

# Thèse de Doctorat

Simon MAZALREY

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : **Biologie Santé**

**Discipline** : *Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie*

**Spécialité** : *Biologie des organismes*

**Unité de recherche** : *EA 4271 : Immuno-virologie et polymorphisme génétique*

Soutenue le *5 octobre 2016*

Thèse N° :

## Facteurs de pathogenèse au cours des infections à virus BK : Polymorphisme génétique viral et réponse immunitaire antivirale

### JURY

Rapporteurs : **Flore ROZENBERG**, PU-PH, Université Paris Descartes  
**Vincent FOULONGNE**, PU-PH, Université de Montpellier

Examineurs : **Antoine TOUZE** PU, Université de Tours  
**Magali GIRAL**, PU-PH, Université de Nantes

Directeur de Thèse : **Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE**, PU, Université de Nantes

Co-directeur de Thèse : **Céline BRESSOLLETTE-BODIN**, MCU-PH, Université de Nantes

Président du jury : **Magali GIRAL**, PU-PH, Université de Nantes

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Berthe-Marie Imbert pour m'avoir permis d'effectuer ce travail de thèse au sein de son équipe. Merci encore à elle pour avoir su trouver les mots encourageants dans les moments de doute.

Merci également au docteur Céline Bressollette-Bodin pour m'avoir présenté ce virus passionnant, et pourtant méconnu, qu'est le polyomavirus BK. Je la remercie bien entendu pour m'avoir encadré tout au long de ce travail et m'avoir encouragé à porter mes réflexions toujours plus loin.

Je remercie Vincent Foulongne et Flore Rozenberg d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse et d'avoir pris le temps de discuter avec moi des points litigieux.

Merci à Magali Giral et Antoine Touzé d'avoir accepté de participer à ce jury.

Un grand merci également à Cécile Peltier, qui par sa bonne humeur a rendu les longues journées d'expérimentation moins monotones. Je la remercie également pour les connaissances techniques qu'elle m'a transmises tout au long de cette thèse.

Je remercie vivement le laboratoire de virologie du CHU de Nantes dans son ensemble. Plus particulièrement Audrey et Tiphaine pour leur travail en amont sur la biothèque et pour leur compagnie dans le laboratoire P3 du CHU. Je tiens aussi à remercier Bernard et Sandrine pour leur aide précieuse sur le séquençage des régions NCCR.

Un grand merci également à Marina Illiaquer, pour avoir partagé les hauts et les bas d'une thèse en même temps que moi.

Enfin, je tiens à remercier mes proches pour m'avoir soutenu sans relâche et m'avoir fait reprendre confiance en moi quand le moral était au plus bas.

Ainsi je remercie chaleureusement ma mère pour sa présence et ses invitations à déjeuner pour me reconforter. Je remercie mon père pour m'avoir remotivé dans les moments où je perdais pieds. Je remercie mon colocataire Antoine, pour avoir pu me supporter tout au long de ces années. Enfin je remercie mes amis, Jean-Christophe, Elodie, Christophe, Donovan, Just, Fabien, Godefroy, Fanny, Jimmy et Margaux pour leur présence et les moments de détente qui m'ont permis de souffler un peu.

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES TABLEUX.....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCTION :.....</b>	<b>6</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>8</b>
<b>A) La famille des <i>Polyomaviridae</i> .....</b>	<b>8</b>
A.1 Historique de découverte .....	8
A.2 Principaux polyomavirus d'intérêt .....	9
A.2.a Polyomavirus non-humains.....	9
A.2.b Polyomavirus humains .....	12
<b>B- Le polyomavirus BK : caractéristiques virologiques, épidémiologie, pouvoir pathogène.....</b>	<b>14</b>
B.1-Structure de la particule virale.....	14
B.1.a Le génome viral .....	14
B.1.b La capsid virale .....	15
B.2-Interactions virus-cellule.....	18
B.2.a Entrée-décapsidation .....	18
B.2.b Réplication et transcription des gènes viraux .....	18
B.2.c BKPyV et cycle cellulaire .....	24
B.2.d BKPyV et DNA damage response.....	25
B.2.d BKPyV et pouvoir oncogène .....	25
B.3 Épidémiologie, transmission .....	26
B.3.a Données épidémiologiques .....	26
B.3.b Modes de transmission .....	28
B.4 Pouvoir pathogène.....	29
B.4.a Primoinfection, persistance, réactivation.....	29

B.4.b Atteintes tissulaires .....	30
<b>C- Cas particulier des infections à BKPyV en transplantation de rein .....</b>	<b>30</b>
C1 Physiopathologie des infections à BKPyV en transplantation rénale .....	30
C.2 Monitoring des infections à BKPyV en transplantation rénale .....	33
C.3 Traitements antiviraux .....	35
<b>D La région régulatrice non codante du BKPyV: variabilité génétique, rôle dans la régulation du cycle viral et dans la pathogénicité .....</b>	<b>38</b>
D.1 Variabilité génétique de la NCCR : formes archétypes, formes réarrangées .....	38
D.2 Interactions NCCR/facteurs de transcription cellulaires .....	41
<b>E- La réponse immunitaire anti-BKPyV .....</b>	<b>46</b>
E.1 La réponse innée .....	46
E.1.b Cellules dendritiques .....	46
E.1.c Cellules NK .....	46
E.2 La réponse humorale.....	47
E-3 La réponse cellulaire .....	50
E.3.a Méthodes d'étude de la réponse lymphocytaire antivirale .....	50
E.3.b Réponse immunitaire anti BKPyV chez le sujet immunocompétent .....	51
E.3.c Réponse immunitaire anti BKPyV en transplantation de rein .....	51
E.4 Intérêt de l'immunomonitoring des infections virales en transplantation d'organe .....	55
E.5 Modèle animal de néphropathie à polyomavirus .....	56
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>58</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE I.....</b>	<b>59</b>
<b>A) Contexte de la recherche et objectifs.....</b>	<b>60</b>
<b>B) Matériel et Méthode.....</b>	<b>61</b>
B.1 Patients : .....	61
B.2 Cellules épithéliales tubulaires proximales rénales humaines : .....	61
B.3 Souches de virus BK.....	62
B.4 Cinétiques d'infections des HRPTECs : .....	62
B.4.1 Infection initiale.....	62
B.4.2 Transmission secondaire de l'infection .....	63



B.5 Extraction des acides nucléiques : .....	63
B.5.1 Urines des patients.....	63
B.5.2 Culots cellulaires.....	63
B.5.3 Surnageants de culture .....	63
B.5.4 Extraits d'ADN de sang total.....	64
B.6 Quantification de l'ADN du BKPyV par PCR quantitative .....	64
B.7 Quantification des ARN viraux précoces (AgT) et tardifs (VP1).....	65
B.8 Séquençage de la région NCCR : .....	66
B.8.1 Amplification de la région NCCR.....	66
B.8.2 Clonage de la séquence NCCR : .....	67
B.8.3 Sélection des sites de fixation au facteur de transcription cellulaires .....	67
<b>C) Résultats .....</b>	<b>69</b>
C.1 Description de la cohorte .....	69
C.2 Profils des séquences NCCR in vitro et in vivo. ....	71
C.2.a Profils des séquences NCCR issus des cinétiques d'infection in vitro.....	71
C.2.b Profils des séquences NCCR issus des cinétiques d'infection in vivo .....	72
C.3 Impact des réarrangements sur l'activité répllicative et transcriptionnelle du BKPyV .....	74
C.3.a Cinétique de répllication génomique et transcription des ARNm viraux précoces et tardifs au cours des cinétiques d'infection.....	74
C.3.b Impact des réarrangements sur l'évolution de la virémie et sur la survenue d'une NBKV :.....	78
<b>D) Conclusion-Discussion .....</b>	<b>80</b>
 <b>PARTIE EXPERIMENTALE II : .....</b>	 <b>83</b>
 <b>ÉTUDE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE SPECIFIQUE ANTI-BKPYV DANS UNE COHORTE PROSPECTIVE DE PATIENTS ADULTES TRANSPLANTES RENAU.....</b>	 <b>83</b>
<b>A) Contexte de la recherche et objectifs.....</b>	<b>84</b>
<b>B) Matériel et méthodes .....</b>	<b>85</b>
B.1 Description de la cohorte .....	85
B.2 Monitoring des infections à BKPyV .....	85
B.3 Immunophénotypage lymphocytaire.....	85
B.4 Cytométrie en flux.....	85

B.5 Sérologie BKPyV .....	86
B.6 Analyse statistique .....	87
<b>C) Résultats .....</b>	<b>88</b>
C.1 Prévalence des réactivations du BKPyV .....	88
C.2 Facteurs de risques des infections à BKPyV .....	91
C.3 Une lymphopénie T est observée chez tous les patients, indépendamment de toute réactivation BKPyV .....	93
C.4 Les titres d'IgG anti-VP1 augmentent chez les patients présentant une réactivation virale .....	94
C.5 La réponse spécifique T-CD4 anti BKPyV est plus fréquemment détectée que la réponse T-CD8. ....	96
C.6 Une réponse lymphocytaire T CD4 + anti-VP1 est plus fréquemment détectée en cas de virémie, mais le pourcentage de cellules fonctionnelles ne varie pas .....	97
C.7 La fréquence des lymphocytes polyfonctionnels BKPyV ne varie pas selon les groupes à M3 post transplantation.....	99
C.8 Le contrôle de la virémie est associé à une réponse LT multifonctionnelle dans le groupe virémique....	101
<b>D) Discussion .....</b>	<b>102</b>
 <b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	 <b>104</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	 <b>108</b>
 <b>ANNEXES .....</b>	 <b>120</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des principaux Polyomavirus dans le règne animal. ....	9
Figure 2 Arbre phylogénétique des Polyomavirus simiens et humains. ....	11
Figure 3 : Représentation schématique du génome du BKPyV. ....	14
Figure 4 Particule du BKPyV observées dans un échantillon d'urine par microscopie électronique .....	15
Figure 5 : Représentation schématique de la structure d'un Polyomavirus .....	15
Figure 6 Arbre phylogénétique basé sur le génome complet du BK virus hormis la région régulatrice non codante par la méthode du Neighbor Joining.....	17
Figure 7 : Structure de l'AgT des Polyomavirus.....	19
Figure 8 : Cycle de multiplication du polyomavirus BK .....	23
Figure 9 Distribution mondiale des 4 géotypes de BKPyV .....	27
Figure 10 Séroprévalence du BKPyV selon l'âge.....	28
Figure 11 Histologie d'une biopsie de greffon d'un patient atteint de NBKV 12 mois post-greffe .....	31
Figure 12 Facteurs de risque de néphropathie à BKPyV chez les transplantés rénaux .....	33
Figure 13 Decoy cell en coloration de Papanicolaou .....	34
Figure 14 Forme archétype de la région régulatrice non codante (rrNCCR).....	39
Figure 15 Séquence de la ww-NCCR et des sites de fixations aux facteurs de transcription cellulaires .....	41
Figure 16 Séquence de la ww-NCCR et position des nouveaux sites de fixations aux facteurs de transcriptions cellulaires identifiés .....	43
Figure 17 Rôle des sites de fixation des facteurs transcriptions Sp1 / NFI / Ets1 .....	45
Figure 18 : Répartition des patients transplantés rénaux et réno-pancréatiques au CHU de Nantes entre 2008 et 2011 suivant le dépistage de la répllication à BKPyV .....	61

Figure 19 Localisation des principaux sites de fixation aux facteurs de transcription cellulaire sur les blocs PQRS de la WW-NCCR.....	68
Figure 20 Exemple d'une migration électrophorétique sur gel de polyacrilamide des produits d'amplification obtenus par PCR.....	70
Figure 21 Répartition des patients en fonctions des résultats du séquençage.....	70
Figure 22 Représentation schématique des RR-NCCR obtenues <i>in vitro</i> .....	72
Figure 23 Représentation schématique des RR-NCCR retrouvées dans les échantillons sanguins de patients transplantés du rein. ....	73
Figure 24 Quantité de génome par cellules et d'ARN VP1 et AGT par nanogrammes total d'ARN .....	77
Figure 25 Incidence des formes archétypes et réarrangées sur le suivi virologique des patients transplantés du rein.....	79
Figure 26 Design de l'étude sur 160 patients transplantés du rein.....	89
Figure 27 Incidence cumulée du nombre de patients ayant au moins un échantillon positif dans les urines .....	90
Figure 28 Comparaison des charges virales urinaires et sanguines des groupes 2 et 3 .....	90
Figure 29 : Immunophénotypages lymphocytaires ..	94
Figure 30 Réponse humorale spécifique au cours de la première année post-transplantation.	96
Figure 31 Réponse cellulaire spécifique à 3 mois post transplantation. ....	101
Figure 32 Pourcentage de lymphocytes T-CD4 et T-CD8 fonctionnels .....	99
Figure 33 Fréquence de la réponse polyfonctionnelle. ....	100

## Liste des tableaux

Tableau I : Les Polyomavirus humains .....	13
Tableau II: Classification des néphropathies à BKPyV en fonction de l'atteinte histologique observée sur biopsie rénale .....	35
Tableau III : Ensemble de publication portant sur la réponse immunitaire humorale .....	49
Tableau IV : Ensemble de publications portant sur la réponse immunitaire cellulaire.....	54
Tableau V Amorces et sondes utilisées en biologies moléculaire (PCR / RT-QPCR) .....	66
Tableau VI description du groupe de patients pour l'étude de la variabilité de la région NCCR .....	69
Tableau VII Effectifs de patients touché par un réarrangement de la région NCCR.....	74
Tableau VIII Proportion des RR-NCCR selon les modifications (délétion / insertion) de fixation subis par les sites de fixations aux facteurs de transcription .....	74
Tableau IX Type de sous-populations virales par classe de probabilité de néphropathie à BKPyV .....	80
Tableau X Relation entre la présence d'une NBKV prouvée ou probable et la présence d'une forme WW ou RR. ....	80
Tableau XI Statuts virologiques des patients durant une année de suivi post-transplantation	89
Tableau XII Description des caractéristiques de la cohorte en pré-transplantation.....	92
Tableau XIII Caractéristiques du suivi clinique des 12 premiers mois.....	93

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
Agt	Antigène petit t
AgT	Antigène grand T
ARN	Acide ribonucléique
ARN pre-m	ARN pré-messenger
ARNm	ARN messenger
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM Rad-3-related
BKPyV	Polyomavirus BK
CMV	Cytomégalovirus
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
ddNTP	Didésoxyribonucléotide triphosphate
DDR	DNA Damage response
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
EBV	Epstein-Barr virus
ERE	Élément de réponse aux oestrogènes
GRE/PRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes/progestérone
HLA	Human leukocyte antigen
HPyV 6-7-9-12	Human Polyomavirus 6-7-9-12
HRPTECs	Cellules épithéliales rénales tubulaires proximales humain
HSV 1/2	Herpes Simplex Virus 1 /2
HTLV	Human T cell Leukemia Virus
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL2	Interleukine 2
JCPyV	Polyomavirus JC
KIPyV	Polyomavirus KI
LEMP	Leucoencéphalopathie multifocale progressive
LT CD4/CD8	Lymphocyte T CD4/CD8
MCPyV	Polyomavirus du carcinome à cellule de Merkel
miRNA	Micro ARN

MMF	Mycophénolate mofétyl
MPyV	Polyomavirus murin
MWPyV	Malawi Polyomavirus
NBKV	Néphropathie à virus BK
NCCR	Région régulatrice non codante
NFI	Nuclear Factor 1
NJPyV	New Jersey Polyomavirus
NK	Natural Killer
Ori	Origine de réplication
pb	paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
RE	réticulum endoplasmique
rrNCCR	Région régulatrice non codante réarrangée
SIV	simian immunodeficiency virus
STLPyV	Saint Louis Polyomavirus
SV40	simian virus 40
TAC	Tacrolimus
TGF $\beta$	Tumor Growth Factor $\beta$
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
trunc-Agt	Antigène t tronqué
TSPyV	Trichodysplasia spinulosa-associated Polyomavirus
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VZV	Varicella-zoster virus
WUPyV	Polyomavirus WU
wwNCCR	Région régulatrice non codante archétype

## INTRODUCTION :

Le Polyomavirus BK ou BKPyV est, avec le Polyomavirus JC (JCPyV), le premier représentant humain de la famille des *Polyomaviridae*, découvert en 1971. Il s'agit d'un virus ubiquitaire dont le taux de séroprévalence est élevé dans la population générale. Il ne se manifeste que rarement par des signes cliniques chez les sujets immunocompétents mais reste à un état latent au sein de l'organisme.

En revanche, chez l'immunodéprimé, son implication a été prouvée dans des cystites hémorragiques (chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques) et des néphropathies interstitielles (chez les transplantés du rein). C'est donc un virus opportuniste dont les pathologies associées se déclarent lors d'un état d'immunodépression. Il est surtout responsable chez les transplantés rénaux de néphropathies interstitielles appelées néphropathies à *BKPyV* (NBKV), dont la fréquence a augmenté dans les années 90 de façon concomitante à l'utilisation de nouveaux immunosuppresseurs. Ces NBKV ont pour conséquence une perte fonctionnelle du greffon en l'absence de prise en charge.

