	aagatggccc
	1441	caaccaaaag	aaaaggagag	tgtccagggg	cagctcccaa	aaagccaaa	gaaccctg
	1501	aagtgccaaa	actactaata	aaaggaggag	tagaagtctt	agaagttaa	actggggtag
	1561	atgctataac	agaggtagaa	tgctttctaa	atccagaaa	ggggatcca	gataatgacc
	1621	ttaggggcta	tagtctaaag	ctaactgctg	aaaatgcctt	tgacagtgat	agcccagaca
	1681	aaaaaatgct	tccttgttac	agcagacgaa	gaattccact	gccaatcta	aatgaggacc
	1741	taacctgtgg	aaatctacta	atgtgggagg	ctgtaactgt	aaaaacagag	gttattggaa
	1801	taactagcat	gcttaacctt	catgcagggt	cccaaaaagt	ccatgagaa	ggtggaggca
	1861	aacctgtgca	aggcagtaat	ttccacttct	ttgctgtggg	tgagagcccc	ttggaaatgc
	1921	agggagtgtc	aatgaattac	agaacaaagt	accacaaagg	tactataacc	cctaaaaacc
	1981	ctacagctca	gtcccaggta	atgaatactg	atcataaggc	ctatttggac	aaaaacaatg
	2041	cttatccagt	tgagtgtggg	attcctgatc	ctagtagaaa	tgaaaatct	aggtattttg
	2101	gaacttacac	aggaggggaa	aatgttcccc	cagtacttca	tgttaccaac	acagctacca
	2161	cagtgttgct	ggatgaacag	ggtgtggggc	ctctatgtaa	agctgacagc	ctgtatgttt
	2221	cagctgtctg	tatttgtggg	ctgtttacta	acagctctgg	gacacaacag	tgagagggcc
	2281	ttgcaagata	ttttaagatt	cgctgagaa	aaagatctgt	gaagaatcct	taccaatttt
	2341	cctttttgct	aagtgtacct	ataaacagga	gaacccaaaa	atgtggatggg	cagcctatgt
	2401	atggatatga	atctcagggt	gaggagggtg	gggtgtttga	tgccacagaa	cagcttccag
	2461	gggaccocga	tatgataaga	tatatattga	gacaaggaca	attgcaaaaa	aaaatggttt
	2521	aaacaggtgc	tttattgtac	atatatatgc	ttataaatgt	ctgcttttgt	atcacacagt
	2581	ttaagcttct	gttatttttg	gggtgggtgt	tttaggccttt	taaaactgt	aaagccttta
	2641	cacaaatgca	actcttggct	gtgagggttt	tgtgaatctt	cagcaggggc	tgaagtatct
	2701	gagacttggg	aagagcattg	tgattgggat	tcagtgtctg	atccatgtcc	agagtctcoa
	2761	gtttctgaat	cttcttctct	tgtaatatca	agaatacatt	ttcccatgca	tatatattat
	2821	ttcatccttg	aaaaagata	catacttctc	tcagaatcca	gcctttcctt	ccattcaaca
	2881	attctagact	gtatatcttt	tgaaaaatca	gctacaggcc	taaaccaaat	tagcagtagc
	2941	aaaagggtca	ttccactttg	taatatctct	ttttcaagta	aaaactctga	gttttgcagg
	3001	gactttotta	aatatatttt	gggtctaaaa	tctatctgtc	ttacaaatct	agcctgcaga
	3061	gttttaggga	caggatactc	attcatgtga	actaacctgt	gtggaaatat	ttgtgttctt
	3121	ttgtttaaat	gtttcttttc	taaattaacc	ttaacacttc	catctagata	atccctcaaa
	3181	ctgtctaaat	tgtttattcc	atgtcctgaa	ggcaaatcct	ttgattcagc	tcctgtccct
	3241	tttacatctt	caaaaacaac	catgtactga	tctatagcca	caccagtttc	aaaagtttag
	3301	ctttccatgg	gtaaattcac	atttaaagct	ttacctccac	ataagttcaa	taaccttgca
	3361	gctaagggtg	ttttgccact	atcaattgga	cctttaaata	accagtatct	tcttttaggt
	3421	acattaaaaa	caacacagtg	aagaaaatca	aaaataacag	aatccatttt	aggtagcaaa
	3481	caatgtagcc	aagcaacccc	tgccatata	tggtctagta	cagcatttcc	atgagctcca
	3541	aatattaaat	ccattttatc	taatatatga	ttaaatcttt	ctgttagcat	ttcttccctg
	3601	gtcatatgaa	gggtatctac	tcttttttta	gctaaaactg	tatctactgc	ttgtgtacaa
	3661	atactttttt	gatttttact	ttctgcaaaa	ataatagcat	ttgcaaaaatg	cttttcatga
	3721	tacttaaagt	ggtaagggtg	gtcttttttt	tgacactttt	tacactcctc	tacattgtat
	3781	tgaaattcta	aatacatctc	caataataaa	aacacatcct	cacactttgt	ttctactgca
	3841	tattcagtaa	ttattttcca	ggacacctgc	tttgtttctt	caggctcctc	tggtttaaag
	3901	tcattgtcct	ttaggccccc	ttgaatgctt	tcctctatta	tatggtagtg	atccctagtt
	3961	aaggcactgt	atagtaagta	ttccttatta	acacccttac	aaattaaaaa	actaaaagta
	4021	cacagctttt	gacagaaatt	attaatgca	gaaactctat	gtctatgttg	agttaaaaag
	4081	aatataatat	tatgaccagc	acacatgtgt	ctactgataa	aagttacaga	atacttttcc
	4141	ataagttttt	tatacagaat	ttgagctttt	tcttttagtg	tatacacagc	aaaacaggca
	4201	agtgttctat	tactaaatct	agcttgacta	agaaaactgg	gtagatcaga	gggaaagtct
	4261	ttagggtctt	ctacotcttc	tttttttttg	ggtggtgttg	agtgttggtg	atctgtctgt
	4321	gtttcttcat	cactggcaaa	catactctca	tggcagaata	aatcttcatc	ccatttttca
	4381	ttaaaggagc	tcaccaggga	ctccactctc	tctgttccat	aggttgccac	ctataaaaaa
	4441	aaaataatta	cttagggcct	ttcttttaat	ttactacttc	tctaaatata	aattagttac
	4501	cttaagcttt	tagatctctg	aaggaggttt	ctccaattat	ttggaccac	cattgagggg
	4561	tttcttcagt	gagggtctag	ccaaaccact	gtctgaagca	atcaatgcag	tagcaatcta
	4621	tcacaaacca	tggtcttttt	cttaaaaatt	ttctatttaa	atgccttaat	cttagctgac
	4681	atagcatgca	agggcaatgc	actgaagggt	ttttggaaca	aataggccat	tccttgagct
	4741	acaaagtatc	tgggcaaaaga	ggaaaatcag	cacaaacctc	tgagctatcc	caggttccaa
	4801	aatcaggctg	atgagctacc	tttaccatct	gtccattttt	tttatataaa	gtattcatcc
	4861	tcttcatttt	atcctctctg	ccccctttgt	cagggtgaaa	ttccttacac	ttttttaaat
	4921	aggcttttct	cattaaaggga	aggtttccccc	aggcagctct	ttcaaggcct	aaaaggtcca
	4981	tgagctccat	ggattcctcc	ctgtttaaga	ctttatccat	ttttgcaaaa	aattgcaaaa
	5041	gaatagggat	ttccccaaat	agttttgcta	ggcctcagaa	aaagcctcca	cacccttact
	5101	acttgagaga	aagggtggag	gcagaggcg			
Génotype III N°M23122 4647-4667 4711-4731	1	gcctcgccct	cttatatat	ataaaaaaaa	aggccacag	gaggagctgc	ttacccatgg
	61	aatgcagcca	aaccatgacc	tcaagaagca	agtgcagtac	tgggcagcca	gccagtgcca
	121	gttaaatag	aaaccccgcc	cctaaccattc	tcaaaataaac	acaagaggaa	gtggaaactg
	181	tcacaaagg	tggaagcag	ccagacagac	atgttttgcg	agcctaagaa	tcttgtgggt
	241	ttgcgccagc	tgtcacgaca	agcttcagtg	aaagttggtg	aaacctggac	tggaactaaa
	301	aaaagagctc	agaggatttt	tattttttat	ttagagcttt	tgctggaatt	ttgtagaggt

4669-4698

4666 : g→a

4672 : a→t

4713-4714 : gg→aa

```
361 gaagacagtg tagacgggaa aaacaaaagt accactgctt tacctgctgt aaaagactct
421 gtaaaaagact cctaggttaag taatgctttt tttttgtatt ttcaggttga tgggtgctgc
481 tctagcactt ttgggggacc tagttgccag tgatctcgag gctgctgtgc ccacaggatt
541 ttcagtggct gaaattgctg ctgggggagc tgctgctgcc atagaagttc aaattgcatc
601 ccttgctact gtagagggca taacaactac ctcagaggct atagctgcta taggcctaac
661 acctcaaaaca tatgctgtaa ttgctgggtc tccaggggct attgctgggt ttgctgcttt
721 aattcaaaact gttactggta ttagtctctt ggctcaagta gggatatagg tttttagtga
781 ttgggatcac aaagtttcca ctgtaggcct ttatcagcaa tcaggcatgg ctttgggaatt
841 gtttaaccca gatgagtact atgatatttt gtttctggtt gtaaatactt ttgttaataa
901 tattcaatat ctagatccta ggcattgggg tccttctttg ttgtactata tttcccaggc
961 tttgtggcat gttattagag atgatatacc tgctataact tcacaagaat tgcaaaggag
1021 aacagagaga ttttttaggg actctttggc tagatttttg gaagaaacca cctggacaat
1081 tgtaaatgcc ccataaaact tttataatta tttcaggat tattattcta atttgtcccc
1141 tattaggcct tcaatgggta ggcaagtagc tgaaggggaa ggtacccatg taaattttgg
1201 ccatacctac gacatagata atgtcgacag tatagaagaa gttaccocaa gaatggattt
1261 aagaaataag gaaagtgtac attcaggaga gtttatagaa aaaactattg cccaggagg
1321 tgctaatacaa agaactgctc ctcaatggat gttgcctttg cttctaggcc tgtacgggac
1381 tgtaacacct gctcttgaag catatgaaga tggccccaac caaaagaaaa ggagagtgtc
1441 cagggggcagc tcccaaaaag ccaaggaac ccgtgcaagt gccaaaacta ctaataaagg
1501 gaggagtaga agttctagaa gttaaaactg gggtagatgc tataacagag gtagaatgct
1561 ttctaaaccc agaaatgggg gatccagatg ataaccttag gggctatagt cagcacctaa
1621 gtgctgaaaa tgccttttag agtgatagcc cagacagaaa aatgcttctt tgttacagta
1681 cagcaagaat tccactggcc aacctaaatg aggacctaac ctgtggaaaat ctactaatgt
1741 gggaggctgt aactgtaaaa acagagggta ttggaataac tagcatgctt aaaccttatg
1801 cagggtocca aaaagttcat gagaatgggt gaggtaaacc tgtccaaggc agtaatttcc
1861 acttttttgc tgtgggtgga gacctcttgg aatgacagg agtgctaata aattacagaa
1921 caaagtacc acaaggctac ataaccctac aaaacccctac agctcagtc caggtaatga
1981 atactgacta taaggctat ttggacaaaa acaatgctta tccagttag tgctggattc
2041 ctgactcctag tagaaatgaa aatactaggt attttggaac ttacacagga ggggaaaaatg
2101 ttctctcagc acttcatggt accaacacag ctaccacagt gttgctggat gaacagggtg
2161 tggggcctct gtgtaaagct gatagcctgt atgtttcagc tgctgatatt tgtgggctgt
2221 ttactaacag ctctgggaca caacagtgga gaggccttgc aagatatctt aagattcgcc
2281 tgagaaaaag atctgtgaag aatccttacc caatttctt tttgctaagt gacctataa
2341 acaggagaac ccaaaaagtg gatgggcagc ctatgtatgg tatggaatct caggttgagg
2401 aggtaaagggt gttgatggc acagaacagc ttccagggga ccagatatg ataagataa
2461 ttgacagaca aggacaattg caaacaaaaa tggtttaaac aggtgcttta ttgtacatat
2521 atatgcttaa taaatgctgc tttgtataa cacagttgaa gcttctgtta ttttgggggt
2581 ggtgttttag gccttttaaa acactgaaag cctttacaca aatgtaactc ttggctgtga
2641 ggggtttctg aatcaggggc tgaagtatct gagacttggg aagagcattg tgattgggat
2701 tcagtgcctg atccatgtcc agagtcttca gttcttgaaat cttctctctt tgtaatatca
2761 agaatacatt ttcccatgca tatattatat ttcatccttg aaaaagtata catacttatc
2821 tcagaatcca gcctttcctt ccattcaaca attctagact gtatatcttt tgaaaaatca
2881 gctacaggcc taaaccaaat tagtagtagc aaaagggtca ttccactttg taatattctt
2941 ttttcaagta aaaactcaga gttttgcagg gactttctta aatatattt ggggtataaa
3001 tctatctgtc ttacaaatct agcctgaaga gttttaggga caggatactc attcattgta
3061 actaacctcg gtggaatat ttgtgttctt ttgtttaaat gtttcttttc taaattaaac
3121 ttaacacttc catctagata atccctcaaa ctgtctaaat tgtttatccc atgtctgaa
3181 ggcaaatcct ttgattcagc tctgttccct tttacatctt caaaaacaa catgtactga
3241 tcaatagcca caccagttc aaaagtttag ctttccatgg gtaaatttac atttaaagct
3301 ttacctccac ataagtctaa taacctgca gctaagggtg ttttgccact atcaatttga
3361 ccttttaata accagtatct tcttttaggt acattaaaaa caacacagtg aagaaaaatca
3421 aaaataacag aatccatttt aggtagcaaa caatgtagcc aagcaacccc tgccatatat
3481 tgttctagta cagcatttcc atgagctcca aatattaaat ccattttatc taatataatga
3541 ttaaatcttt ctgttagcat ttcttccctg gtcatatgaa gggatatctac tcttttttta
3601 gctaatactg tatctactgc ttgtgacaa ataacttttt gatttttact ttctgcaaaa
3661 ataatagcat gtaacaaatg ctttctatga tactttaaat gtaagggtg attctttttt
3721 tgacactttt tacactcttc tacattgtat tgaaattcta aatacatacc caataataaa
3781 aacacatcct cacactttgt ttctactgca tatcagtaa ttaatttcca agacacctgc
3841 tttgtttctt caggctcttc tgggttaaag tcatgtctct ttaagccccc ttgaatgctt
3901 tctctatatta tatggtagg atccctagtt aaggcaactg atagtaagta ttctttatta
3961 acacccttac aaattaaaaa actaaaagta cacagctttt gacagaaatt attaatgca
4021 gaaactctat gtctatgtgg agttaaaaag aatataatat tatgaccagc acacatgtgt
4081 ctactgataa aagttacaga atatttttcc ataagttttt tatacagaat ttgagctttt
4141 tctttagtgg tatacacagc aaaacaggca agtgttctat tactaaatac agcttgacta
4201 agaaactggg gtagatcaga gggaaagtct ttagggctct ctacctttct tttttttttg
4261 ggtgtgtgtg agtggtggga atctgctgtt gcttcttcat cactggcaaa catatcctca
4321 tggcagaata aatcttcttc ccatttttca ttaaaggagc tccaccagga cteccactct
4381 tctgttccat aggttggcac ctataaaaaa aaaataatta cttagggtct tcttttaatt
4441 tactactttt ctaaatataa attagttacc ttaaagcttt agatctctga agggagtttc
4501 tocaattatt tggaccocac attgcagggt ttcttcagtg aggtctaaag caaaccactg
4561 tgtgaagcaa tcaatgcagt agcaatctat ccaaaccaat ggctcttttc ttaaaaattt
4621 tctatttaaa tgccttaatc tttagctgaca tagcatgcaa gggcaltgca ctgaaggctt
4681 tttggaacaa ataggccatt ccttgacgta caaagttatc tggcaagag gaaaatcagc
4741 acaaacctct gagctattcc aggttccaaa atcaggctga tgagctacct ttacatctcg
4801 ctccattttt ttatataaag tattcattct cttcatttta tctctgtgc cccctttgtc
4861 agggtgaaat tctttacact tttttaaata ggctttctc attaagggaa ggtttcccca
```