Alors que le nombre de patients greffés est en constante augmentation et que de nouveaux traitements immunosuppresseurs sont en développement, le BKPyV, pour lequel aucun traitement antiviral spécifique n'est à ce jour disponible, reste un facteur de morbidité important chez ces patients. Les travaux des dix dernières années ont permis de progresser dans la compréhension des mécanismes d'interactions virus/cellule, mais il reste encore beaucoup d'inconnues dans la physiopathologie de l'infection au niveau d'un organisme, notamment en raison de l'absence de modèle animal.

Dans le contexte de la transplantation rénale, de nombreux facteurs de risques ont été investigués dans le but d'identifier les patients susceptibles de développer une NBKV. Deux facteurs de risques ont été particulièrement étudiés dans cette thèse : la variabilité de la région régulatrice non codante NCCR du virus et la réponse immunitaire cellulaire spécifique anti-BKPyV en post-greffe.



La région NCCR des *Polyomaviridae* est une région qui peut être caractérisée par un haut degré de variabilité dans certaines situations, puisque l'apparition de variants avec de multiples réarrangements peut être observée notamment chez des patients avec des virémies élevées et des atteintes histologiques importantes (1). Dans le but de caractériser les séquences réarrangées NCCR et d'étudier leur impact sur la réplication virale, nous avons étudié la cinétique d'apparition de ces formes réarrangées sur des cellules épithéliales rénales infectées *in vitro*. Nous avons également étudié la variabilité de la région NCCR dans une cohorte de transplantés de rein du CHU de Nantes.

Le seul moyen efficace de lutter contre le développement de la NBKV est de moduler le traitement immunosuppresseur des transplantés du rein en cas de réactivation virale. La modulation de ce traitement repose donc à ce jour sur le monitoring virologique des patients. La place du monitoring immunologique reste encore à définir. En effet, le rôle et la valeur prédictive de la réponse immunitaire cellulaire spécifique anti-BKPyV reste à ce jour mal comprise dans la réactivation virale post-greffe et le développement éventuel de la NBKV. En ce qui concerne la réponse humorale, un mismatch donneur séropositif/receveur séronégatif a été montré comme étant un facteur de risque d'infection en pédiatrie, mais le rôle protecteur des anticorps sur la réactivation n'est pas très clair. Dans ce contexte, nous avons mené une étude prospective afin de mesurer systématiquement la réponse cellulaire anti-BKPyV trois mois après la transplantation du rein dans une cohorte de patients adultes. L'objectif principal de cette étude était de corrélérer le niveau de la réponse lymphocytaire T-spécifique contre le BKPyV à trois mois post-transplantation avec l'apparition d'une réactivation virale modérée ou sévère. Cette étude nous a également permis d'étudier la cinétique des anticorps anti-BKPyV au cours de la première année post-greffe.

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### A) La famille des *Polyomaviridae*

#### A.1 Historique de découverte

Le premier membre de la famille des *Polyomaviridae* a été découvert en 1953 chez la souris. L'infection par ce polyomavirus murin (mouse Polyomavirus, mPyV) se traduit par l'apparition de tumeurs multiples d'où la dénomination de *Polyomaviridae* (*poly*=plusieurs ; *oma*=tumeurs) (2). Les polyomavirus ont été initialement classés avec les papillomavirus dans la famille des *Papovaviridae* (de rabbit **p**apilloma, mouse **p**olyoma et **v**acuolating virus/SV40). Cependant, les membres de ces deux familles virales se distinguent par la taille de leur capsid (45 nm contre 55 nm), de leur génome (5000 paires de base (pb) contre 8000pb) et une organisation génomique différente. Les deux familles ont donc été séparées suite à une révision de la classification en 1999 (3). Depuis le début des années 2000, plus de 100 nouveaux polyomavirus ont été découverts, que ce soit chez l'homme ou chez différentes espèces animales. L'identification de ces nouveaux polyomavirus a nécessité des adaptations successives de la taxonomie de cette famille virale (4). Le dernier groupe de travail de l'ICTV propose de classer les polyomavirus selon quatre genres, sur la base des séquences codant pour l'antigène T : 3 genres regroupent les polyomavirus qui infectent les mammifères (*Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Deltapolyomavirus*) et le 4<sup>e</sup> genre regroupe les polyomavirus aviaires (*Gammapolyomavirus*) (5). Les polyomavirus sont ainsi caractérisés par un tropisme d'hôte très étroit (**Figure 1**). Il n'y a pas ou peu de franchissement de barrière d'espèce pour les membres de la famille des *Polyomaviridae*. Seul le SV40 (originellement simien) a été retrouvé chez l'homme après injection de vaccin anti polio contaminé.

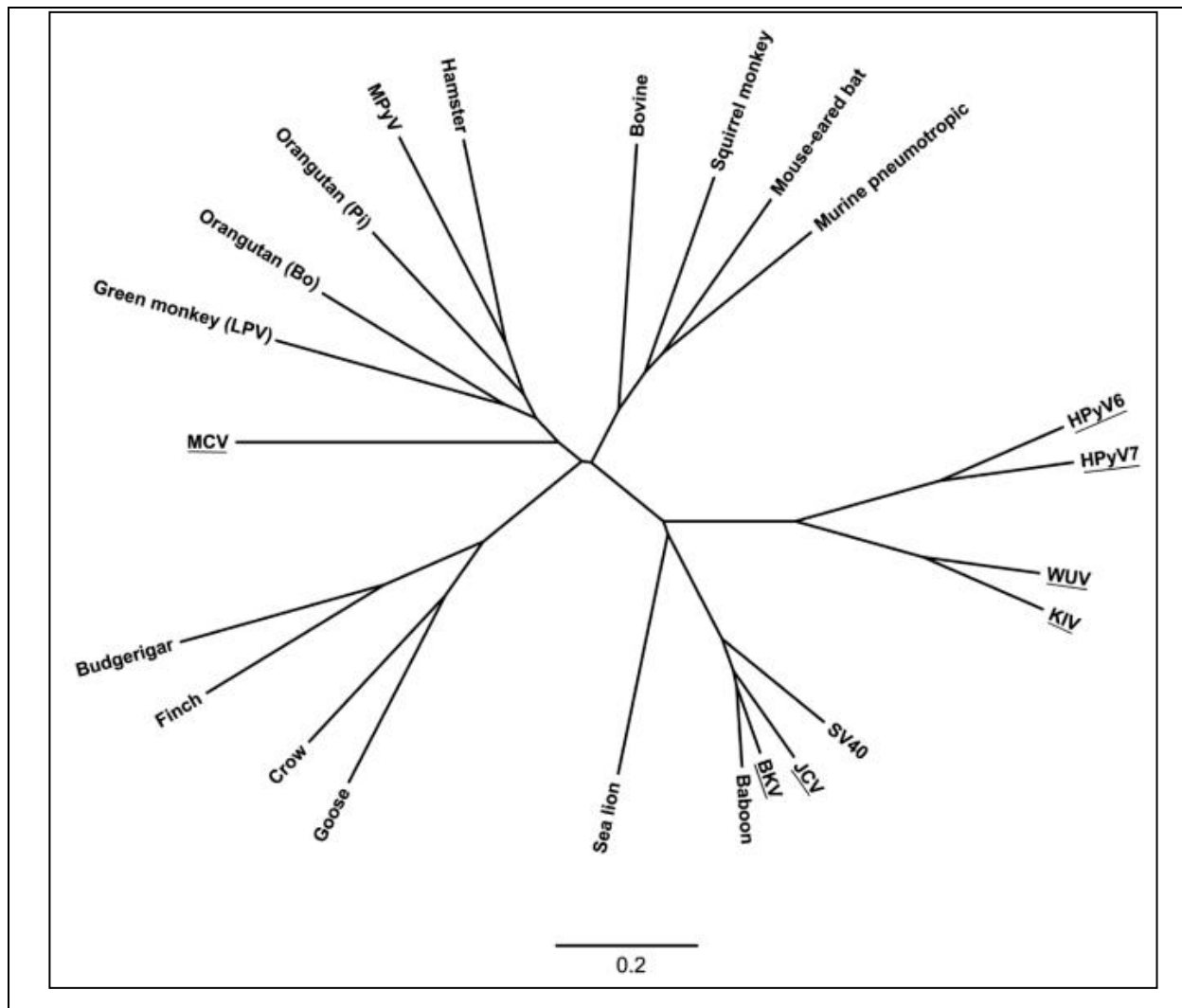


Figure 1: Arbre phylogénétique des principaux Polyomavirus dans le règne animal. La séquence complète des génomes a été utilisée pour construire cet arbre phylogénétique. Les polyomavirus humains sont soulignés. (6)

## A.2 Principaux polyomavirus d'intérêt

### A.2.a Polyomavirus non-humains

#### Le Polyomavirus murin (mPyV)

Le mPyV a été isolé la première fois chez des souris de lignée Ak leucémiques. Afin de prouver que la leucémie était due à un agent infectieux viral, Gross a prélevé et filtré le sang des souris Ak avant de l'injecter à des souriceaux nouveaux né C3H qui ont à leur tour développé une leucémie (7). Les souriceaux C3H injectés ont développé de multiples tumeurs

dont des sarcomes des glandes salivaires, des sarcomes sous-cutanés et des carcinomes des glandes mammaires supposant un caractère oncogène au mPyV (2).

Le mPyV est considéré comme un modèle expérimental de référence des polyomavirus. En effet, le spectre d'hôte étroit des *Polyomaviridae* implique une limite *de facto* à l'utilisation de modèle animal pour l'étude des polyomavirus humains. Cependant les progrès en génie génétique chez la souris ont permis de pallier ce problème en mettant à disposition des souris immunodéprimées et/ou humanisées. Ce modèle a permis de mettre en évidence les mécanismes oncogéniques des *Polyomaviridae* ainsi que le comportement du système immunitaire de l'hôte infecté tel que le rôle des lymphocytes  $\gamma\delta$ , des cellules NK ou des réponses adaptatives médiées par les lymphocytes T CD4 et T CD8 (8,9).

### Le simian virus 40 (SV40)

Le SV40 ou simian virus 40 (autrefois appelé le vacuolating virus) infecte naturellement le singe rhésus macaque et persiste sous forme latente dans le rein de l'animal infecté. Chez le singe, c'est un virus asymptomatique sauf en cas d'immunodépression (coinfection avec le SIV(Simian Immunodeficiency Virus)) (10).

Il a été découvert en 1960 comme contaminant de vaccins anti-poliovirus produit sur des cellules de rein de singe (11).

Le SV40 est un virus modèle et a permis de grandes avancées dans le domaine de la biologie moléculaire (12). Il a permis, entre autres, d'identifier les signaux de localisations nucléaires des protéines (13) ainsi que l'identification des éléments enhancers (14,15). De plus il a confirmé l'existence de l'épissage des ARN (14) qui avait été montré en 1977 chez les adénovirus (16). Enfin, le SV40 a permis de mettre en évidence le rôle de la protéine pro-oncogène P53 dans le développement des cancers humains. (17)

Il est intéressant de remarquer que les *Polyomavirus* semblent co-évoluer avec leurs hôtes respectifs. On peut ainsi retrouver pour la plupart des virus simiens, un virus humain avec une forte homologie de séquence (**Figure 2**).

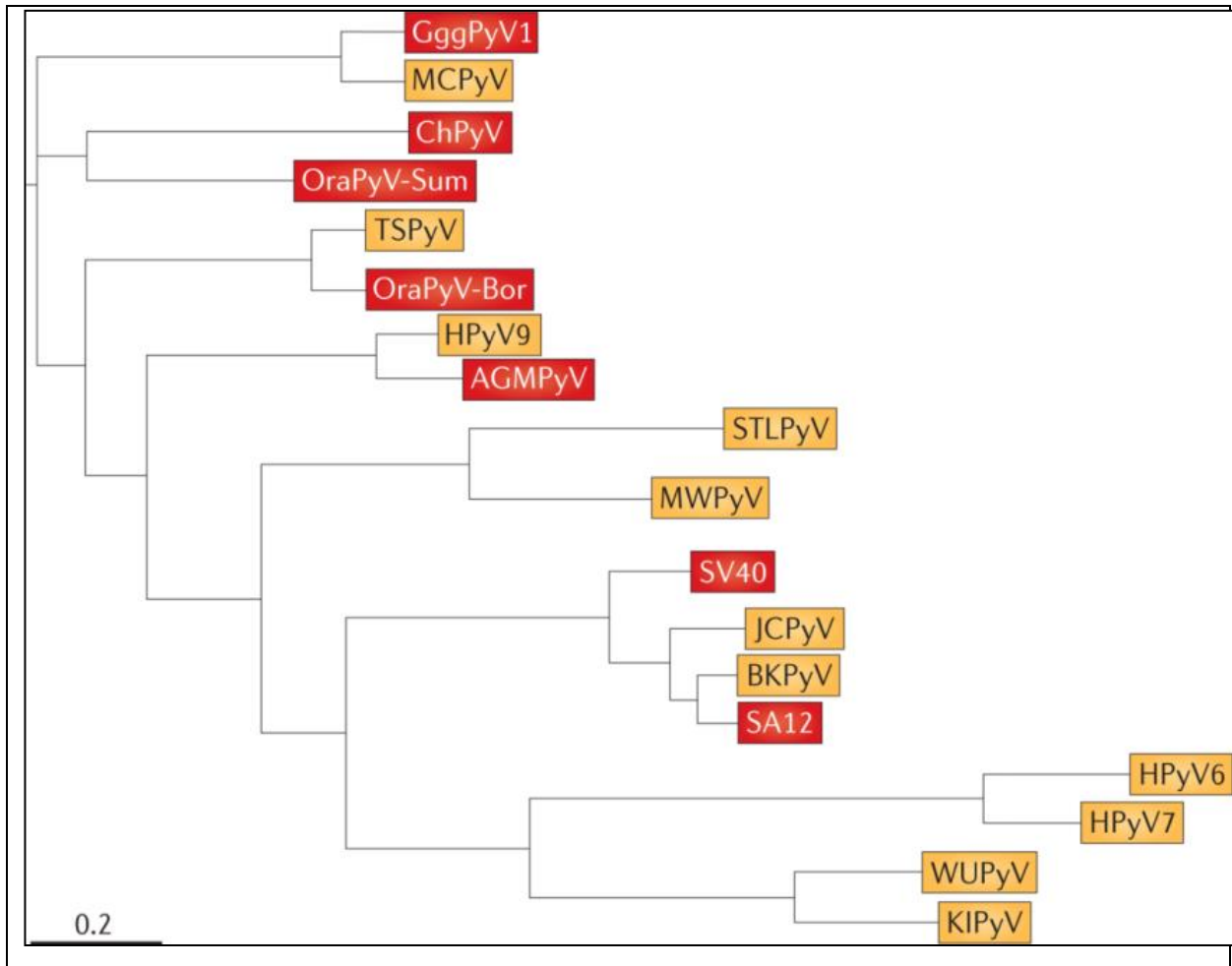


Figure 2 Arbre phylogénétique des Polyomavirus simiens et humains. Les Polyomavirus simiens sont représentés en rouge et les humains en orange. (18)

### ***A.2.b Polyomavirus humains***

A l'heure actuelle, on dénombre 13 *Polyomavirus* humains (**Tableau I**) dont la plupart ne semble pas avoir d'effets pathogènes.

#### Le BK *Polyomavirus* (BKPyV) et le JC *Polyomavirus* (JCPyV)

Le BKPyV et le JCPyV sont les deux représentants majeurs de la famille des *Polyomaviridae* chez l'homme. Ils ont été dénommés ainsi d'après les initiales des patients chez qui ils ont été isolés pour la première fois.

Le JCPyV a été isolé dans une biopsie cérébrale chez un patient présentant une Leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) dans le cadre d'un lymphome de Hodgkin (19). Le BKPyV quant à lui a été isolé chez un patient présentant une sténose urétérale (20).

Ce sont tous les deux des virus opportunistes, associés à des pathologies dans un contexte d'immunodépression cellulaire (SIDA, transplantation, leucémie)

#### Virus du carcinome de Merkel (MCPyV)

Le virus du carcinome à cellules de Merkel (MCPyV) est le seul *Polyomavirus* humain pour lequel le pouvoir oncogène est avéré. Il est associé à des tumeurs cutanées neuroendocrines agressives, appelées carcinomes de Merkel (21).

#### Trichodysplasia Spinulosa polyomavirus (TSPyV)

Avec le BKPyV, le JCPyV et le MCPyV, un seul autre *Polyomavirus* humain démontre un pouvoir pathogène certifié: le Trichodysplasia Spinulosa associated *Polyomavirus* (TSPyV). Il est retrouvé au sein des follicules pileux de la région nasale chez les patients sévèrement immunodéprimés (22).