	4921 ggcagctctt tcaaggccta aaaggtccat gagctccatg gattotttccc tgtttaagac
	4981 tttatccatt ttgtcaaaaa attgcaaaaag aatagggatt tccccaaata gttttgctag
	5041 gcctcagaaa aagcctccac acccttacta cttcagagaa aggggtggagg cacaggcgc
Génotype IV N°AB260033 4695-4715 4759-4779 4717-4746 4699 : t→c 4720 : a→t	1 gcctcggcct cttatatatt ataaaaaaaa aggccacagg gaggagctgc tttcccattgg
	61 aatgcagcca aacctgacc tcaggaagga aagtgcataga ctgggcagcc agccagtgcc
	121 agttaatatg gaaaccccg ccctagaatt ctcaataaaa cacaagagga agtggaaagt
	181 agccaaagga gtggaaagca gccagacaga catgttttgc gagccgagga atcttgccct
	241 tgtccccagt taatactgga caaaggccat ggttctacgc cagctgtcac gacaagcttc
	301 tgtgaaagtt agtaaacct ggactggaac taaaaaaga gctcagagga ttcttatttt
	361 tatttttagag cttttgctgg aattttgtag aggtgaagac agtgtagacg ggaaaaacaa
	421 aagtaccact gctttacctg ctgtaaaaa cctctgtaaa gactccttag taagtaatcc
	481 cttttttttt gtatttccag gttcatgggt gctgctctag cacttttggg gacctagtt
	541 gccagtgtat ctgaggtgc tgctgccaca ggattttcag tggctgaaat tgctgctggg
	601 gaggctgctg ctgctataga agttcaaat gcactccctg ctactgtaga gggcataaca
	661 agtacctag aggttatagc tgctataggc ctaactcctc aaacatgtc tgtaattgct
	721 ggtgctccag gggctattgc tgggtttgct gctttaattc aaactgttag tggattagt
	781 tctttgctc aagtagggta taggtttttt agtgattggg atcacaaagt ttccactgta
	841 ggcctttatc agcaatcagg catggcattg gaattgttta acccagatga gtactatgat
	901 attttgtttc ctggtgtaaa tacttttgta aataatattc aatacctaga tcctaggcat
	961 tggggtcctt ctttgtttgc tactatttcc caggctttgt gccatgttat tagggatgat
	1021 atacctgcta taacttcaca agaattgcaa agaagaacag agagattctt tagagactcc
	1081 ttggctagat ttttgaaga aactacctgg acaattgtaa atgccccgtg aaacttttat
	1141 aattatattc aggattatta ttctaatttg tccctatta ggccttcaat ggttaggcaa
	1201 gttgctgaaa gggaaagga cccaggtaaa tttggccata cctacagaat agatgtgct
	1261 gacagtatac aagaagttac ccaaagaatg gagttaagaa ataaagagaa tgtacattca
	1321 ggagagttta tagaaaaaac tattgcccca ggaggtgcta atcaaagaa tgctcctcaa
	1381 tggatgttgc ctttgcctct aggcctgtac gggactgtaa ccactgctct tgaagcatat
	1441 gaagatggcc ccaaccacaaa gaaaaggaga gtgtccaggg gtagaagttc tagaagttaa
	1501 ggaaccogtg caagtgccaa aactactaat aaaaggagga gtagaagttc tagaagttaa
	1561 aactggggta gatgtataa cagaagtaga atgctttcta aatccagaaa tgggggatcc
	1621 agataatgac cttaggggct atagtctaag actaactgct gaaactgcct ttgacagtga
	1681 tagccagac agaaaaatgc ttccctgtta cagcacagca agaattccac taactaattt
	1741 gaatgaggat ctaacctgtg gaaatctact aatgtgggag gctgtgactg taaaaacaga
	1801 ggttatttga ataactagta tgcttaacct tcactgcaggg tcacagaaag tacatgaaaa
	1861 tgggtggagc aaacctattc aaggcagcaa ttttcacttt tttgtgtggt gtggggaccc
	1921 cttggaatg cagggtgtac ttatgaacta cagaacaaag taccagaag ctactgtcac
	1981 cccaaaaaat cccacagctc agtcccaggt aatgaatact gaccataagg cctacttgga
	2041 caaaaaaat gcttatccag ttgaatgctg gatctctgac cctagtagaa atgaaaaaac
	2101 taggtatttt ggaacatata caggagggga aaatgttccc ccagtacttc atgtaaccaa
	2161 cacagctacc acagtgttgc ttgatgaaca ggggtgtggg cctctgtgta aagctgatag
	2221 cctgtatgtt tcagctgctg atatttgttg actgtttact aacagctctg gaacacaaca
	2281 gtggaggggc cttccaagat attttaagat tcgcctgaga aaaagatctg taagaacccc
	2341 ttacccaatt tcctttttgc tttagtacct tataaacagg agaaccaga gagtggatgg
	2401 gcagcctatg ttggtatagg agtctcaggt ggagggagtc agggctgttg atggcacaga
	2461 acagcttcca ggggaccag atatgataag atatattgac agacagggac aattgcaaac
	2521 aaaaatgggt taaacaaggt gcttttattg tacatatata tgcttaataa atgctgcttt
	2581 tatattacac attttaactc tgtgttattt tgggggtgggt gtttttaggcc ttttaaaaaa
	2641 ctgaaagcct ttacacaaat gtaactcttc actatggggg tctagccttt gggaattctt
	2701 agcaggggct gaagtatctg agacttggga agagcattgt gattgagatt cagtgtctga
	2761 tccatgtcca gacttctcag tttctgaatc ttcttctctt gttatatcaa gaatacattt
	2821 ccccatgcat atattatatt tcactccttg aaaaagtata atacttatct cagaatccag
	2881 cctttccttc catccaacaa ttctagactg tatactctgt tctagccttt ctagcggcct
	2941 gaaccacaaat agcagtagca acaagggtcat tccactttgt aatatctctt tttcaagtaa
	3001 aaattctgag ttttgagggt attttcttaa ataaatttta ggtctaaaaa ctatctgtct
	3061 tacaaaatcta gccgtcaagg ttttggggac aggatactca ttcatgttaa ctaaacctgg
	3121 tggaaatatt tgggttcttt ttgttaagtg tttcttttct aaattaaact tgacacttcc
	3181 atctaaataa tcccttaaac tgtctaaatt gtttattcca tgtcctgaag gcaaatcctt
	3241 tgattcagct cctgttccct tcacatcttc aaaaacaacc atatactgat ctatagccac
	3301 acccagttca aaagtaagcc tttccatggg taaattcaca tttaaagctt tgccctccaca
	3361 taaatctaata aacctgcag ctagtgtttg ttttccacta tcaattggac ctttgaataa
	3421 ccagtatctt ctttttaggt cattaaaaac aatacagtgc aggaaatcaa atataacaga
	3481 atccattttta ggtagcaaac agtgcagcca ggcaactcct gccatatatt gttctagtac
	3541 agcatttcca tgagctocaa atattaaatc cattttatct aatatatgat taaatctgtc
	3601 tgttagcatt tcttctcttg tcataaggag ggtatctacc ctttttttag ctaacactgt
	3661 atccactgct tgctgacaaa tacttttttg atttttactt tctgcaaaaa tggtagcatt
	3721 tgcaaaatgc ttttcatgat atttaaagt gtaggggttg tctttttttt gacacttttt
	3781 acactcctct acattgtact gaaattctaa atacataccc aatagtagaa acacactctt
	3841 acactttgct tctactgct attcagttat taatttccag gacactgtct cttttcttcc
	3901 aggttctctt gggttaaaaa catgctcctt taggccccct tgaatacttt cctctattat
	3961 ataatatgga tctctagtta aggcactgta tagtaagtat tctttattaa cacccttaca
	4021 aattaaaaaa ctaaaagtac acagcttttg acagaaatta ttaattggac aaactctatg
	4081 tctatgtgga gttaaaaaga atataaatatt atgaccagca cacactgtgc tactaataaa
	4141 agttacagaa tattttttcca taagtttttt atacagaatt aaagcttttt ctttagtagt
	4201 atacacagca aagcaggcaa gagtctctat actaaatata gcttgactaa gaaactgggt
	4261 tagatcagaa ggaaggtctt tagggctctt tacctttctt ttttttttgg gtgggtgttga
	4321 gtgttgaggaa ctgctgtgtt cctcctcatc actggcaaac atactctcat ggcagaataa
	4381 atcttccatcc catttttcat taaaggacct ccaccaggac tccactctt ctgttccata