#### Autres *Polyomavirus* humains

Des recherches systématiques ont permis d'isoler d'autres *Polyomavirus* humain au niveau du tractus respiratoire : KIPyV (23) et WUPyV (24), de la peau : Human

*Polyomavirus* 6 et 7 (HPyV6 et HPyV7) (6), des urines : HPyV9 (25), des selles : Malawi *Polyomavirus* (MWPyV) (26) et Saint Louis *Polyomavirus* (STPyV) (27) du tractus digestif : HPy12 (28) ou des cellules endothéliales (29). A l'heure actuelle, aucun de ces nouveaux *Polyomavirus* n'a été associé avec un quelconque potentiel pathogène.

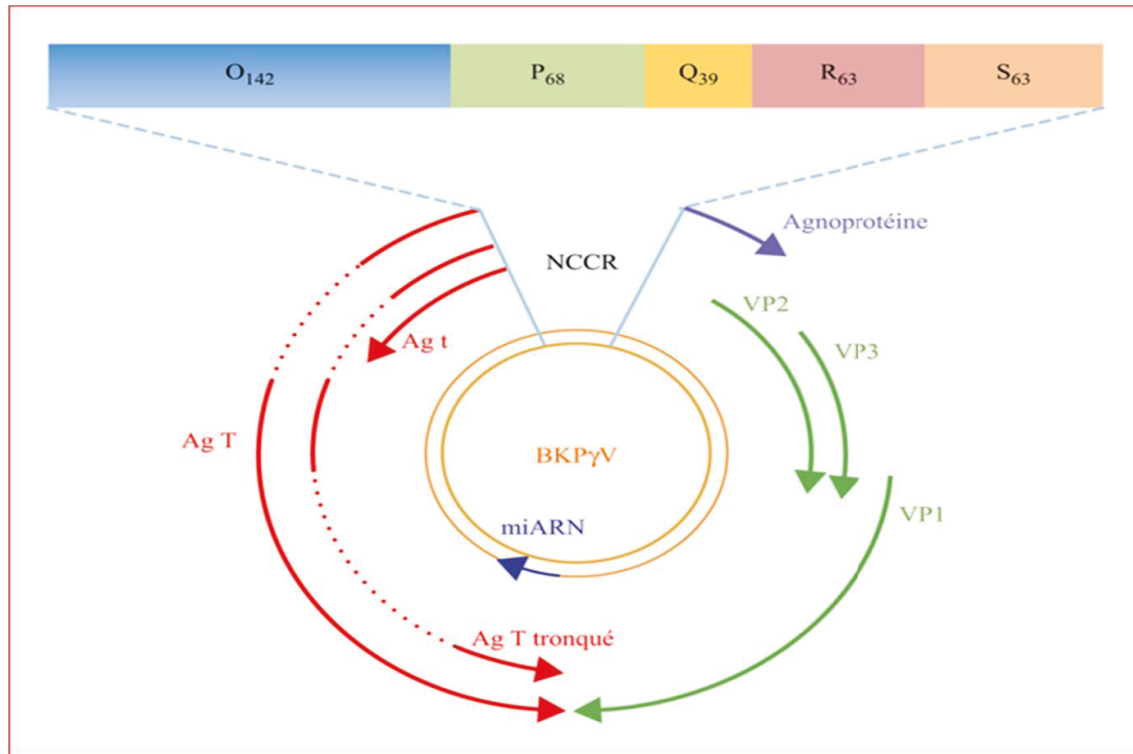
**Tableau I : Les Polyomavirus humains**

Nom	Abbréviation	Pouvoir pathogène	Compartiment biologique d'identification	Référence
Polyomavirus BK	BKPyV	Néphropathie tubulo-interstitielle, cystite hémorragique, sténose urétérale	Tissu rénal, urines	Gardner et al., 1971
Polyomavirus JC	JCPyV	Leucoencéphalite multifocale progressive (LEMP)	Liquide céphalo-rachidien	Padget et al., 1971
Polyomavirus KI	KIPyV	?	Sécrétions respiratoires	Allender et al., 2007
Polyomavirus WU	WUPyV	?	Sécrétions respiratoires	Gaynor et al., 2008
Merkel Cell polyomavirus	MCPyV	Carcinome à cellules de Merkel	Peau	Feng et al., 2008
Human polyomavirus 6	HPyV6	?	Peau	Schoawalter et al., 2010
Human polyomavirus 7	HPyV7	?	Peau	Schoawalter et al., 2010
Trichodysplasia spinulosa-associated Polyomavirus	TSPyV	Trichodysplasia Spinulosa	Peau	Van der Meijden et al., 2010
Human polyomavirus 9	HPyV9	?	Urines	Scuda et al., 2011
Malawi polyomavirus	MWPyV	?	Selles	Siebrasse et al., 2012
Saint Louis polyomavirus	STLPyV	?	Selles	Lim et al., 2013
Human polyomavirus 12	HPyV12	?	Tractus digestif	Korup et al., 2013
New Jersey PyV	NJPyV	Myositis	Cellules endothéliales (biopsie musculaire)	Mishra et al., 2014

## B- Le polyomavirus BK : caractéristiques virologiques, épidémiologie, pouvoir pathogène

### B.1-Structure de la particule virale

#### B.1.a Le génome viral



**Figure 3 :** Représentation schématique du génome du BKPyV. La molécule d'ADN double brin circulaire est organisée en trois régions : précoce (AgT, Agt, AgT tronqué), tardive (agnoprotéine, VP1, VP2, VP3) et région régulatrice non codante (NCCR). Les parties pleines des flèches représentent les exons, les parties pointillées les introns. Le miARN est transcrit à partir du brin tardif. L'organisation de la forme archétype de la région NCCR est représentée sous la forme de blocs de séquences OPQRS avec le nombre de paires de base pour chacun d'entre eux.

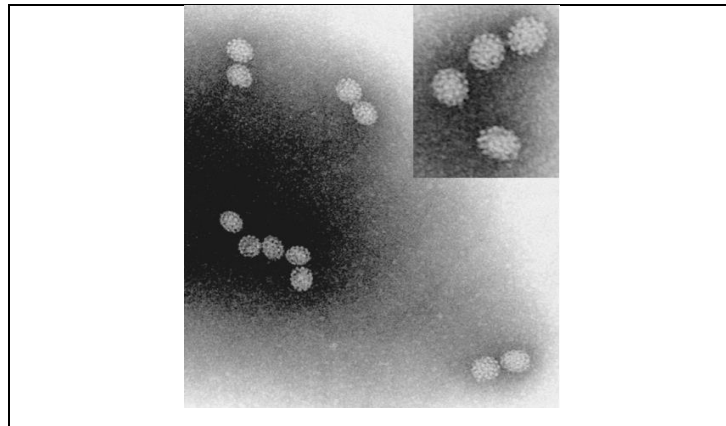
Le génome viral est une molécule d'ADN bicaténaire circulaire super-enroulée associée aux protéines histones cellulaires H2A, H2B, H3 et H4, l'ensemble formant un mini chromosome. Le génome viral est organisé de façon à contenir le maximum d'informations dans un minimum d'espace (5 Kb), par un mécanisme d'épissage alternatif. Il est divisé en trois régions : une région régulatrice non codante (NCCR pour *Non Coding Control Region*), et les deux régions codantes précoce (Antigène T, antigène t, antigène T tronqué) et tardive



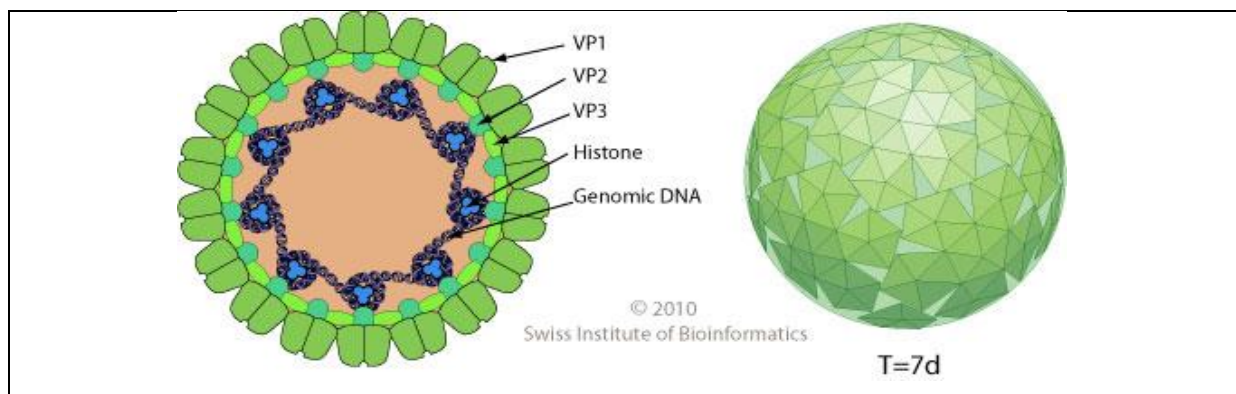
(agnoprotéine, VP1, VP2, VP3), chacune transcrite à partir de la région NCCR dans deux directions opposées (**figure 3**) (30).

### ***B.1.b La capsid virale***

Comme tous les *Polyomavirus*, le BKPyV est un virus nu à capsid icosaédrique constitué de 72 capsomères et observable au microscope électronique (**Figure 4**). Un capsomère comprend l'association d'un pentamère de la protéine majeure de capsid VP1 associé à l'une des deux protéines mineures de capsid VP2 ou VP3 (**figure 5**). Bien que l'association capsidique se constitue en pentamère, le nombre de triangulation est de  $T=7$  avec des pentamères occupant des espaces hexamériques. La particule virale mesure 45 nm de diamètre (31).



**Figure 4** Particule du BKPyV observées dans un échantillon d'urine par microscopie électronique (grossissement 152000x et 800000x) (32)



**Figure 5** : Représentation schématique de la structure d'un Polyomavirus (Viralzone Swiss Institute of Bioinformatics 2010)

La protéine VP1 est la protéine majeure de capsid. C'est son interaction avec les récepteurs gangliosidiques de la cellule cible qui va permettre l'entrée du virus dans cette dernière.

Il existe une variabilité génétique du gène VP1 qui sert de base pour classer les souches de BKPyV en 4 génotypes (I, II, III et IV) et pour certains d'entre eux en sous-génotypes (Ia, Ib...) (**figure 6**). Le génotype I est le plus fréquemment retrouvé dans le monde. Le sous type IV a une distribution principalement européenne et est-asiatique. Les sous types II et III sont minoritaires. Le polymorphisme de VP1 est localisé notamment au niveau d'un épitope immuno-dominant et permet de considérer ces groupes comme des sérotypes. Cet épitope se trouve dans la partie N-terminale de VP1 (aa 61-82) servant de reconnaissance avec les récepteurs cellulaires (gangliosides).

La co-infection d'un même patient par plusieurs génotypes est possible et a été décrite chez des patients immunodéprimés, mais également chez des donneurs sains non immunodéprimés (33).

D'après les études effectuées sur le SV40, les protéines mineures de capsides VP2 et VP3 ont deux fonctions lors du cycle d'infection :

- Elles ne sont pas indispensables à l'entrée du virus (34) mais en stabilisant le virion à la surface externe de la cellule elles augmentent le temps de contact entre VP1 et les récepteurs gangliosidiques, favorisant l'internalisation de la particule virale (35).

- La phase critique pour laquelle elles sont essentielles est l'entrée dans le noyau. En effet, VP2 et VP3 contiennent le site de localisation nucléaire qui est reconnu par l'importine  $\alpha\beta$  cellulaire pour le passage du pore nucléaire (34).

Les différences dans les séquences des protéines VP2 et VP3 n'ont pas d'impact sur la pathogénicité des protéines virales. Des arbres phylogénétiques ont été construits en fonction de ces deux gènes et les différences observées correspondent aux groupes mis en évidence pour VP1

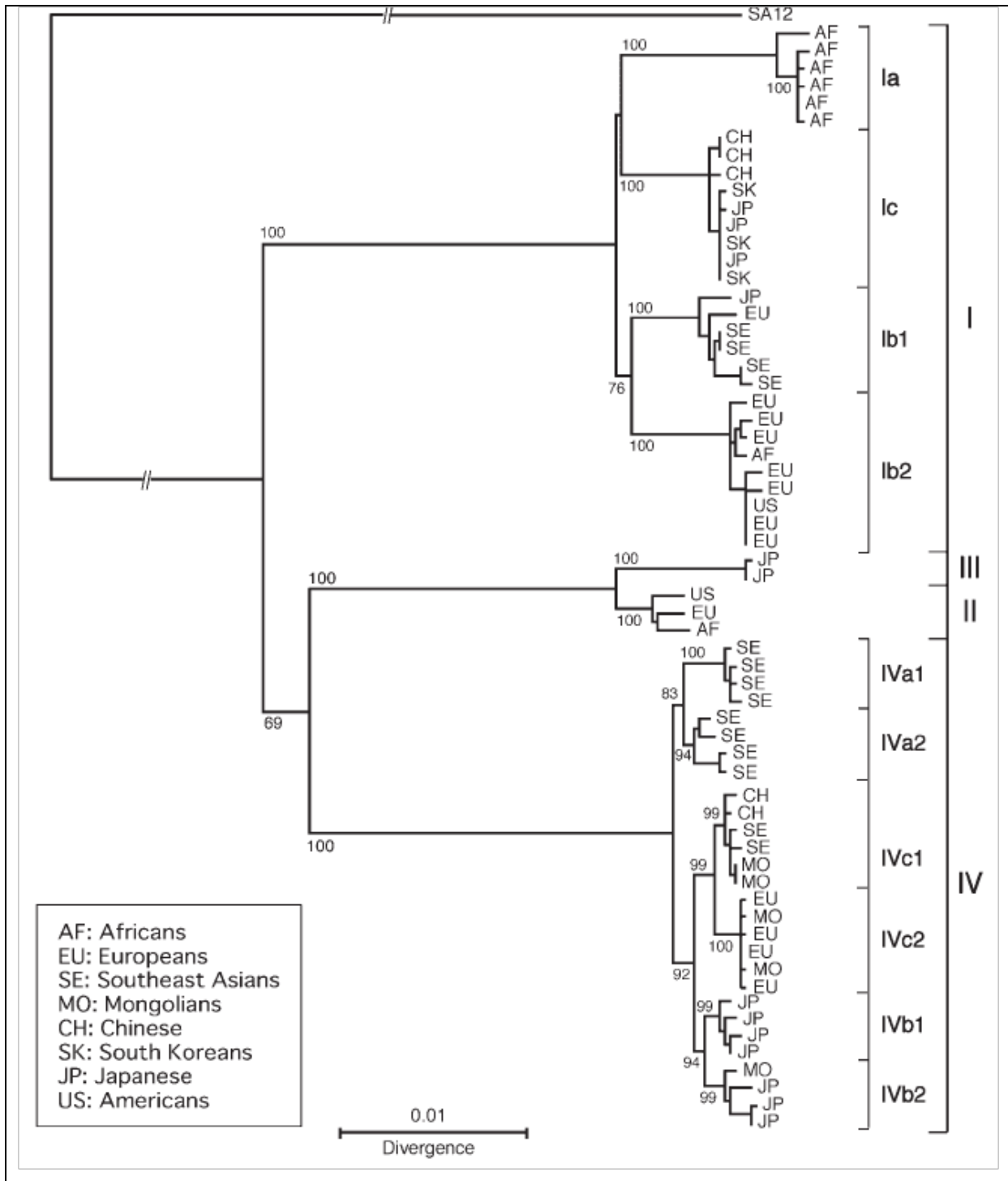


Figure 6 Arbre phylogénétique basé sur le génome complet du BK virus hormis la région régulatrice non codante par la méthode du Neighbor Joining (36). Les différents génotypes sont répartis différemment selon l'origine géographique. Le génotype I a une répartition mondiale, le IV est situé principalement en Europe et en Asie de l'Est. Les génotypes II et III restent très minoritaire.

## **B.2-Interactions virus-cellule**

### ***B.2.a Entrée-décapsidation***

La première étape du cycle d'infection du BKPyV est l'attachement de la capsid (par VP1) à des récepteurs membranaires de types gangliosidiques GD1b et GD1d qui contiennent un résidu terminal d'acide sialique de type  $\alpha 2-8$  (Figure 8-1). La structure tridimensionnelle du complexe VP1-ganglioside décrite par Neu *et al* (37) a permis de mettre en évidence l'attachement de VP1 à d'autres récepteurs gangliosidiques GD2 et GD3.

L'internalisation de la particule virale passe par la voie d'endocytose médiée par les *caveolae* (Figure 8-2). Les cavéoles sont des petites invaginations de la membrane plasmique riches en cholestérol et dépendantes des cavéolines (38) (39).