	4441	ggttggcacc	tataaaaaa	acataattac	ttagggcctt	cctataatth	actattatct
4501	aaagataaat	tagttacctt	aaagcttttag	atctctgaag	ggagtctctc	caattatttg	
4561	gaccacccat	tgcaagagttt	cttcagtttag	gtctaagcca	aaccactgtg	tgaagcagtc	
4621	aatgcagtag	caatctatcc	aaaccaagg	ctcttttctt	aaaaattttc	tatttaaatg	
4681	tcttaatctt	agctgacaca	gcattgcaagg	gcagtgcaat	gaaggctttt	tggaacaaat	
4741	aggccattcc	ttgcagta	ca gggatctctg	gcaaagagg	aaatcagcac	aaacctctga	
4801	gtactocag	gttccaaaat	caggetgggtg	agctaccttt	acatcctgct	ccattttttt	
4861	atataaagta	ttcattctct	tcattttatc	ctcgtcgccc	cctttgtcag	ggtgaaattc	
4921	cttacacttt	cttaaatagg	ctttcctcat	taagggaagg	tttcccagg	cagctctttc	
4981	aaggcctaaa	aggtccatga	gctccatgga	ttcctccctg	tttagcactt	tatccatttt	
5041	tgcaaaaaat	tgcaaaagaa	tagggatttc	cccaaatagt	tttgctaggc	ctcagaaaaa	
5101	gcctccacac	ccttactact	tgagagaaa	ggtggaggca	gaggcg		