Le virion est ensuite transporté par le réseau de microtubules jusqu'au réticulum endoplasmique (40) (41) (Figure 8-3). Le transport du virion jusqu'au noyau est encore mal connu mais il a été montré qu'il est dépendant du réseau de microtubules puis suit la voie rétrograde à travers le réticulum endoplasmique (RE). Le passage dans le RE a été investigué pour le SV40 et le MPyV et permet une décapsidation partielle du virion avant l'atteinte du noyau qui favoriserait le passage par le pore nucléaire (Figure 8-4). Les protéines mineures de capsides VP2 et VP3 sont indispensables à cette étape, en effet des pseudos virions constitués uniquement de VP1 sont incapables de poursuivre leur route vers le noyau.

L'entrée dans le noyau se fait vraisemblablement par le pore nucléaire (Figure 8-5). La taille du virion est à l'origine trop importante pour le pore nucléaire (45nm), mais la décapsidation partielle du virus lui permet de traverser avec une taille inférieure à 39 nm. Un autre argument allant dans le sens de la décapsidation partielle est que les signaux de localisation nucléaire portés par VP2 et VP3 sont inaccessibles à l'importine  $\alpha 2\beta$  pour un virion intact.

### ***B.2.b Réplication et transcription des gènes viraux***

L'expression des gènes viraux est séquentielle. Les gènes de la région précoce AgT et Agt sont transcrits en premiers, suivie de l'étape de la réplication virale et enfin la transcription des gènes tardifs (Agnoprotéine, VP1, VP2 et VP3).

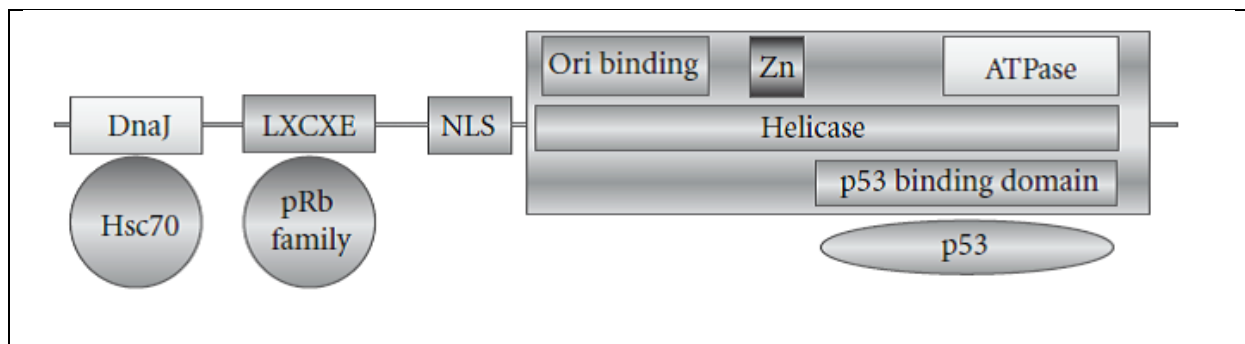
### Transcription des gènes précoces

Le promoteur de l'expression des gènes précoces, situé dans la région NCCR, est reconnu par l'ARN polymérase II de l'hôte. Deux ARNm distincts (AgT et Agt) sont transcrits par épissage alternatif d'un ARN pré-messager. Ces deux ARNm secondaires sont exportés vers le cytoplasme ou ils seront traduits (Figure 8-6). Cette phase de transcription des gènes précoces est autorégulée par l'AgT en se liant aux résidus pentamériques du bloc O de la région NCCR.

### L'antigène grand T (AgT)

L'antigène grand T (AgT) est une protéine de régulation du cycle viral de 695 acides aminés. Elle subit de nombreuses modifications post-traductionnelles (O-glycosylation, adénylation, phosphorylation...).

L'organisation de la protéine AgT des polyomavirus est divisée en cinq principales régions (42) (**figure 7**). La première est un homologue du domaine J des molécules chaperonnes de l'ADN (Hsc70), elle joue un rôle dans la transcription des gènes viraux, la réplication virale et l'assemblage des néo-virions. La deuxième est le motif LXCXE, qui va lier et inactiver les membres de la famille de la protéine Rb. La troisième région consiste au signal de localisation nucléaire (NLS). Enfin les deux dernières régions comprennent respectivement un domaine hélicase et un domaine de liaison à p53. L'association de l'AgT à p53 a pour conséquence d'induire l'entrée de la cellule en phase S du cycle cellulaire nécessaire à la réplication virale (43) (44)



**Figure 7 : Structure de l'AgT des Polyomavirus. Les domaines fonctionnels sont définis comme suit : DnaJ qui lie la molécule chaperonne cellulaire Hsc70, motif LXCXE qui lie les protéines de la famille pRb, le domaine NLS, le domaine hélicase et le domaine liant p53 la protéine suppresseur de tumeur. (42)**

L'AgT a un rôle central dans la réplication et la transcription virale, c'est donc un gène qui semble peu sujet à une variabilité génétique. Cependant des mutations ponctuelles ont été décrites, et bien que leur présence ne démontre pas formellement une association avec une pathogénicité plus grave, le parallèle avec le SV40 permet de les relier à une réplication virale plus importante : Une première étude a noté la présence d'une mutation ponctuelle dans la souche BKV Cin chez un patient au stade SIDA présentant une pathologie rénale avancée. Cette mutation Q169L se situe au niveau de domaine de jonction de l'antigène grand T et permettrait une stabilisation de l'attachement de l'AgT à l'ADN induisant une réplication virale plus importante (45). Une autre étude de 2004 (46) a révélé l'existence de multiples mutations ponctuelles chez des patient BKV positifs, notamment I127T et S260N par rapport à la souche de référence Dunlop. D'autres mutations ponctuelles en position d'acides aminés 20, 28, 133, 148, et 267 sont également décrites mais l'impact de ces mutations sur le cycle du BKV n'a pas été investigué.

#### L'antigène « petit » t (Agt)

L'antigène petit t est une protéine accessoire de régulation de 172 acides aminés et est issu de l'épissage alternatif d'un ARN pré messager commun de l'antigène grand T. Les 82 aa de la partie N-terminale de l'Agt sont donc identiques à ceux de l'AgT.

Le rôle de l'Agt est peu investigué dans la littérature en comparaison de l'AgT. La seule fonction décrite est l'association à la phospho-protéase 2A (PP2A) sur sa partie C-terminale. Le complexe va inactiver les protéines kinases MEK 1 et ERK1 et conduit à terme à une up-régulation des cyclines D1 et une down-régulation de la protéine p27, deux facteurs favorisant la progression du cycle cellulaire.

Des mutations ponctuelles ont également été retrouvées dans le gène Agt *in vivo* mais aucune n'est associée à un quelconque rôle dans le cycle cellulaire

#### L'antigène T tronqué (truncAgT)

L'antigène T tronqué est codé par l'épissage alternatif de l'ARN pré messager du BKPyV. Il est constitué de 136 acides aminés dont les 133 premiers sont identiques à ceux de l'AgT. (47). Aucune étude sur son rôle dans le cycle viral n'a été menée, mais par analogie

avec l'antigène tronqué du SV40, on pourrait supposer qu'il dérégule le cycle cellulaire en se liant à l'ubiquitine ligase E3 (protéine clé dans le cycle cellulaire médiant la dégradation des cyclines) (48)

### Micro ARN viraux (miRNA)

Les miRNA sont des petits ARN (21-24 bases) régulateurs post-transcriptionnels d'un gène. En s'appariant par reconnaissance d'une séquence complémentaire à un ARNm, ils provoquent un blocage de la traduction en protéine et à terme la dégradation de l'ARNm cible.

Le BKPyV, comme d'autres polyomavirus, code pour deux miARN viraux. Le pré-miRNA est transcrit à partir du brin tardif dans une zone complémentaire à l'extrémité de la région précoce, commune à l'AgT et l'Agt (49). Deux miRNA sont issus du pré-miRNA, le miRNA 3p et le miRNA 5p (50). Leur séquence est strictement identique à celle des miRNA du JCPyV et exactement complémentaires de leur séquence cible, ce qui entraîne la dégradation de l'ARNm précoce. L'équipe de Broekema a montré que l'expression des miRNA 3p et 5p est sous le contrôle de séquences situées dans la région NCCR et corrélée avec le niveau d'expression des gènes tardifs (51). La même étude montre que ces miARN régulent l'expression des gènes précoces avant le début de la réplication génomique virale. Ils constituent donc un mécanisme d'autorégulation. De plus, cette régulation est observée sur les formes archétypes, mais pas les formes réarrangées. Puisque les formes archétypes sont celles qui circulent et sont transmises dans la population, les auteurs suggèrent que ces miRNA puissent avoir un rôle dans les mécanismes de persistance virale.

### La réplication virale

L'AgT va stimuler l'entrée de la cellule infectée dans le cycle cellulaire en se fixant sur les protéines « suppresseur de tumeurs » pRB et p53. L'interaction avec RB influe sur la localisation des facteurs de la famille E2F qui active la transcription des gènes cellulaires impliqués dans l'entrée en phase S (43) (44).

L'AgT se fixe sur l'origine de réplication ori, s'assemble en double hexamère et recrute la protéine de réplication (RPA) dont l'action permet de dérouler les deux brins de l'ADN viral et de former un site d'initiation de réplication reconnu par le complexe

polymérase  $\alpha$ /primase de la cellule hôte (52) (53) (Figure 8-7). La progression de la fourche de réplication est bidirectionnelle et requiert les activités ATPase et hélicase de l'AgT. En fin de réplication, la séparation des deux molécules néo-synthétisées est assurée par la topoisomérase II.

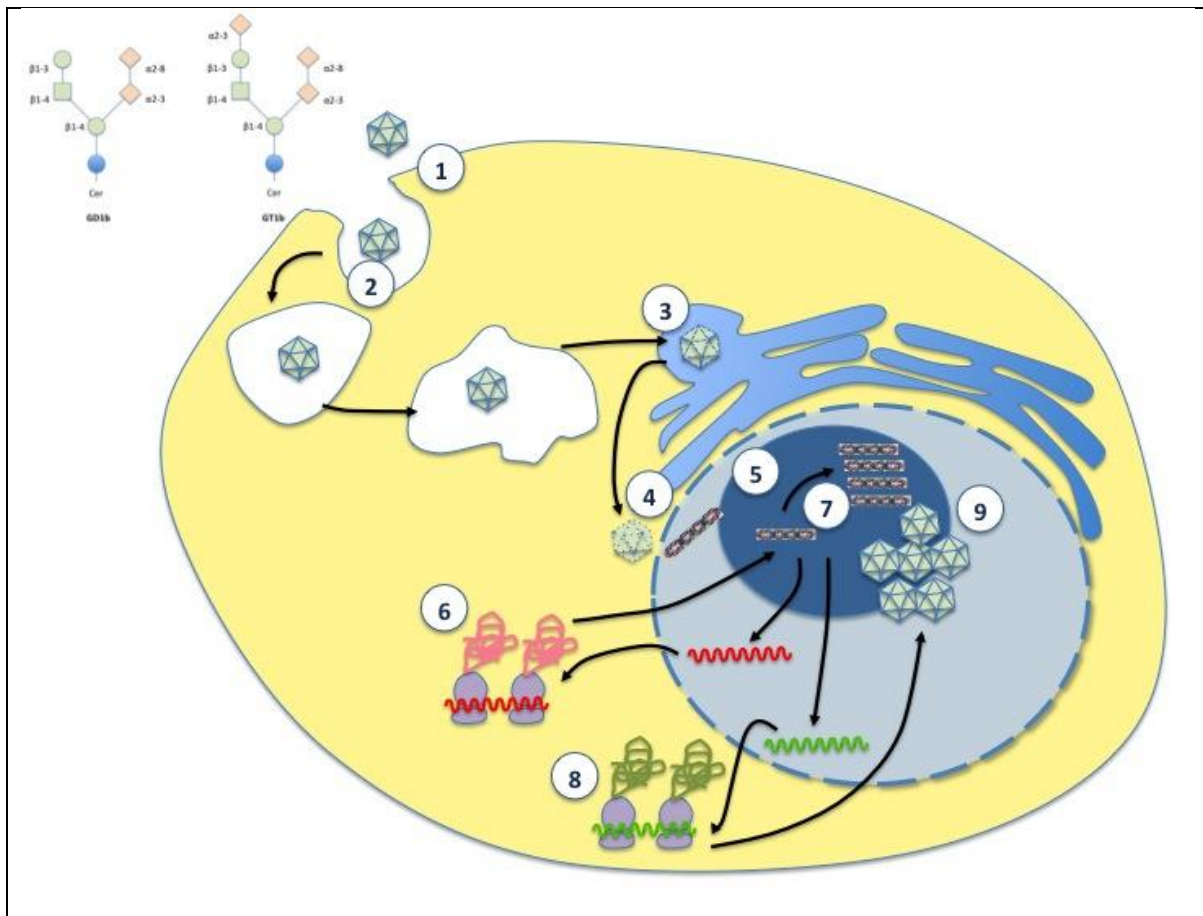
### Transcription des gènes tardifs

La transcription des gènes tardifs se déroule en même temps que la réplication virale et est initiée au niveau du bloc S de la région NCCR. Deux ARNm sont transcrits, le 16S (traduit en VP1) et le 19 S (traduit en VP2 et VP3) (Figure 8-8). Les protéines de capsides nouvellement formées contiennent une séquence de localisation nucléaire (amino-terminale pour VP1 et carboxy-terminale pour VP2 et VP3) et sont donc importées dans le noyau pour l'assemblage de nouveaux virions.

### L'agnoprotéine

L'agnoprotéine est une protéine non structurale de 66 acides aminés dont le rôle lors des infections à *Polyomavirus* commence à être mieux compris. En effet de récentes publications ont mis en évidence son rôle dans la régulation de la transcription des protéines tardives, la maturation et l'assemblage des particules virales et l'exocytose. (54) (55) (56).





**Figure 8 : Cycle de multiplication du polyomavirus BK**

1. Attachement au récepteur cellulaire. 2 Internalisation par endocytose médiée par la voie des cavéolines. 3. Transfert du cavéosome vers le réticulum endoplasmique. 4. Décapsidation partielle et transfert du RE vers le cytoplasme. 5. Migration du génome viral au travers du pore nucléaire. Dans le noyau, zones de réplication associant génome viral et éléments cellulaires PMB, DDR). 6. Première vague de transcription : gènes précoces. L'ag t et l'Ag T retournent dans le noyau pour s'associer au génome viral et aux éléments cellulaires nécessaires à la réplication du génome viral. 7. Réplication génomique virale. 8. Deuxième vague de transcription : gènes tardifs. 9. Assemblage des capsides autour des nouvelles molécules d'ADN double brin néoformées

### Formation des virions

L'assemblage des nouvelles particules virales est peu documenté dans la littérature. On sait cependant que la particule virale nécessite la combinaison des trois protéines de capsides avec l'incorporation d'un génome néo-synthétisé et d'histones cellulaires (Figure 8-9).

Néanmoins, il a été prouvé que des particules virales peuvent incorporer des petits ADN cellulaires et également se former spontanément sans matériel génétique.

L'agnoprotéine semble avoir un rôle dans l'assemblage des particules virales puisque les mutants délétés dans des études *in vitro* sont incapable de sortir du noyau et il n'y a pas de production de particules virales infectieuses (55) (57) (58).

L'accumulation de néo-virions est responsable d'une importante pression sur les membranes, dans un premier temps nucléaire, puis plasmatique et va provoquer la rupture de ces dernières. Les virus sont alors relargués par la lyse de la cellule hôte dans le milieu extra cellulaire.

### ***B.2.c BKPyV et cycle cellulaire***

Tout au long du cycle cellulaire, les polyomavirus influent sur leur cellule hôte, notamment sur le cycle cellulaire de cette dernière. En effet, le génome des polyomavirus ne contenant pas de séquence codant pour une ADN polymérase, il utilise la machinerie de réplication cellulaire. Pour faciliter la réplication virale et l'accès aux polymérases cellulaires, le virus va contraindre la cellule à rester en phase S du cycle cellulaire.

Brièvement, dans un état physiologique, le cycle cellulaire correspond à la duplication du matériel génétique dans le but de former deux nouvelles cellules (cellules filles) à partir d'une cellule progénitrice (cellule mère) par mitose. Le cycle est constitué de 5 phases : G0 (phase quiescente), G1 (phase de préparation à la réplication), S (phase de réplication de l'ADN), G2 (phase de préparation à la mitose) et M (phase de mitose). Le cycle cellulaire est hautement régulé et contrôlé et les acteurs majeurs de sa mise en œuvre sont les complexes Cycline-Cdk (pour cycline-dépendant kinase).

Les protéines précoces des Polyomavirus ont un impact sur le déroulement normal du cycle cellulaire en le bloquant en phase S de réplication. L'AgT va notamment interagir avec les protéines p53 et pRB (des protéines suppresseurs de tumeurs). L'attachement de l'AgT avec pRB inhibe la fonction de cette dernière qui est de séquestrer le facteur de transcription E2F et de maintenir le cycle cellulaire en phase G1. Le rôle de p53 dans le cycle cellulaire, est entre autre d'arrêter le cycle en phase G1 en raison de mutation du matériel génétique. Ces

deux interactions permettent donc aux cellules infectées de passer outre leur physiologie naturelle et les force à rester en phase S du cycle cellulaire.