ANNEXE 2 – MAITRISE DES RISQUES, ETUDE AMDEC

5M	Mode de défaillance	Effet	Cause	Détection	Moyen de maîtrise existant	Indice de fréquence	Indice de gravité	Indice de détection	Indice de criticité	Action proposée
ETAPE 1 : Préparation des mélanges réactionnels										
Matières	Mauvaise qualité d'un réactif	Réactif non validé	Défaillance d'un des réactifs	Défaut d'amplification	Validation du lot de prémix à réception de ce lot	7	5	2	70	
	Oubli d'un des réactifs composant le mix	Réactif non validé	Erreur humaine	Défaut d'amplification	Habilitation du technicien, respect des modes opératoires, tableau de préparation des mixes, imprimé de traçabilité	5	5	2	50	
	Dégradation des amorces et des sondes	Réactif non validé	Problème de production ou de conservation	Défaut d'amplification	Validation des contrôles	5	5	2	50	
Milieu	Mauvaise conservation des réactifs	Perte des réactifs	Variation des températures de conservation	Mise en place des alarmes	Vérification de l'homogénéité des enceintes (cartographies), suivi des températures avec des sondes étalonnées	2	5	2	20	
	Contamination des réactifs par des amplicons	Résultat faussement positif	Présence d'amplicons dans l'environnement	Témoin d'extraction	Maîtrise des flux, respect de la marche en avant et des conditions d'hygiène et de sécurité	2	10	5	100	

5M	Mode de défaillance	Effet	Cause	Détection	Moyen de maîtrise existant	Indice de fréquence	Indice de gravité	Indice de détection	Indice de criticité	Action proposée
Méthode	Erreur du volume pipeté	Réactif non validé	Dérive de la pipette	Contrôles	Suivi métrologique des pipettes selon une fréquence définie	5	5	2	50	
ETAPE 2 : Dépôt des extraits										
Matériel	Erreur de volume pipeté	Résultat erroné	Aspiration d'une bulle d'air	Contrôle visuel : cône vide	Contrôle visuel du cône avant dépôt	5	10	2	100	
			Dérive de la pipette	Contrôle visuel : volume insuffisant	Suivi métrologique des pipettes selon une fréquence définie	5	7	5	175	
	Traces sur le bouchon	Résultat ininterprétable	Dépôt de produit interférant avec la lecture de la fluorescence sur le bouchon	Courbe de fluorescence inhabituelle	Vigilance sur l'absence de traces d'encre sur les gants	5	5	5	125	
Matières	Inversion des échantillons	Résultat erroné	Erreur humaine	Aucune	Bonnes pratiques des dépôts transmises lors de la formation des techniciens	5	10	7	350	Sensibilisation lors de l'habilitation au poste technique aux bonnes pratiques de dépôts
	Absence de dépôt			Variation de fluorescence de l'IPC		5	10	5	250	
	Double dépôt dans un puits			Variation de fluorescence de l'IPC		5	10	5	250	
Méthodes	Feuille de route erronée	Echantillon non analysé	Oubli d'un échantillon sur la feuille de travail	Discordance numéro existant vs. Numéro de feuille de route	Scan des numéros de demande	2	5	2	20	

5M	Mode de défaillance	Effet	Cause	Détection	Moyen de maîtrise existant	Indice de fréquence	Indice de gravité	Indice de détection	Indice de criticité	Action proposée
Milieu	Contamination par des amplicons	Résultat faussement positif	Présence d’amplicons dans la pièce	Témoin d’extraction positif	Maîtrise des flux, respect de la marche en avant et des conditions d’hygiène et de sécurité, habilitation technicien, procédés de décontamination	2	10	5	100	
ETAPE 3 : PCR temps réel LC96										
Matériel	Dysfonctionnement du LC96	Echantillons non analysés	Défaillance technique de l’automate	Anomalies des courbes de fluorescence		2	5	2	20	Passage d’une plaque contrôle annuelle sur LC96
Méthode	Utilisation du mauvais programme	Mauvaise qualité de l’amplification	Erreur humaine		Respect du mode opératoire	2	5	2	20	
ETAPE 4 : Validation technique										
Matériel	Dysfonctionnement du réseau informatique	Pas de résultat	Panne informatique ou problème d’accès au réseau	Echec du transfert des résultats	Service informatique	5	5	2	50	
Matières	Présence d’inhibiteurs de PCR	Absence ou mauvaise amplification	Mauvaise qualité de l’extrait	Absence ou mauvaise amplification du contrôle interne	Critères de validation technique définis dans les modes opératoires spécifiques aux PCR	7	7	2	98	

5M	Mode de défaillance	Effet	Cause	Détection	Moyen de maîtrise existant	Indice de fréquence	Indice de gravité	Indice de détection	Indice de criticité	Action proposée
Main d'œuvre	Erreur de transfert des données	Erreur de calcul des résultats sur le fichier Excel	Erreur humaine	Détection visuelle	Respect du mode opératoire, fichier Excel protégé	5	7	2	70	
	Erreur de saisie d'un résultat sur DxLab	Résultat erroné	Erreur humaine	Concordance avec les résultats du tableur Excel	Dossier positif saisi un par un, vérification de la saisie du technicien par le biologiste	5	10	2	100	
ETAPE 5 : Validation biologique										
Main d'œuvre	CQI non déposé	Pas de résultat de CQI pour la validation biologique	Erreur humaine	Absence d'amplification du CQI	Respect du plan de plaque, d'autres critères permettent la validation biologique (gamme, CQI des autres PCR)	5	5	2	50	