#### ***B.2.d BKPyV et DNA damage response***

Un autre effet des infections à polyomavirus sur la cellule hôte est l'utilisation du mécanisme du « DNA damage response » (DDR) qui survient en cas d'altération du matériel génomique et qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire, à une modification de la chromatine ainsi qu'à la réparation de l'ADN endommagé. De nombreux polyomavirus (MPyV, JCPyV...) influent sur les voies de DDR pour se répliquer plus efficacement en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire et en empêchant la réparation de l'ADN pour qu'il puisse se poursuivre. Jiang et al (59), ont montré que les protéines régulant le mécanisme de DDR, ataxia telangiectasia mutated (ATM) et ATM Rad-3-related (ATR), sont impliquées dans une boucle d'activation avec le BKPyV. En effet, les auteurs ont montré que l'infection *in vitro* du BKPyV active les mécanismes de DDR médiés par ATM et que cette dernière influe à son tour sur la réplication du BKPyV. En outre, ATM et ATR maintiennent des niveaux de « check point protéine kinase » (Chk), lors du changement de phases du cycle cellulaire. Leur présence empêche le cycle cellulaire de passer en phase M et permet donc au BKPyV de se répliquer sans restriction.

#### ***B.2.d BKPyV et pouvoir oncogène***

L'interaction des protéines précoces avec des gènes suppresseurs de tumeur confère un pouvoir oncogène théorique au BKPyV. La présence du BKPyV dans des tissus cancéreux a été régulièrement recherchée par PCR (Poly Chain Reaction) ou hybridation *in situ*. Bien que le génome viral ait pu être retrouvé dans des tumeurs, les résultats restent controversés (60). Le BKPyV est par exemple fréquemment détecté dans le tissu prostatique, et de façon plus fréquente encore dans les tumeurs de prostate. Certains auteurs suggèrent que le BKPyV, notamment par l'action des Ag T et Ag t, pourrait être un facteur de progression de la maladie aux stades précoces (61). Le pouvoir oncogène des protéines virales précoces a été montré *in vitro*, conséquence d'une infection abortive s'arrêtant au stade précoce du cycle de multiplication. De plus, l'infection de rongeurs par le BKPyV entraîne chez les animaux la formation de différents types de tumeurs (62). À ce jour, aucun argument formel ne permet de

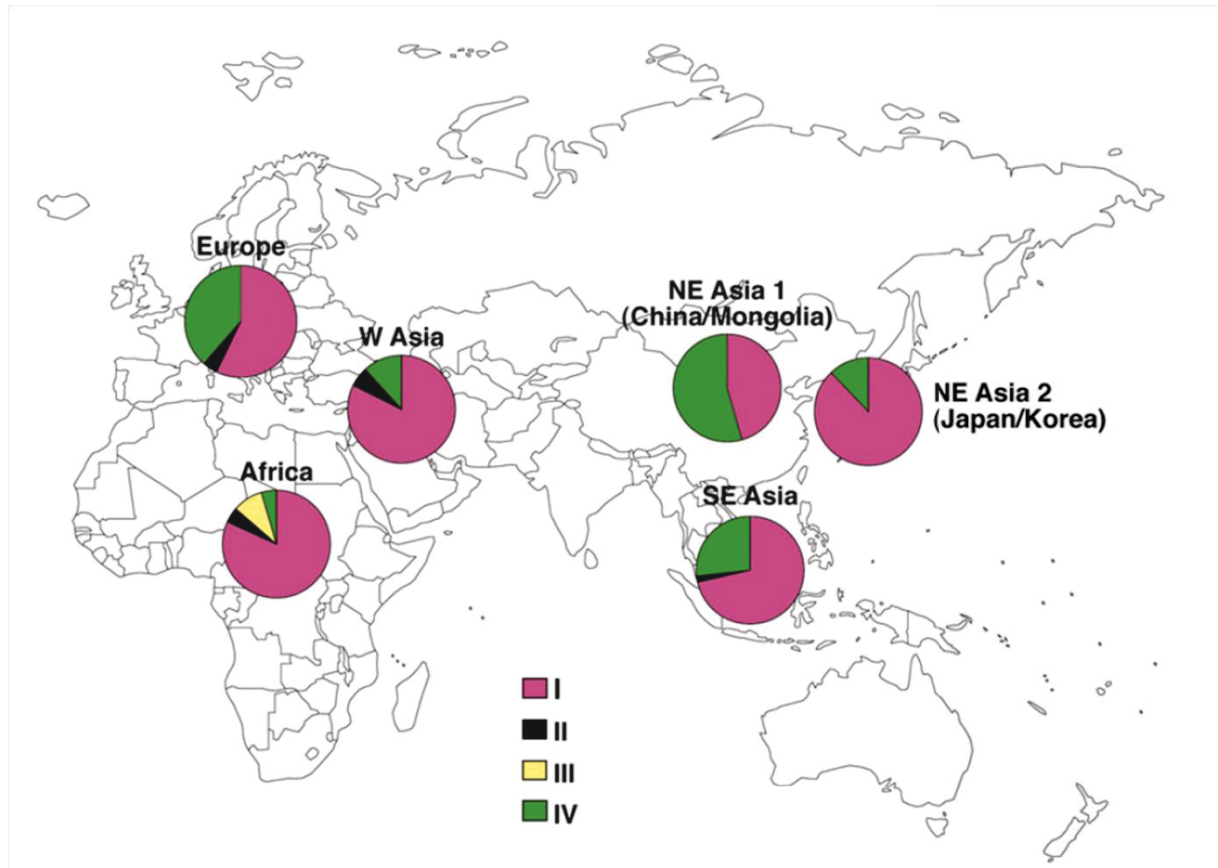
conclure que BKPyV soit impliqué dans des processus cancéreux chez son hôte naturel, l'homme. Cependant, le BKPyV et le JCPyV sont pour l'instant classés comme «carcinogènes possibles pour l'homme par l'agence internationale de recherche contre le cancer (63).

### **B.3 Épidémiologie, transmission**

#### *B.3.a Données épidémiologiques*

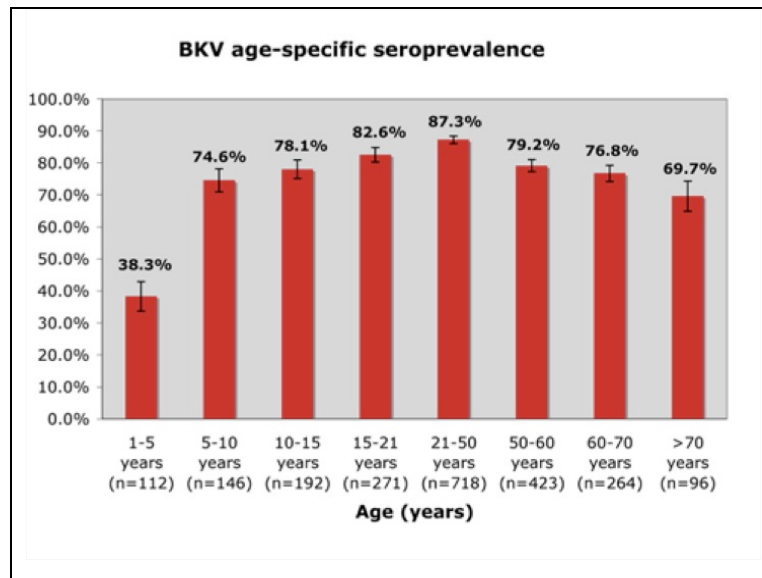
Le BKPyV est un virus strictement humain, ubiquitaire et endémique. Les quatre génotypes, basés sur la séquence du gène de la protéine de capsid VP1, ont une répartition géographique particulière (**Figure 9**). Le génotype I est prédominant et présent sur les cinq continents. Le génotype IV a une répartition principalement européenne et est-asiatique. Enfin, les génotypes II et III sont minoritaires et retrouvés ponctuellement dans des isolats de patients à travers le monde.

Le génotype I est divisé en quatre sous-groupes (Ia, Ib-1, Ib-2 et Ic) avec une répartition géographique propre à chacun d'entre eux. Le sous-groupe Ia est prédominant en Afrique, Ib-1 en Asie du Sud-Est, Ib-2 en Europe et Ic en Asie du Nord-Est (64). De la même manière le génotype IV est subdivisé en six sous-groupes (IVa-1, IVa-2, IVb-1, IVb-2, IVc-1 et IVc-2) (65) qui sont associés à des zones géographiques particulières : Les sous-groupes IVa-1 et IVa-2 sont localisés principalement en Asie du Sud-Est, IVb-1 et IVb-2 au Japon et en Corée, IVc-1 est majoritaire en Chine et IVc-2 prédomine en Europe et en Mongolie.



**Figure 9** Distribution mondiale des 4 génotypes de BKPvV (64)

La séroprévalence varie entre 70% et 99% chez l'adulte selon les études épidémiologiques menées dans différents pays. Des études sérologiques effectuées sur de larges populations indiquent que la primo-infection survient pendant l'enfance avec un âge médian de 4-5 ans (66) (**Fig 10**) et des taux de séroprévalence de 65% à 90% sont atteints dès l'âge de 10 ans (66) (67).



**Figure 10** Séroprévalence du BKPyV selon l'âge (66) L'étude a été réalisée à Denver USA sur 2222 prélèvements. La séroprévalence du BKPyV augmente principalement au moment de la petite enfance, passé 5 ans.

### *B.3.b Modes de transmission*

La voie oropharyngée est la voie d'entrée la plus probable du virus dans l'organisme en raison de l'âge précoce de séroconversion (65 à 90% de séropositifs avant 10 ans) et de la détection d'ADN viral dans la salive et les tissus lymphoïdes de la sphère oropharyngée (68) (69)(70). Pour étayer cette hypothèse, des études anciennes chez l'enfant suggèrent que la primo infection donne lieu dans certains cas à des symptômes respiratoires hauts (type pseudo grippal), associés à la détection d'ADN du BKPyV au niveau des amygdales et de la salive. (71,72).

Une autre voie d'entrée possible serait l'ingestion d'aliments ou d'eaux contaminés. Le BKPyV est retrouvé dans l'environnement (73). Il a été par exemple montré que la présence de BKPyV (et de JCPyV) peut servir d'indicateur d'une activité/pollution humaine dans les eaux (74). La contamination de l'environnement pourrait être due à l'excrétion urinaire du BKPyV de façon asymptomatique, et pourrait favoriser un mode de transmission uro-oral.

D'autres modes de transmission du virus sont suspectés mais n'ont été que peu décrits dans la littérature : La détection de génome viral dans les lymphocytes de donneur de sang est un argument en faveur d'une possible transmission par voie sanguine (75). La transmission

par voie transplacentaire reste controversée et n'a été décrite qu'à deux occasions (76,77). Les auteurs s'appuient sur la présence d'IgM (Immunoglobuline M) et de résidus d'ADN retrouvés dans du sang de cordon ainsi que des biopsies fœtales et placentaires. Enfin, une transmission nosocomiale a été décrite en pédiatrie (greffe de cellule souche) (78).

## **B.4 Pouvoir pathogène**

### ***B.4.a Primoinfection, persistance, réactivation***

Après son entrée dans l'organisme, le virus se dirige vraisemblablement par voie hématogène vers les organes cibles : le rein et le tractus urinaire (79). En effet, le génome du BK a été retrouvé dans les lymphocytes circulants (80) et ces derniers pourraient être en partie responsables de la dissémination virale. Le virus pourrait également circuler sous forme libre par voie hématogène. La primo-infection à virus BK est dans la grande majorité des cas asymptomatique. Elle survient après pénétration du virus au niveau des voies respiratoires, où il peut se multiplier dans les amygdales. Les rares symptômes ayant été associés à ce virus sont de la fièvre et des signes respiratoires hauts non spécifiques (41). Après la phase de primoinfection, le génome viral reste sous forme épisomale dans les cellules épithéliales rénales et urothéliales rénales et l'infection rentre dans une phase de latence. Le génome viral a été retrouvé dans de plus rares cas dans d'autres organes (foie, estomac, poumons, cerveau) (81).

Le BKPyV peut réactiver spontanément chez le sujet sain. En effet, dans les études prenant comme groupe contrôle des donneurs sains, le génome du BKPyV est retrouvé dans les urines de 10% des sujets (67). L'observation d'épisodes d'excrétion virale urinaire chez les sujets immunocompétents démontre la capacité de ce virus à se réactiver périodiquement. La réactivation du virus chez l'immunocompétent ne s'accompagne d'aucune manifestation clinique majeure malgré la présence du BKPyV dans les urines. A noter que chez les femmes enceintes et les personnes âgées, le BKPyV peut se réactiver plus fréquemment que dans le reste de la population (77).

La prévalence de réactivation du BKPyV est en revanche plus élevée chez les sujets immunodéprimés tel que les greffés de cellules souches hématopoïétiques ou d'organe solide, les patients au stade SIDA ou leucémiques

#### ***B.4.b Atteintes tissulaires***

Chez l'immunodéprimé, la réactivation du BKPyV se traduit d'un point de vue clinique différemment selon l'origine de l'immunosuppression. Dans le cadre de greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), on observe une virurie chez 50% de ces patients après la greffe, et l'infection est classiquement associée à des cystites hémorragiques (82)(83). En transplantation rénale, la pathologie associée à la réactivation du BKPyV est la néphropathie à BK virus (NBKv) qui sera développée plus en avant dans ce manuscrit.

D'autres atteintes pathologiques ont été décrites dans la littérature. On peut notamment relever des atteintes pulmonaires chez des patients greffés de CSH (84) ou sous chimiothérapie (85). Des atteintes neurologiques et des rétinites ont été décrites ponctuellement chez des patients au stade SIDA (86–89).

### **C- Cas particulier des infections à BKPyV en transplantation de rein**

#### **C1 Physiopathologie des infections à BKPyV en transplantation rénale**

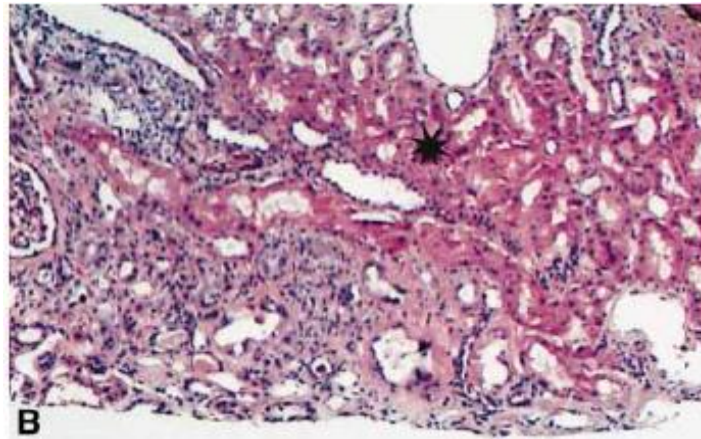
Après la primo infection et la localisation du BKPyV à son site de réplication (tractus urinaire / rein), le BKPyV va rentrer dans une phase de latence. En transplantation rénale, le traitement immunosuppresseur permet au BKPyV de se répliquer abondamment dans le tractus urinaire avec l'excrétion de nombreuses particules virales dans les urines chez 30 à 40% des patients (90).

Une fois que le virus a réactivé, la propagation de l'infection dans les tissus se fait probablement par contact de cellule à cellule. L'absence d'immunité fonctionnelle va laisser libre cours à la mise en place d'une infection lytique. Ce qui va se traduire par la présence de larges inclusions nucléaires et péri-nucléaires dans les cellules tubulaires. La lyse de ces



cellules infectées va conduire à une infiltration virale dans le lumen des tubules et de l'interstitium mais également à la propagation de l'infection des cellules environnantes (90).

Cette réplication virale non contrôlée entraîne une dégradation des tissus épithéliaux rénal et urothéliaux menant à l'apparition des « decoy cells » dans les urines chez 20 à 30% des transplantés rénaux. Ces dernières présentent un aspect morphologique modifié avec un noyau hypertrophié et des inclusions intranucléaires (90).



**Figure 11** Histologie d'une biopsie de greffon d'un patient atteint de NBKV 12 mois post-greffe (91). Déconnexion du parenchyme au niveau de l'astérisque et inflammation chronique sur la partie gauche.

Une conséquence directe de la nécrose tubulaire est la destruction de la membrane basale de l'épithélium et le passage du virus dans la circulation sanguine. L'étape critique menant à la progression vers la néphropathie à BKPyV est la mise en place d'une infiltration interstitielle par des cellules inflammatoires et le développement de lésions de tubulite puis d'une fibrose (**Fig 11**).

L'association de cet environnement inflammatoire et de la fibrose résultant de l'infection virale peut conduire à la perte du greffon chez 5% des transplantés rénaux (1).