ANNEXE 3 – DOSSIER DE VALIDATION DE METHODE QPCR BKPyV

	IMPRIME		Diffusion par :
	Rapport de vérification/validation de méthode		
	Processus : Analytique	Date d'application :	févr-16

Entité :	Virologie	Référence :	9115-31
Unité :	9115		

SOUS-PROCESSUS n°		
☐ PORTEE A ☒ PORTEE B		
Indice de version :	Date :	Motifs de la création / modification:
2	25/09/2017	Validation initiale

1- DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	ADN viral polyomavirus BK (BK virus)
Principe de la méthode :	PCR temps réel quantitative
Type d'échantillon primaire :	sang total
Type de récipient, Additifs :	tube EDTA
Prétraitement de l'échantillon :	extraction automatisée des acides nucléiques sur automate QiaSymphony SP (Qiagen) avec la trousse d'extraction QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (référence 937236), protocole DNA_Blood_200_V7_DSP
Unités :	copies/ml et log10 copies/ml
Critères d'interprétation :	Résultat qualitatif: positif ou négatif - Si positif: résultat quantitatif (seuil inférieur de quantification = 500cop/ml)
Marquage CE (oui/non)	non
Codage C.N.Q. (s'il existe):	NA
Equipement :	Thermocycleur temps réel LightCycler® 96 Real-Time PCR System, Roche Diagnostics GmbH
Référence du réactif :	mélange réactionnel maison TaqMan® Gene Expression Master Mix ref 4369016 (tests de validation réalisés avec lot n°1611276) Contrôle interne d'amplification: TaqMan Exogenous Internal Positive Control, Applied Biosystems oligonucléotides (amorces et sonde) synthétisés par Eurogentec
Matériau d'étalonnage/raccordement métrologique :	
Type d'étalonnage :	standard plasmidique produit au laboratoire: vecteur plasmidique pGEM T Easy dans lequel a été cloné le produit d'amplification de la PCR BK. Production d'une solution mère de plasmide par transformation de bactéries compétentes E Coli JM109. Après extraction plasmidique, dosage spectrophotométrique de l'ADN sur Nanodrop et calcul du nombre de copies théoriques de plasmide par microlitre de solution mère - droite d'étalonnage obtenue par une gamme de dilutions en tampon Tris EDTA de standard plasmidique avec quatre points de concentration théorique 10e6, 10e4, 10e2, 10 copies / uL

2- MISE EN OEUVRE	
Opérateur(s) / maître(s) ayant réalisé la vérification / validation :	technicien: Christelle Guilbaud - biologistes: Céline Bressollette (MCU-PH)
Procédure de validation	Méthode quantitative : 7180-PR-022
Procédure de gestion de la portée flexible	7180-PR-026
Période d'évaluation :	du : 21/03/2017 au: 20/09/2017
Date de mise en service :	18/07/2017

3- MAITRISE DES RISQUES
☒ Etude AMDEC (cf. 7180-IM-033)

4- EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

REPETABILITE								
☒ Applicable ☐ Non applicable (à justifier)								
Echantillons	Nombre (N)	Moyenne Ct	Ecart-type Ct	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite	Conclusion	
Niveau 1	urine patient	10	24,54	0,19	0,8	NA	5	Conforme
Niveau 2	sang total patient	10	32,36	0,33	1,0	NA	5	Conforme
Niveau 3	sang total patient	10	29,50	0,30	1,0	NA	5	Conforme

Conclusions :

Critères fixés: $\leq 5\%$ en Ct, écart type $< 0,5$ sur analyse en log (une variation de plus de 0,5 log est considérée comme significative cliniquement)
l'analyse des résultats en logcop/mi est détaillée sur la feuille répéta logcop: écart type $< 0,1$, CV $< 5\%$
Les résultats de la répétabilité sont donc conformes aux critères fixés

FIDELITE INTERMEDIAIRE = REPRODUCTIBILITE								
☒ Applicable ☐ Non applicable (à justifier)								
Echantillons	Nombre (N)	Moyenne Ct	Ecart-type Ct	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite	Conclusion	
Niveau 1	standard plasmidique	30	14,15	0,23	1,6	NA	5	Conforme
Niveau 2	standard plasmidique	30	21,44	0,23	1,1	NA	5	Conforme
Niveau 3	standard plasmidique	30	28,40	0,32	1,1	NA	5	Conforme
Niveau 4	standard plasmidique	30	31,78	0,46	1,4	NA	5	Conforme

Conclusions :

Critère fixé: CV $\leq 5\%$ en Ct, ce qui correspond à moins de 0,5 log d'écart sur les valeurs en log
Les résultats de la reproductibilité sont conformes aux critères fixés

La reproductibilité est également confirmée par les tests réalisés sur le standard NIBSC dilué au 1/10 en sang total, extrait 4 jours de suite, passé en triplicate, expérience réalisée deux fois à 2 mois d'intervalle.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS	
☒ Applicable ☐ Non applicable (à justifier)	

Conclusions :

Variabilité inter-opérateurs testée lors de l'essai de reproductibilité et par le suivi à chaque série du CQI et de la gamme (changement d'opérateur)
W:\BIOLOGIE\Viro\5_ASSURANCE QUALITE\PCR fichiers de suivis des mix et calculs charges virales\suivi des autres PCR

JUSTESSE (cas des contrôles internes externalisés)	
☐ Applicable ☒ Non applicable (à justifier)	

Conclusions :

Il n'existe pas de Contrôle Inter Laboratoire pour cette technique
CQI non externalisés pour l'analyse.