La progression de l'infection à BKPyV vers la néphropathie a été associée à de multiples facteurs qui sont liés soit au donneur, soit au receveur ou soit aux conditions de la greffe (**Fig 12**) (92).

En ce qui concerne les facteurs de risques liés aux donneurs, on peut citer en premier exemple le « mismatch » HLA (Human leukocyte antigen) avec le receveur. Cette incompatibilité accentue le développement d'un environnement inflammatoire au niveau du rein qui favorise la destruction des tissus rénaux et conduit plus rapidement à la néphropathie à BKPyV. Le prélèvement du greffon sur un donneur cadavérique ainsi qu'un temps long d'ischémie froide sont également des facteurs de risques sur le développement de la néphropathie à BKPyV. D'autres facteurs de risques liés aux donneurs ont été identifiés mais ne sont pas retrouvés systématiquement dans les études cliniques : notamment le taux d'anticorps anti-BKPyV et le sexe féminin du donneur.

Les facteurs de risques liés aux receveurs sont l'âge (>50ans), le sexe masculin, un titre faible d'anticorps anti-BKPyV mais surtout des antécédents de néphropathie à BKPyV lors de précédentes greffes. Enfin, récemment, la reconstitution du répertoire lymphocytaire T semble avoir un impact non négligeable sur la protection de la néphropathie à BKPyV.

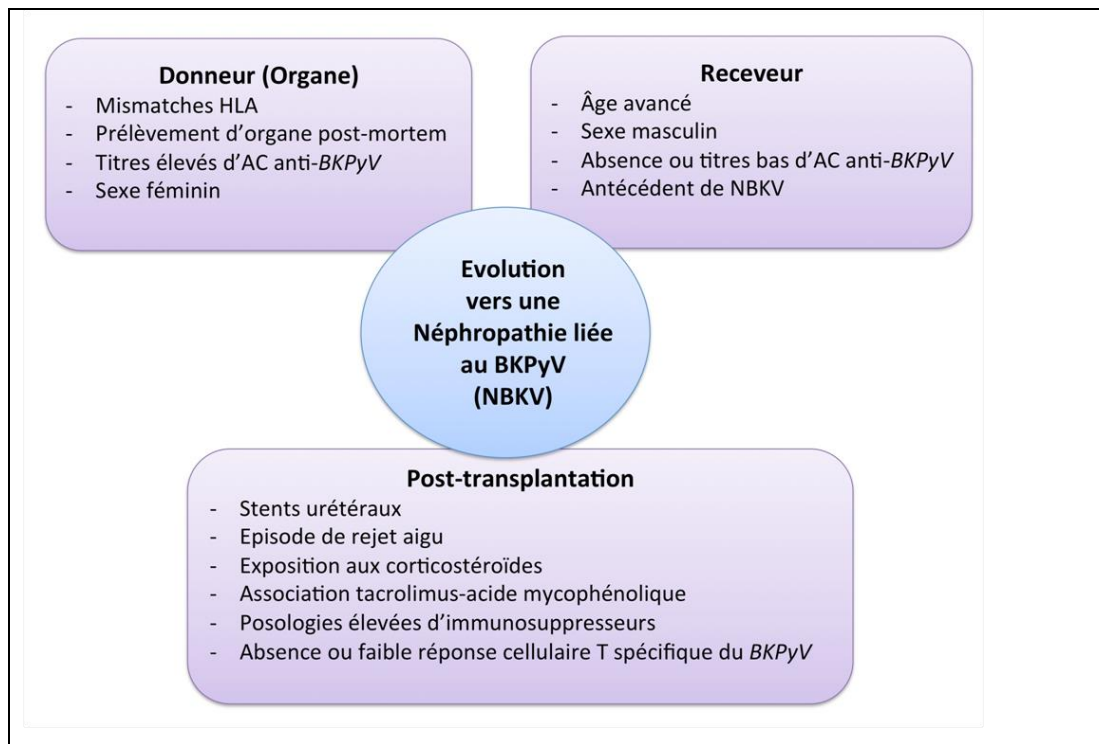
Néanmoins toutes les études s'accordent à dire que le principal facteur de risque à la survenue de la NBKV est l'utilisation d'immunosuppresseurs en post-transplantation.

Au cours des 20 dernières années, de nouveaux schémas de traitements immunosuppresseurs ont permis de diminuer le risque de rejet du greffon mais ont en revanche augmenté l'incidence des NBKV. Les traitements immunosuppresseurs sont dans la majorité des cas une association de trois molécules : un anticalcineurine, un antimétabolite et des corticostéroïdes. L'anticalcineurine inhibe l'activation des lymphocytes T, l'antimétabolite inhibe la synthèse nucléique et la prolifération lymphocytaire et les corticostéroïdes ont un rôle anti-inflammatoire.

Le tacrolimus (TAC) et le mycophenolate mofétil (MMF) sont les deux immunosuppresseurs les plus souvent impliqués dans une évolution vers la NBKV. Néanmoins aucun lien de causalité direct n'a été démontré et ils ne sont ni indispensables, ni suffisants à eux seuls pour provoquer la NBKV.

En résumé la NBKV est une maladie polyfactorielle, nécessitant la combinaison des différents facteurs liés au donneur, au receveur et au traitement post-transplantatoire pour survenir. En outre, d'autres facteurs liés aux co-infections (notamment celles au Cytomégalo virus ou CMV), ainsi qu'aux sérotypes et à la présence de formes réarrangées du BKPyv pourraient également avoir un impact sur le développement de la NBKV.

Enfin, la disparité sur les taux d'incidence des NBKV suivant les centres de transplantations ainsi que les discordances entre les facteurs retrouvés peuvent refléter des différences de protocoles d'immunosuppression entre les centres et dénotent le manque d'une procédure standardisée actuellement freine l'identification de ces facteurs de risque et le développement d'une prise en charge optimale des patients.



**Figure 12 Facteurs de risque de néphropathie à BKPyV chez les transplantés rénaux (d'après Hirsch et al 2013) (92)**

## C.2 Monitoring des infections à BKPyV en transplantation rénale

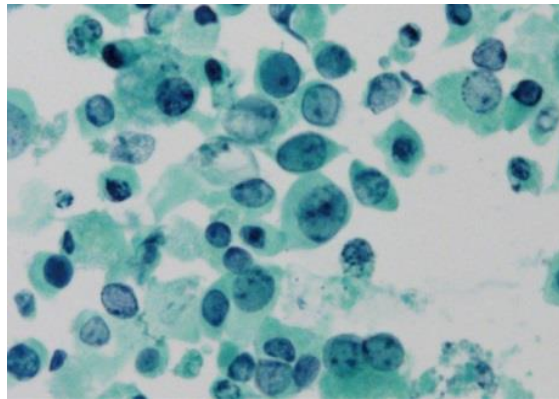
La détection du génome viral par PCR quantitative en temps réel est la première étape pour le dépistage d'une répllication virale active chez les transplantés rénaux. Cette technique a pour principal avantage d'être non invasive. En outre, elle permet de guider l'adaptation

thérapeutique (baisse de l'immunodépression) en cas de forte charge virale urinaire (>7log copies/ml).

La virurie (30-40% des transplantés) précède presque systématiquement la virémie. Cependant en terme de diagnostic, la virurie a une valeur prédictive positive de NBKV faible et ne permet pas de conclure si le patient évoluera ou non vers la NBKV.

En revanche, la virémie (10-20% des transplantés) qui survient après la virurie possède une valeur prédictive positive forte (>90%) dans les cas où elle est élevée (>6log cop/ml) ou persistante (>4 log sur deux mois minimum) (92).

Les cellules urothéliales et rénales subissent des modifications morphologiques lors d'une réplication virale prolongée et forment les « Decoy Cells » qui sont excrétées dans les urines. Elles sont révélées après coloration de Papanicolaou et présentent un noyau volumineux, hyperchromique, homogène avec un aspect dit en verre dépoli lié à la présence d'inclusions virales centro-nucléaires (**figure 13**). On les retrouve chez 20 à 30% des transplantés rénaux mais ne sont pas spécifiques d'une infection au BKPyV puisque leur présence peut être associée à d'autres virus. Ce test est simple à mettre en place mais sa valeur prédictive positive reste faible (29%).



**Figure 13 Decoy cell en coloration de Papanicolaou (93)**

C'est l'analyse histopathologique sur biopsies rénales qui permet de diagnostiquer avec certitude la NBKV en mettant en évidence la présence d'antigène T par immunohistochimie dans les cellules tubulaires rénales, plus rarement associée à des lésions

au niveau glomérulaire. A noter qu'une biopsie négative ne permet pas d'éliminer avec certitude une NBKV. En effet, les lésions histologiques sont multifocales et la possibilité d'erreur d'échantillonnage peut conduire à la ponction d'un tissu sain. En cas de forte suspicion de NBKV (virémie élevée), une deuxième biopsie est recommandée.

Actuellement, une classification proposée par Hirsch et Randhawa (92) permet de prédire la perte du greffon selon l'étendue des différentes atteintes histologiques (**Tableau II**).

**Tableau II: Classification des néphropathies à BKPyV en fonction de l'atteinte histologique observée sur biopsie rénale (les % indiquent l'étendue de l'atteinte histologique sur la biopsie) (Hirsch & Randhawa, 2013) (92)**

Atteintes histologiques	Stade A	Stade B			Stade C
		B1	B2	B3	
Inclusions virales intranucléaires	≤25%	>25%			Variable
Inflammation interstitielle	≤10%	10-25%	26-50%	>50%	Variable
Atrophie tubulaire	≤10%	<50%			>50%
Fibrose interstitielle	≤10%	<50%			>50%
Risque de perte du greffon	≤15%	25%	50%	75%	>80%

### C.3 Traitements antiviraux

Il n'existe pas de traitement antiviral spécifique du BKPyV. La principale ressource thérapeutique est la modulation du traitement immunosuppresseur. La difficulté de la prise en charge des patients transplantés rénaux est d'évaluer le rapport bénéfice-risque de l'immunosuppression. En effet, une trop faible immunosuppression augmente la probabilité d'un rejet de greffe. En revanche, un traitement immunosuppresseur trop intense favorise la survenue d'une réactivation du BKPyV et à terme une NBKV.

Les principaux immunosuppresseurs utilisés en clinique sont le tacrolimus, la cyclosporine et le mycophénolate mofétil (MMF).

Le tacrolimus est aujourd'hui le principal immunosuppresseur utilisé en rejet de greffe. Son mécanisme d'action consiste à inhiber l'activité phosphatase de la calcineurine qui

est connue pour favoriser la prolifération des lymphocytes T ainsi que la synthèse d'interleukine 2 (IL2).

La ciclosporine est également utilisée en tant que traitement immunosuppresseur en post greffe. La cascade d'inhibition de l'activité phosphatase des calcineurines par la ciclosporine diffère légèrement de celle du tacrolimus mais le résultat est similaire avec une baisse de la capacité proliférative du lymphocyte T et de la synthèse d'IL2.

La dernière molécule fréquemment utilisée dans les traitements immunosuppresseurs post greffe est l'acide mycophénolique qui agit en tant qu'inhibiteur de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH). Cette dernière étant une enzyme nécessaire à la synthèse de guanosine dont les lymphocytes sont dépendants pour proliférer.

Les effets secondaires (notamment néphrotoxiques) de ces trois molécules sont un frein à la prise en charge des patients greffés du rein. Un suivi des dosages des immunosuppresseurs, de la fonction rénale ainsi que de la répllication virale (sang et urine) est préconisée pour moduler au mieux le traitement et limiter les risques de rejet de greffe et de NBKV.

Des molécules antivirales sont aujourd'hui à l'étude pour une utilisation en association avec la modulation du traitement immunosuppresseur. Cependant, les résultats sont encore controversés et aucun traitement n'a véritablement prouvé son efficacité.

Le cidofovir est la molécule la plus étudiée pour son implication dans la prise en charge des patients greffés rénaux. C'est un analogue nucléosidique qui possède une activité inhibitrice *in vitro* sur les *Polyomavirus* murins et simiens (94). En clinique, il est habituellement utilisé pour lutter contre la rétinite à cytomégalovirus (CMV) chez les patients au stade SIDA ou dans le traitement de souche d'Herpes Simplex résistantes à l'aciclovir. Chez les herpès virus, son mécanisme d'action repose sur l'inhibition des ADN polymérases virales. Les *Polyomavirus* utilisant les polymérases cellulaires lors de leur cycle de répllication, on ne connaît pas encore le mode d'action du cidofovir sur le BKPyV. En clinique, les résultats sont discordants sur la pertinence de l'utilisation du cidofovir en transplantation rénale : en effet certaines études indiquent une stabilisation de la fonction

rénale (95) tandis que d'autres ne démontrent pas de bénéfices significatifs par rapport à un traitement basé sur l'immuno-modulation seule (96).

Le leflunomide pourrait être une autre piste intéressante dans une association avec un traitement immuno-suppresseur classique. Des résultats préliminaires sont encourageants sur l'efficacité contre le BKPyV tant *in vitro* (97) que sur des essais sur un petit nombre de patients (98). L'apparition d'effets secondaires fréquents (hépatite, hémolyse...) pénalise ce candidat pour une utilisation clinique et a peut-être empêché la conduite d'une étude prospective randomisée pour certifier son efficacité.

Enfin, une utilisation d'immunoglobulines par voie intraveineuse en complément de la réduction de l'immunosuppression a été réalisée dans un essai clinique sur un petit nombre de patients (99) avec des résultats prometteurs : 7/8 patients présentant une NBKV ont gardé leur greffon. Cependant, pour confirmer ce résultat, des études sur un plus grand nombre de sujet seraient nécessaires.

## **D La région régulatrice non codante du BKPyV: variabilité génétique, rôle dans la régulation du cycle viral et dans la pathogénicité**

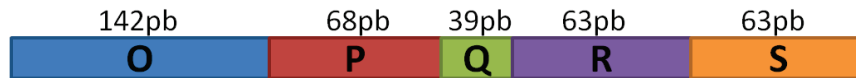
### **D.1 Variabilité génétique de la NCCR : formes archétypes, formes réarrangées**

La région NCCR (non-coding control region ou région régulatrice non codante) est la séquence régulant l'expression séquentielle des gènes précoces (Agt et AgT) et tardifs (Agnoprotéine, VP1/2/3). La séquence NCCR «archétype» (wwNCCR) est découpée en 5 blocs OPQRS (**fig14**) comme suit : P<sub>1-68</sub> Q<sub>1-39</sub> R<sub>1-63</sub> S<sub>1-63</sub>, les nombres correspondant au nombre de nucléotides de chaque bloc. Elle est susceptible de subir des modifications de type insertions-délétions, permettant de distinguer les souches natives «archétypes» ou non réarrangées (souches ww), des souches réarrangées ou «variants» (souches rr).

La région NCCR contient l'origine de réplication et de promoteurs des gènes précoces et tardifs. Les gènes précoces sont transcrits à l'initiation du cycle d'infection dans un sens puis leur expression est réprimée concomitamment à la transcription des gènes tardifs dans le sens opposé (Imperiale & Major Fields).

Le bloc O contient l'origine de réplication du virus incluant des pentamères GAGGC reconnus par l'AgT pour initier la réplication ainsi que des sites de fixation à des facteurs de transcriptions cellulaires comme NFκB et EBPβ (enhancer binding factor beta) induisant la transcription des gènes précoces. Les blocs PQRS sont des régions «enhancers» qui contiennent des sites de fixation pour des facteurs de transcription cellulaires (**Fig 14**) et viraux (AgT, Agt.). Le site d'initiation de la transcription des gènes tardifs est situé dans le bloc S et contient une unité de réponse aux stéroïdes GRE/PRE (glucocorticoïdes/progestérone responsive element).





**Figure 14** Forme archétype de la région régulatrice non codante (rrNCCR) (100). La région **O** contient l'origine de réplication et comprend 142 pb. Les régions **PQRS** contiennent de nombreux sites de fixation à des facteurs de transcriptions et comprennent respectivement 68pb, 39pb, 63pb et 63pb.

La forme archétype est retrouvée de manière prépondérante chez les femmes enceintes ainsi que les greffés de moelle peu de temps post-greffe (101,102). C'est également la forme la plus retrouvée chez les sujets sains (67) et elle est communément admise comme étant la forme «transmissible», détectée à la fois dans les urines des sujets sains et celle des sujets avec une infection active à BKPyV (1).

Les séquences wwNCCR peuvent contenir des mutations ponctuelles, délétion ou substitution d'une seule base (103) mais qui ne semblent pas d'avoir d'effet sur le potentiel infectieux ou pathogène que ce soit *in vitro* ou chez les patients *in vivo*. Les mutations ponctuelles coïncident également avec les génotypes du BKPyV (de I à IV) (104).