EXACTITUDE (cas des contrôles externes ponctuels)								
☐ Contrôles quantitatifs ☐ Contrôles qualitatifs								
	Valeur Labo	Cible (groupe de paires)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de paires	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) limite	Conclusion (quantitatif)	Conclusion (qualitatif)
QCMD BKDNA17C1-01	3,63	3,944	3,771	-7,96	-3,74	10,00	Conforme	
QCMD BKDNA17C1-02	3,6	3,891	3,798	-7,48	-5,21	10,00	Conforme	
QCMD BKDNA16C1-01	3,64	3,702	3,673	-1,67	-0,90	10,00	Conforme	
QCMD BKDNA16C1-03	3,88	3,695	3,693	5,01	5,06	10,00	Conforme	

QCMD BKDNA16C1-05	2,72	2,738	2,668	-0,66	1,95	10,00	Conforme	
QCMD BKDNA16C2-03	2,61	2,708	2,537	-3,62	2,88	10,00	Conforme	
QCMD BKDNA16C2-04	3,77	3,751	3,73	0,51	1,07	10,00	Conforme	
QCMD BKDNA15C1-02	3,78	3,906	NA	-3,23	NA	10,00	Conforme	
QCMD BKDNA15C1-03	3,59	3,736	NA	-3,91	NA	10,00	Conforme	
QCMD BKDNA15C1-05	2,9	2,656	NA	9,19	NA	10,00	Conforme	
QCMD BKDNA15C2-02	3,59	3,824	NA	-6,12	NA	10,00	Conforme	
QCMD BKDNA15C2-05	3,43	3,598	NA	-4,67	NA	10,00	Conforme	

Conclusions :

L'ensemble des résultats obtenus avec le programme EEQ QCMD est conforme.
Le score quantitatif obtenu sur le contrôle de qualité européen QCMD 2017 est de 0 pour tous les échantillons positifs, ce qui signifie moins de une DS par rapport à la valeur consensus du groupe de pair

SENSIBILITE ET SPECIFICITE ANALYTIQUE	
☒ Applicable ☐ Non applicable (à justifier)	
Vrais positifs	Analyse des séquences des amorces BKRG1 et BKRG2 et de la sonde BKS RG avec l'outil BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) : absence de réactivité croisée avec d'autres organismes (voir validation des amorces et de la sonde). Réactivité testée avec certains virus à ADN (JC virus, VZV, HSV1, HSV2, EBV, CMV, Parvovirus B19, HHV6, HHV8, Adenovirus): absence d'amplification. Absence de substances interférentes dans les extraits : amplification de la séquence IPC (témoin d'amplification).
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	
Validation des amorces et sonde.xlsx	

Conclusions :

La spécificité analytique est conforme. La sensibilité analytique est testée lors de la détermination de la limite de détection.

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation)		
Méthodologie choisie:	☐ analyse des risques ☒ calcul	
	Incertitudes calculées	Exigences de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	CIQ + EEQ	
Quantification de l'incertitude Niveau 1	3,18 +/- 0,51	log cp/ml

Conclusions :

Incertitude calculée à l'aide des données de reproductibilité et des EEQ (programme QCMD). Incertitude composée +/- 0,25 log cp/ml et incertitude élargie +/- 0,51 log cp/ml.
Valeur cible attendue de l'IM à 0,5 log cp/ml. Résultat considéré comme acceptable

COMPARAISON DE METHODES	
	☐ Applicable ☒ Non applicable (à justifier)
Conclusions et dispositions :	Absence de méthode de référence pour l'analyse

COMPARAISON DE METHODES	
	☒ Applicable ☐ Non applicable (à justifier)
Données bibliographiques	NA
Méthode prise comme référence	Méthode précédemment utilisée en routine pour la quantification de l'ADN viral polyomavirus BK (amorces différentes)
Nombre de mesures :	50

Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	oui
Méthode d'exploitation des résultats :	Corrélation
Equation de la droite de régression :	$y = 1,06x - 0,27$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Nombre de déviants = Aucun
Conclusions et dispositions :	La corrélation entre les deux méthodes est conforme aux valeurs attendues.

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)		
☒ Applicable ☐ Non applicable (à justifier)		
Mode de détermination :	Etude bibliographique	Etude expérimentale
Limite de détection :	Burd, E.M. (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 23, 550–576.	314 cp/mL de sang
Limite de quantification :		5 cp/réaction soit 500 cp/mL de sang
Limite supérieure de linéarité :		8 log10cp/réaction soit 10 log10cp/mL de sang

Conclusions :
La limite de détection a été déterminée en testant 5 dilutions basses du standard plasmidique (mesurées 12 fois chacune) et en analysant statistiquement (Probit analysis) les valeurs obtenues afin de déterminer la valeur pour laquelle 95% des mesures sont positives. La technique est linéaire avec des CV acceptables sur une étendue allant de 8log10cp/réaction à 1cp/réaction. La limite de quantification a donc été déterminée en prenant le dernier point de la gamme faible (utilisée pour déterminer la LOD) pour lequel le pourcentage de positifs est supérieur à 95% .

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)	
☒ Applicable ☐ Non applicable (à justifier)	
Autres interférences	Héparine

Conclusions :
Utilisation de tubes EDTA.

CONTAMINATION	
<i>Indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A</i>	
☒ Applicable ☐ Non applicable (à justifier)	
Inter échantillon :	Pas de contamination
Inter réactif :	Non applicable

Conclusions :
Test de contamination inter-échantillon réalisé sur 30 dépôts suivant la séquence suivante : 3 dépôts consécutifs de niveau haut, suivis de 3 dépôts consécutifs d'eau pour préparations injectables, séquence répétée 5 fois. Tous les dépôts supposés négatifs ne présentent pas de courbe d'amplification. Absence de contamination inter-échantillons.

ROBUSTESSE ET STABILITE DES REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B)	
☐ Applicable ☒ Non applicable (à justifier)	
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués,...	Stabilité du lot de mix suivant la stabilité la plus courte des différents réactifs utilisés

Conclusions :
L'essai de reproductibilité a été réalisé en faisant varier les opérateurs, les lots de mix réactionnels, les lots de standard plasmidique sur une période de temps > 20 jours. Les coefficients de variation obtenus lors de l'essai de reproductibilité et lors de l'essai de répétabilité sont comparables à niveaux de concentration égaux. La méthode est donc robuste.
La stabilité des réactifs est également validée à chaque série de PCR par la validation des 4 points de gamme et du CQI qui doivent être dans les valeurs attendues

INTERVALLES DE REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)	
☐ Applicable ☒ Non applicable (à justifier)	

Conclusions :
Pas de valeurs normales chez l'individu sain.

STRATEGIE DE PASSAGE DES CONTROLES INTERNES
Dans chaque tube réactionnel: présence d'un contrôle interne d'amplification validant l'absence d'inhibiteur de PCR. Dans chaque série bihebdomadaire: contrôle d'extraction PBS (absence de contamination), contrôle de qualité interne (validation de l'ensemble du process de l'extraction à la quantification).