Les séquences rrNCCR présentent de larges modifications (insertion / duplications / délétions). Le bloc O est généralement épargné par ces mutations sans doute à cause des sites indispensables à la réplication et la transcription qu'on y trouve. En revanche les blocs P Q R et S sont soumis à des réarrangements majeurs. De nombreuses souches ont été décrites à ce jour et il est difficile d'être exhaustif, cependant les modifications de l'arrangement des blocs de la région NCCR sont retrouvées dans plusieurs publications. Ainsi dans les différents profils publiés, le bloc P est souvent dupliqué (en partie ou en totalité) soulignant son importance lors de la réplication virale. Les autres blocs peuvent être sujets à des délétions partielles ou totales. De nombreux profils ont ainsi été décrits : PQ PQR PQS PPPS ..... (105).

L'impact des réarrangements de la région NCCR sur la biologie du virus est une question qui a été soulevée dès le début des années 1990. Les données alors obtenues permettaient de mettre en évidence les points suivants :

*In vitro*, une forme « archétype », isolée à partir de l'urine de patient et amplifiée sur plusieurs passages pendant des périodes de 10 à 30 jours en culture cellulaire (cellules HEK) présentait des réarrangements dans la région NCCR et était associée avec l'apparition plus rapide d'effet cytopathique (106).

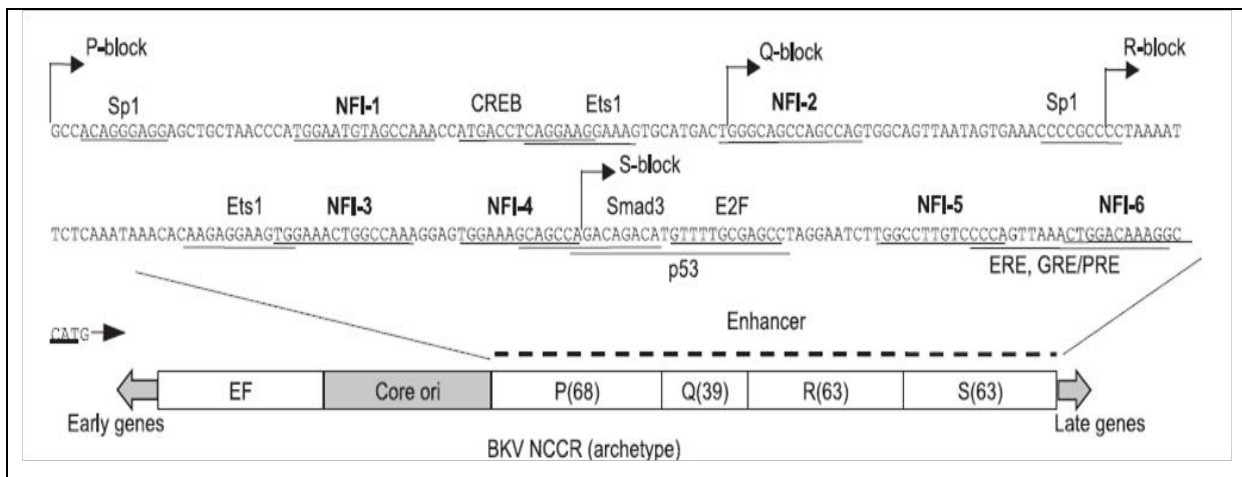
*In vivo*, une méta analyse de 2007 (107) a montré qu'étonnamment les prélèvements sanguins issus de donneurs sains étaient ceux présentant le plus de mutations comparativement aux patients développant des pathologies (toutes confondues transplantés/non transplantés respiratoire/cystites etc...). Néanmoins dans le cadre de la transplantation rénale, les patients développant une NBKv présentaient plus de réarrangements que les patients ne développant qu'une virémie/virurie.

Gosert et al (1) ont démontré la corrélation entre les réarrangements de la région NCCR avec la persistance de la virémie à BKPyV post-transplantation rénale. En premier lieu, les auteurs ont identifié des différences de population virale dans les échantillons urinaires et plasmatiques. La majorité des séquences retrouvées étaient des wwNCCR mais la proportion de rrNCCR était plus importante dans les échantillons de plasmas (22%) que dans les échantillons urinaires (4%). De plus, les formes réarrangées étaient associées avec une hausse de la charge virale (5.64 log<sub>10</sub> copies de génome /ml) comparées aux wwNCCR (4.3log<sub>10</sub> copies de génome /ml). Les auteurs ont ensuite cloné 10 rrNCCR (duplication de la jonction PQ ou délétion dans les blocs QRS) issues de patients dans un vecteur reporter plasmidique. Après transfection dans quatre types cellulaires différents, ils ont observé l'effet des réarrangements sur la transcription des gènes précoces et tardifs. Toutes les séquences rrNCCR favorisaient la transcription des gènes précoces au détriment des gènes tardifs, à l'inverse de la séquence wwNCCR utilisée en contrôle. Les rrNCCR étaient également associées à une hausse de la répllication virale ainsi qu'à un effet cytopathique plus marqué. Les auteurs ont conclu alors que l'émergence des rrNCCR *in vivo* était associée à la hausse de la charge virale et au développement de la NBKV.

De plus, il a été observé que chez des patients présentant une infection non contrôlée avec une virémie prolongée à BKPyV, la fréquence de détection des variants réarrangés augmentait dans le temps et que ces derniers pouvaient devenir la sous-population virale prédominante. Le modèle proposé par l'équipe de Hirsch stipule que l'absence de contrôle de l'infection chez les patients immunodéprimés pourrait favoriser l'émergence de ces formes réarrangées, elles-mêmes plus « virulentes », induisant un cercle d'amplification de la pathogénicité virale.

## D.2 Interactions NCCR/facteurs de transcription cellulaires

C'est au début des années 2010, avec le travail de Liang et al (108) que l'importance des sites de fixation aux facteurs de transcription est posée (**Fig 15**). Leur découverte *in silico* a permis de proposer l'hypothèse que leur duplication/délétion était la raison majeure de l'activité transcriptionnelle et de répllication.



**Figure 15** Séquence de la ww-NCCR et des sites de fixations aux facteurs de transcription cellulaires (108)

### NFI (Nuclear Factor I)

Liang et al ont principalement décrit les sites de fixation aux facteurs de transcriptions NFI. Au sein de la région NCCR, on trouve six sites de fixation pour les membres de la famille NFI. A l'aide de constructions plasmidiques et de culture cellulaire *in vitro*, cette équipe a pu déterminer que les sites NFI proches de l'origine de répllication (NFI-1 et NFI-2 sur la **Fig 15**) ont un rôle prépondérant pour la répllication virale grâce à l'association de NFI avec l'AgT et/ou la polymérase cellulaire. Le site NFI-3 a un rôle dans le « switch »

transcriptionnel entre les gènes précoces et tardifs. Ce rôle avait déjà été montré auparavant par Kraus et al (109) en inhibant la transcription des gènes tardifs tant que la phase de transcription des gènes précoces n'est pas achevée.

Les sites NFI-5 et NFI-6 chevauchent les sites de fixations aux hormones stéroïdiennes (site ERE (Élément de réponse aux œstrogènes), GRE/PRE (Élément de réponse aux glucocorticoïdes/progestérone) comme présenté sur la **Fig 15**. Ils vont donc moduler la réponse aux glucocorticoïdes, à la progestérone et aux œstrogènes qui augmentent la réplication virale (110)

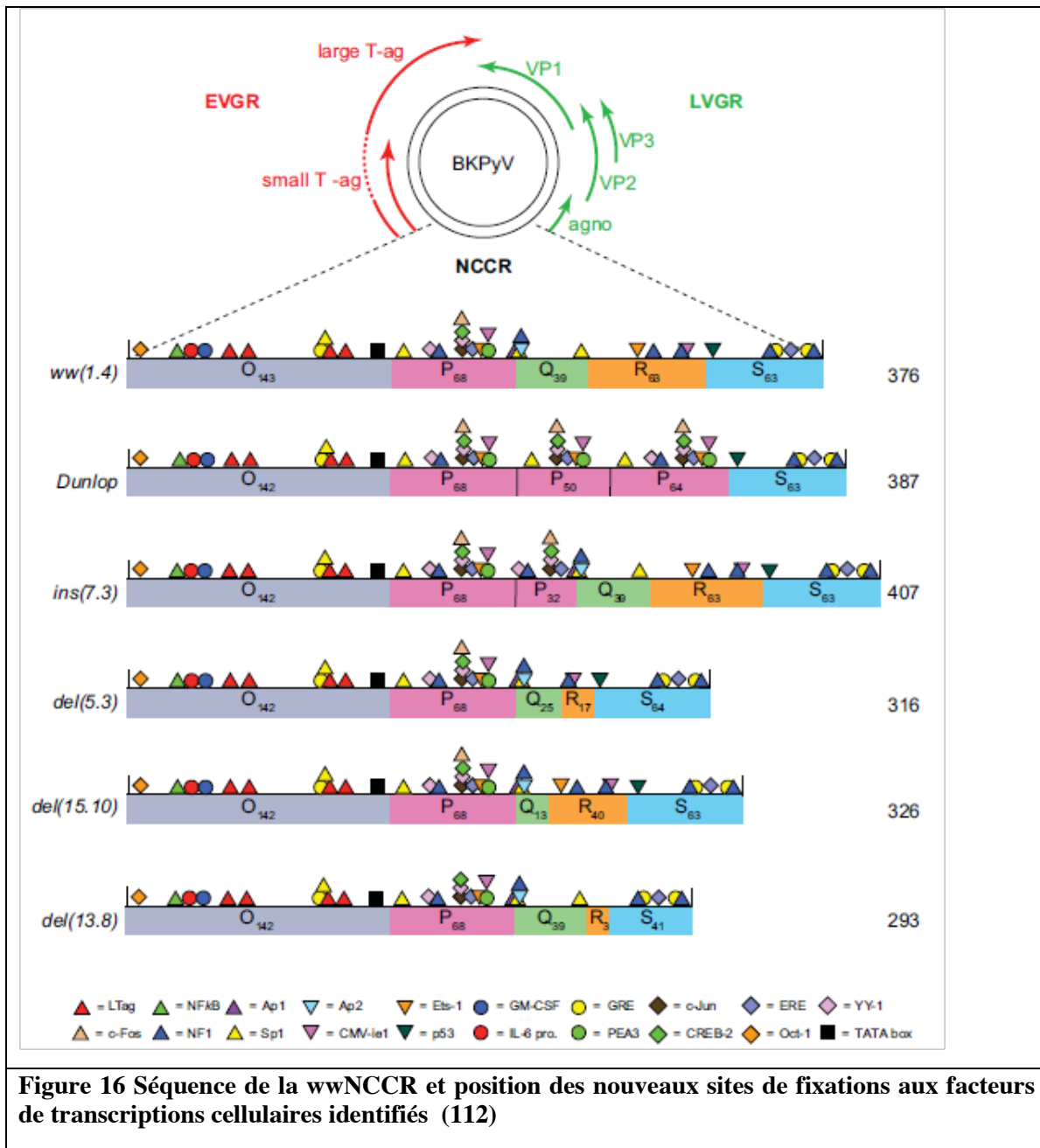
Enfin le site NFI-4 est impliqué dans la régulation de la transcription induite par le TGF $\beta$  (tumor Growth Factor $\beta$ ) qui avait été préalablement montré par Abend et al (111) chez des transplantés rénaux.

### Smad 3

Le site de fixation au facteur de transcription Smad 3 se retrouve dans la jonction R-S (R<sub>58</sub>S<sub>9</sub>) qui est susceptible d'être délétée/dupliquée dans les rNCCR. Abend & Imperiale (111) ont émis l'hypothèse que Smad3 serait le constituant final d'une cascade d'activation initiée par le TGF $\beta$  et qu'il aurait un rôle d'activateur de la réplication des gènes précoces du BKPyV.

### Sp1

Récemment, Bethge et al (112) ont identifié de nouveaux sites de fixation de facteurs de transcription (**Fig16**) (également par une méthode *in silico*) et ont permis de mettre en évidence l'importance des sites de fixation à Sp1.



Quatre sites de fixation à Sp1 ont été décrits et sont représentés par les triangles jaunes sur la **Fig 16**. Sp1-1 se situe à la fin de la région O, Sp1-2 se situe au début de la région P, Sp1-3 est au niveau de la jonction Q-R et Sp1-4 se trouve à la fin de la région Q

Des mutations ponctuelles (C>G) avaient déjà été décelées sur Sp1-2 et Sp1-3 chez des patients transplantés CSH *in vivo* et étaient plus fréquentes sur ceux développant une cystite hémorragique (113).

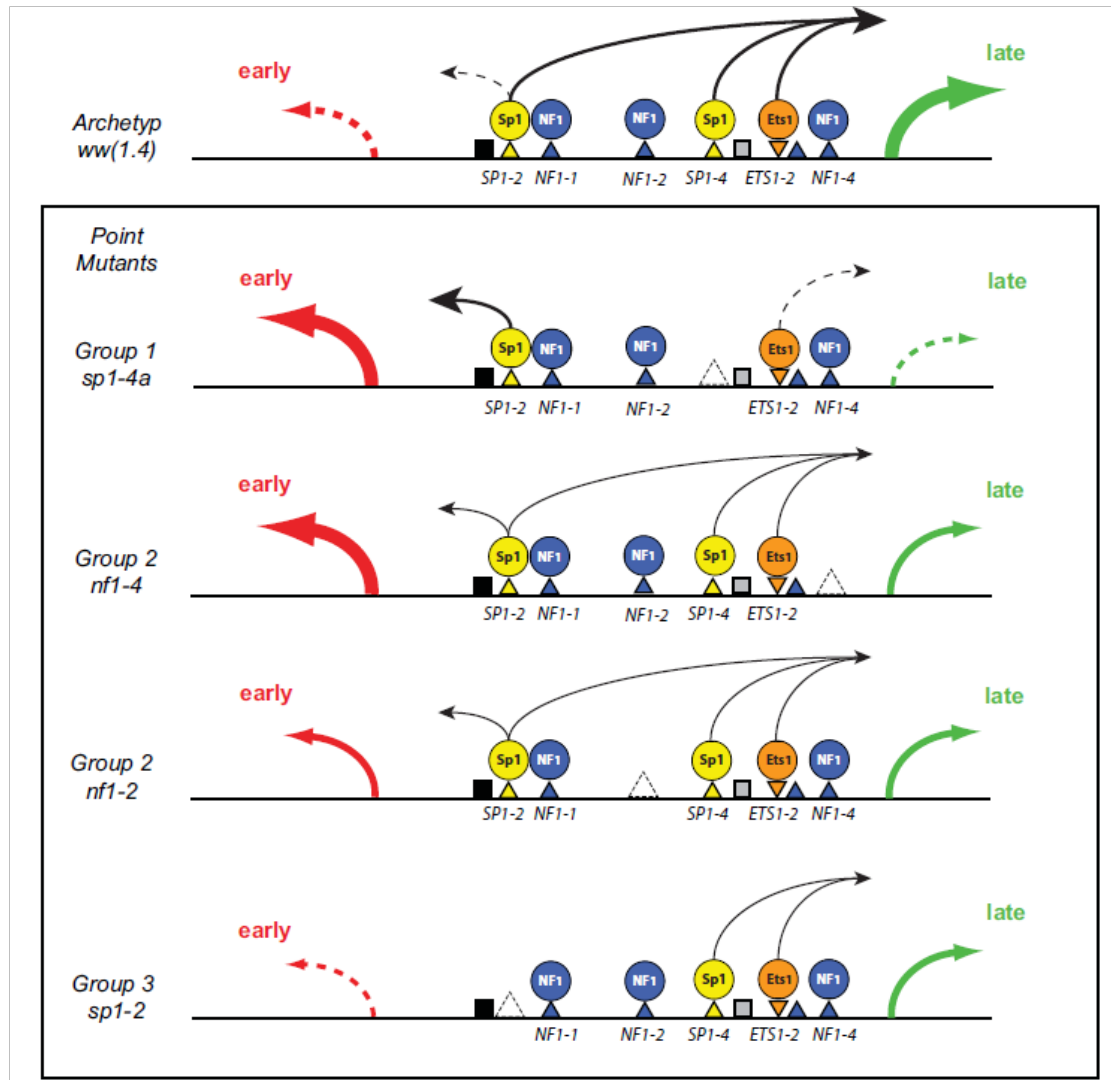
Le travail de Bethge et al a consisté à construire des plasmides comprenant des NCCR archétypes ou réarrangées flanquées de deux codons d'initiation de la transcription un pour les gènes précoces et un pour les gènes tardifs avec deux gènes reporter. Des mutations ponctuelles au niveau des sites de fixations aux facteurs de transcription ont été induites et leur ont permis de classer les NCCR en trois séquences « prototypes » selon l'intensité de réplication et leur permettent d'émettre l'hypothèse d'une régulation hiérarchique des facteurs de transcriptions dans le cadre de la réplication.