5- DECLARATION D'APTITUDE			
Conclusion: méthode conforme utilisée à partir du 18/07/2017			
Validée par :	C. Bressollette-Bodin		Signature :
	E. Garnier		

6- HISTORIQUE		
Version	Date	Historique des révisions
V01	18/07/2017	Validation initiale

ANNEXE 4 – TABLE DE FINNEY (1952)

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

(Finney, 1952)

RÉSUMÉ

Introduction : Le BK polyomavirus – ou BKPyV – est un petit virus à ADN membre de la famille des *Polyomaviridae* découvert en 1971 chez un patient greffé rénal. Sa séroprévalence en population générale est importante. Il n'est à l'origine de pathologies identifiées que chez certains patients immunodéprimés, dont, principalement, les greffés rénaux et les allogreffés de CSH. Chez ces patients, le suivi de la réplication de BKPyV se fait par quantification de l'ADN viral dans le sang total EDTA et dans les urines. Ces techniques de quantification par PCR ont une mauvaise reproductibilité interlaboratoire et il y a donc un besoin de standardisation entre les techniques existantes. La technique de PCR quantitative en temps réel utilisée au CHU de Nantes depuis 2003 présentait des performances satisfaisantes, mais, les résultats d'une évaluation interlaboratoire nationale ont montré qu'elle sous-quantifiait le génotype II.

Méthode : Nous avons conçu de nouvelles amorces destinées à améliorer la quantification du génotype II, sans perdre les performances de la technique initiale sur les autres génotypes. Afin de tester ceci, nous avons repris des échantillons de sang total EDTA et d'urines du suivi de patients transplantés rénaux de différents génotypes, ainsi que des échantillons de contrôles de qualité externes. La technique a été testée sur le standard international de quantification de l'OMS en vue de la standardisation de la technique et de l'expression des charges virales en UI/mL.

Résultats : Les nouvelles amorces ont permis de quantifier correctement le génotype II tout en conservant des performances de qualité sur les autres génotypes. Les critères de qualité de la technique ont été testés sur site en vue d'une accréditation en portée B selon la norme NF ISO 15189, tous étaient conformes. Le standard international OMS a permis d'obtenir un facteur de conversion des copies/mL aux UI/mL de 3,41 sur le sang total EDTA. Des échantillons de patients connus infectés par un BKPyV de génotype II ont été réanalysés en vue de l'étude de l'impact clinique de cette sous-quantification du génotype II.

Discussion : La technique de PCR quantitative en temps réel BKPyV a pu être optimisée afin de s'affranchir des variations inter-génotypes précédemment observées. D'un point de vue clinique, certaines viruries faibles (inférieures à 5 log₁₀ cp/mL) n'ont pas été détectées à cause de la sous-quantification du génotype II. Cette modification technique a également permis d'optimiser la prise en charge des patients de génotype II, même si ce génotype semble peu fréquent dans nos populations de transplantés. La technique ainsi modifiée a obtenu l'accréditation selon la norme NF ISO 15189 en portée B au mois de décembre 2017. En revanche, la mise en place en routine de la quantification à l'aide du standard international de l'OMS nécessite des investigations complémentaires.

Mots-clés : BK polyomavirus – Human polyomavirus 1 – PCR quantitative en temps réel – diversité génotypique – accréditation – norme NF ISO 15189 – standard international OMS – biologie moléculaire

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 :** Le BK polyomavirus – ou BKPyV – est un petit virus à ADN membre de la famille des *Polyomaviridae* découvert en 1971 chez un patient greffé rénal. Sa séroprévalence en population générale est importante. Il n'est à l'origine de pathologies identifiées que chez certains patients immunodéprimés, dont, principalement, les greffés rénaux et les allogreffés de CSH. Chez ces patients, le suivi de la réplication de BKPyV se fait par quantification de l'ADN viral dans le sang total EDTA et dans les urines. Ces techniques de quantification par PCR ont une mauvaise reproductibilité interlaboratoire et il y a donc un besoin de standardisation entre les techniques existantes. La technique de PCR quantitative en temps réel utilisée au CHU de Nantes depuis 2003 présentait des performances satisfaisantes, mais, les résultats d'une évaluation interlaboratoire nationale ont montré qu'elle sous-quantifiait le génotype II.

**Méthode :** Nous avons conçu de nouvelles amorces destinées à améliorer la quantification du génotype II, sans perdre les performances de la technique initiale sur les autres génotypes. Afin de tester ceci, nous avons repris des échantillons de sang total EDTA et d'urines du suivi de patients transplantés rénaux de différents génotypes, ainsi que des échantillons de contrôles de qualité externes. La technique a été testée sur le standard international de quantification de l'OMS en vue de la standardisation de la technique et de l'expression des charges virales en UI/mL.

**Résultats :** Les nouvelles amorces ont permis de quantifier correctement le génotype II tout en conservant des performances de qualité sur les autres génotypes. Les critères de qualité de la technique ont été testés sur site en vue d'une accréditation en portée B selon la norme NF ISO 15189, tous étaient conformes. Le standard international OMS a permis d'obtenir un facteur de conversion des copies/mL aux UI/mL de 3,41 sur le sang total EDTA. Des échantillons de patients connus infectés par un BKPyV de génotype II ont été réanalysés en vue de l'étude de l'impact clinique de cette sous-quantification du génotype II.

**Discussion :** La technique de PCR quantitative en temps réel BKPyV a pu être optimisée afin de s'affranchir des variations inter-génotypes précédemment observées. D'un point de vue clinique, certaines viruries faibles (inférieures à 5 log<sub>10</sub> cp/mL) n'ont pas été détectées à cause de la sous-quantification du génotype II. Cette modification technique a également permis d'optimiser la prise en charge des patients de génotype II, même si ce génotype semble peu fréquent dans nos populations de transplantés. La technique ainsi modifiée a obtenu l'accréditation selon la norme NF ISO 15189 en portée B au mois de décembre 2017. En revanche, la mise en place en routine de la quantification à l'aide du standard international de l'OMS nécessite des investigations complémentaires.

---

**Mots-clés :** BK polyomavirus – Human polyomavirus 1 – PCR quantitative en temps réel – diversité génotypique – accréditation – norme NF ISO 15189 – standard international OMS – biologie moléculaire