La première séquence « prototype » regroupe les simples mutations au niveau des sites Sp1-4 ou Ets1-2 situés au niveau de la jonction Q-R. La séquence de la jonction Q-R a été observée comme délétée dans des isolats cliniques de patients transplantés du rein (1) et a pour conséquence une augmentation de la charge virale chez les patients. Dans leur expérience in vitro (cellules HEK), Bethge et al retrouvent cette charge virale élevée ainsi qu'une activité transcriptionnelle plus intense au niveau des gènes précoces associée à une forte inhibition de la transcription des gènes tardifs par rapport à la wwNCCR.

La seconde séquence « prototype » regroupe les mutations aux niveaux des sites de fixation des facteurs transcription NFI et p53. Cette séquence « prototype » met en évidence des rôles de modulations fines de l'activité transcriptionnelle. Par exemple, le silencing du site NFI-4 conduira à une transcription plus intense des gènes précoces (demeurant cependant en deçà des effets des mutations de la séquences « prototype » 1) associés à une transcription moins importante des gènes tardifs par rapport à la wwNCCR. Le silencing du site NFI-2, quant à lui, induit une activité transcriptionnelle modérée des gènes précoces et tardifs.

Enfin, la troisième séquence « prototype » regroupe les mutations au niveau des sites Sp1-1 et Sp1-2 individuellement ou en association. Par rapport à la séquence wwNCCR, le silencing de ces deux sites induit une baisse de l'activité transcriptionnelle que ce soit pour les gènes précoces ou pour les gènes tardifs et une baisse de l'ineffectivité des virions produits. Il est intéressant de noter que l'association d'une de ces mutations avec une de celle des séquences « prototypes » 1 ou 2 induit une réversion des effets de ces dernières amenant à penser que les sites Sp1-1 et Sp1-2 sont des domaines essentiels pour l'expression génique.

En résumé, les auteurs proposent ici une approche hiérarchique de la régulation génique avec Sp1-1 et Sp1-2 comme acteurs indispensables de la transcription ; Sp1-4, Ets1-1 et Ets1-2 induiraient l'orientation préférentielle de la transcription (vers les gènes précoces ou tardifs) ; et enfin les facteurs de transcription NFI modèleraient cette orientation (**Fig17**).



**Figure 17** Rôle des sites de fixation des facteurs transcriptions Sp1 / NFI / Ets1. La première séquence représente la wwNCCR. Les séquences suivantes représentent les séquences prototypes obtenues après des mutations induites au niveau des sites de fixation au facteur de transcription cellulaire. Group 1 : Mutations ponctuelles aux sites sp1-4 et/ou Ets1-2. Group 2 : Mutation induites aux sites nfi-4 et nfi-2. Group 3 : Mutations induites aux sites sp1-1 et sp1-2. (112)

## **E- La réponse immunitaire anti-BKPyV**

### **E.1 La réponse innée**

#### *E.1.b Cellules dendritiques*

La fonction principale des cellules dendritiques lors de l'infection de l'organisme par un pathogène est la présentation de l'antigène aux acteurs de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T). Leur rôle dans le contrôle des infections à BKPyV a été suggéré dans une étude de Womer et al (114). Cette étude étudie une cohorte de 79 patients séparés en trois groupes selon leur statut virologique post-transplantation. Le premier groupe n'est pas sujet à de réactivation virale post transplantation (n=26) ; le second possède au moins un échantillon sanguin positif avec une charge virale inférieure à 5000 copies de génomes par ml dans un an de suivi (n=29) ; enfin le troisième groupe est constitué de patients avec au moins un prélèvement sanguin présentant une charge virale supérieure à 5000 copies de génome par ml (n=24). Ils n'ont montré aucune différence entre le groupe à virémie modérée et à haute virémie. En revanche entre les groupes virémiques et le groupe non virémique, les valeurs absolues de cellules dendritiques sont significativement plus faibles dans les premiers. Ils ont déterminé, en utilisant une courbe ROC sur le nombre total de cellules dendritiques en pré-transplantation, un seuil prédictif de 23500 cellules/ml de sang en dessous duquel le risque de développer une virémie était significativement plus élevé.

#### *E.1.c Cellules NK*

Les cellules Natural Killer (NK) jouent un rôle important dans le contrôle précoce des infections virales après transplantation d'organe (115). Dans le cadre de l'infection à BKPyV le rôle des cellules Natural Killer (NK) lors des premières étapes de l'infection reste encore à déterminer. Une prédisposition génétique au niveau des récepteur KIR des NK pourrait avoir un rôle sur le développement de NBKv chez les patients transplantés du rein. En effet Trydzenskaya et al (116) ont génotypé des patients transplantés rénaux et ont mis en évidence une fréquence plus faible du récepteur activateur KIR3DS1 chez les patients ayant une



réactivation sévère du BKPyV et/ou une néphropathie à vBK par rapport aux patients non virémiques.

Une étude récente suggère l'existence d'un mécanisme d'échappement viral à la réponse NK : en inhibant l'expression du facteur de stress ULBP3 dans les cellules infectées avec le JCPyV (117). On peut souligner que c'est le seul mécanisme d'échappement viral connu chez les *polyomavirus* humain et puisqu'il est présent à l'identique dans les génomes du BKPyV et du JCPyV, on peut supposer que le BKPyV inhibe également le facteur de stress ULBP3.

Enfin des résultats de notre équipe montrent que le polymorphisme du gène codant pour la protéine MICA, ligand du récepteur activateur NKG2D, peut être un facteur de protection ou de susceptibilité à l'infection par le BKPyV, en fonction des combinaisons donneur/receveur (118) (article en tant que co-auteur, voir en annexe).

## **E.2 La réponse humorale**

Par rapport à la réponse immunitaire adaptative cellulaire, peu d'études ont porté sur la réponse humorale dans un contexte de transplantation rénale. On peut néanmoins citer le travail de Bohl et al (119) qui se sont penchés sur le rôle des anticorps dans l'infection à BKPyV. Ils ont recherché une corrélation entre le titre d'anticorps en pré-greffe dans une cohorte de patients avec la survenue de la réactivation virale en post greffe. Les résultats ont montré que le titre d'anticorps en pré-transplantation n'influe pas sur la réactivation virale.

Dans le cadre de la transplantation rénale, le virus peut se trouver chez le greffon et/ou chez le receveur. Les infections à BKPyV post-greffe représentent donc soit des primo-infections, (donneur séropositif vers receveur séronégatif), soit des réactivations (donneur séronégatif vers receveur séropositif), soit des surinfections et/ou réactivations (donneur et receveur séropositifs). Ces différentes situations impliquent des réalités immunologiques diverses qui pourraient expliquer que le rôle de la réponse humorale en transplantation rénale n'a pas encore été fermement établi.

La séronégativité du receveur a été identifiée comme facteur de risque pour la survenue d'une virurie, d'une virémie ou d'une NBKPyV dans le cadre de la greffe rénale chez les patients

pédiatriques (120,121). En revanche, les données sur la réponse humorale chez les patients adultes est plus ambiguë. En effet une équipe a montré dans une étude de 66 paires donneur-receveur que le statut sérologique du donneur était associé à une virurie à BKPyV post-greffe mais pas celui du receveur (122). En revanche une étude plus récente portant sur 192 paires donneur-receveur a retrouvé, à l'instar des données chez les patients pédiatriques, la même association entre la combinaison donneur séropositif / receveur séronégatif et une réplication active du BKPyV post-greffe (123). Enfin, chez les receveurs adultes séropositifs pour le BKPyV, deux études ont rapporté une corrélation inverse entre le titre d'anticorps anti-BKPyV au moment de la greffe, et la réplication virale post-greffe (119,124). Pour résumer, l'immunité préexistante au virus joue un rôle protecteur contre les réactivations ou surinfections au BKPyV dans le cadre de l'allogreffe rénale tant chez les patients adultes que pédiatriques.

**Tableau III : Synthèse des publications portant sur la réponse immunitaire humorale**

Publication	Population	Résultats
Ginevri et al, Transplantation 2003 (114) Rétrospectif	100 transplantés du reins pédiatriques	La Séronégativité du receveur est facteur de risque pour la réactivation virale
Smith, Am J Transp 2004 (115) Rétrospectif	173 transplantés du reins pédiatriques	La séronégativité du receveur est un facteur de risque pour le développement de la NBKv
Bohl, Am J Transp 2005 (116) Prospectif	66 paires donneurs-receveurs d'une greffe de rein	La séroposivité du donneur est un facteur de risque pour le développement d'une virurie
Randhawa, Clin Vacc Immunol 2006 (118) Rétrospectif	81 transplantés du rein au moment de la transplantation 67 transplantés du rein en post-transplantation	-Taux IgG / IgM et IgA plus élevé chez patients avec réactivation virale
Bohl et al, J clin virol 2008 (113) Prospectif	87 transplantés du rein séparés en 5 groupes selon la réactivation virale post-transplantation 17 patients sans réactivation virale 11 patients avec une virurie transitoire 36 patients avec une virurie durable 12 patients avec une virémie transitoire 11 patients avec une virémie durable	-Taux d'IgG en pré-transplantation est plus faible chez les patients développant une virémie -La hausse du taux d'IgG en post-transplantation corrèle avec l'intensité de l'infection -La réponse humorale n'est pas associée à une résolution de l'infection
Egli et al J Inf Dis 2009 (67) Prospectif	400 donneurs sains	-Pas de corrélation charge virale urinaire et taux IgG
Sood et al, Transplantation 2013 (117) Prospectif	-192 paires donneurs receveurs (de novo) d'une greffe de rein séparées en 4 groupes selon le séro-status: G1 (n=41) : D+R- G2 (n=42) : D+R+ G3 (n=41) : D-R+ G4 (n=68) : D-R-	-Virémie retrouvée plus fréquemment dans les paires D+R- vs les autres combinaisons

## E-3 La réponse cellulaire

### E.3.a Méthodes d'étude de la réponse lymphocytaire antivirale

Bien que les *Polyomavirus* possèdent au moins 5 protéines immunogènes (AgT, Agt, VP1, VP2 et VP3), l'étude de la réponse immunitaire (notamment adaptative) s'est longtemps concentrée sur la réponse contre AgT et VP1 (125).

Le génome du BKPyV possède 70% d'homologie de séquence avec le JCPyV, notamment au niveau des protéines de capsid. Une cross-réactivité antigénique existait entre eux. Les principaux épitopes immunogènes ainsi reconnus sont situés sur l'AgT et VP1. En ce qui concerne la protéine majeure de capsid VP1, deux nonamères ont été décrits, aux positions d'acides aminés 44 et 108 de la protéine en tant qu'épitopes immunogènes dominants (126,127) et correspondant aux respectivement aux positions 36 et 100 chez le JCPyV. L'immuno-dominance entre ces deux épitopes chez l'hôte infecté par le BKPyV change selon le statut d'immunocompétence de l'individu. En effet, Chen et al (127) ont montré une réponse préférentielle dirigée vers VP1<sub>p44</sub> chez l'individu sain et vers VP1<sub>p108</sub> chez le patient transplanté du rein atteint de NBKv. Dans le cas de l'AgT, 4 peptides induisant une forte réponse immunogène (un nonamère et trois 15-mères) ont été décrits par Li et al (128) aux positions AgT<sub>p25</sub> pour le nonamère et AgT<sub>p553/p557/p613</sub> pour les 15-mères. Ces quatre peptides immunogènes se retrouvent également chez le JCPyV.

L'impact immunogène des autres protéines virales est à ce jour peu étudié. On peut néanmoins citer le travail de Mueller et al (129) qui ont démontré que les 5 protéines (AgT, Agt, VP1, VP2 et VP3) ont des propriétés immunogéniques. A noter que la réponse anti-VP3 chez les patients atteints de NBKv présente une proportion de LyTCD4+ produisant de l'IFN $\gamma$ , du TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et de l'IL2 plus importante que contre l'AgT et l'Agt. La même équipe a démontré dans la même année que la stimulation *in vitro* de PBMC de patients par un pool de peptides des cinq protéines induisait une meilleure production cytokinique comparativement à des stimulations basées sur un seul antigène (130).

### ***E.3.b Réponse immunitaire anti BKPyV chez le sujet immunocompétent***

La fréquence des lymphocytes T spécifiques du BKPyV est globalement plus faible que celle mesurée contre d'autres virus persistants responsables d'infections opportunistes comme le CMVH ou l'EBV (Epstein-Barr Virus). Cette faible fréquence de lymphocytes T fonctionnels circulants pourrait s'expliquer par une réactivation virale limitée au site de persistance du virus (le tractus réno-urinaire), avec pas ou peu de passage sanguin contrairement au CMVH ou à l'EBV. Dans une étude portant sur 25 sujets sains, une réponse T CD8 spécifique était détectée dans 60 % des cas mais seulement après expansion *in vitro* des cellules en présence d'IL2 et de peptide VP1 ou Ag T. La réponse anti-VP1 était plus fréquemment détectée que la réponse anti-AgT. Ces cellules T CD8 présentaient un phénotype de cellules effectrices mémoire (TEM), et étaient capables de produire plusieurs cytokines en réponse à une stimulation non spécifique (131). Plus récemment, une étude mesurant la réponse CD4 polyfonctionnelle et les taux d'AC anti-BKPyV en fonction de l'âge dans une population immunocompétente de 122 sujets a montré une réponse T CD4 au-dessus du seuil de positivité défini dans l'étude (0,027% lymphocytes fonctionnels) chez 34,5% des sujets. Un niveau maximal de réponse spécifique anti-BKPyV était détecté chez l'adulte jeune entre 20 et 30 ans. L'activité de prolifération lymphocytaire et les taux d'IgG (Immunoglobuline G) anti-BKPyV étaient maximaux pour cette même tranche d'âge (132).

### ***E.3.c Réponse immunitaire anti BKPyV en transplantation de rein***

En 2007, deux études rétrospectives ont été menées chez des patients transplantés rénaux adultes (125) ou enfants (133). Elles ont montré que chez les patients en phase de contrôle de l'infection (au moment de la décroissance de la virémie), la réponse cellulaire T anti-BKPyV (mesurée par la synthèse d'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )) est significativement augmentée par rapport à la réponse mesurée chez des patients en phase d'infection prolongée non contrôlée ou qui présentent des signes histologiques de NBKPyV. De plus l'étude de Bingelli souligne une réaction préférentielle des LTCD4 contre VP1 et des LTCD8 contre AgT. Proser et al (134), ont montré l'incidence bénéfique de la reconstitution du répertoire immunitaire chez des patients transplantés rénaux présentant des dysfonctions de la fonction rénale. La réponse immunitaire cellulaire est là aussi mesurée par la production d'IFN.

En 2011 Schachtner (135) confirme, dans une étude prospective, les données précédentes sur l'importance de la réponse immunitaire LT spécifique anti-BKPyV et insiste sur la rapidité d'apparition de cette réponse post-greffe. En effet, en comparant la cinétique de mise en place de cette réponse, il remarque que les patients contrôlant la réactivation virale ont une réponse spécifique anti-BKPyV dès le premier mois post greffe alors que les patients développant une BKVN n'ont une réponse LT spécifique qu'au cinquième mois post greffe en moyenne.

En résumé, jusqu'au début des années 2010, les études portant sur la réponse T anti BKPyV ont mis en évidence les points suivants :

- Une réponse cellulaire anti-BKPyV comparativement faible en regard d'autres infections systémiques (CMV, EBV) ce qui pourrait s'expliquer par la réplication virale très localisée au niveau du tractus et du rein du BKPyV.

- Une reconstitution plus rapide du répertoire lymphocytaire chez des patients en phase de contrôle de la virémie par rapport à des patients dont la virémie augmente et/ou présentant des signes histologiques de néphropathies.

- Une augmentation de la réponse humorale chez les patients avec une réactivation virale persistante par rapport à des patients contrôlant la réactivation du BKPyV.

Cependant, dans la majorité des études, la réponse cellulaire anti-BKPyV est essentiellement mesurée par la synthèse d'IFN par les PBMC de patients infectés au BKPyV après expansion clonale *in vitro*. Ce qui, d'une part, n'est pas représentatif de la réalité *in vivo* et, d'autre part, ne prend pas en compte le rôle d'autres cytokines produites par les LT dans la réponse cellulaire anti-BKPyV (IL2, TNF $\alpha$ ...).

Dans le but d'améliorer le suivi des patients transplantés rénaux et prévenir le risque de BKVN d'autres marqueurs du suivi immunologique ont dû être investigués. Des études trans-sectionnelles sur la polyfonctionnalité des cellules T montrent des résultats prometteurs. Ainsi Trydzenskaya (130) a montré une détection plus fréquente de lymphocytes T CD4 polyfonctionnels (IL2/TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$  ou IL2/TNF $\gamma$ ) chez des patients ayant présenté ayant un

antécédent de réactivation virale rapidement contrôlée par rapport à des patients avec une histoire d'infection virale prolongée.

D'autre part, Schmidt et al (132) proposent un bon résumé des connaissances actuelles sur la réponse immunitaire adaptative anti-BKPyV. Ils ont réalisé une étude trans-sectionnelle comparant les données immunologiques humorales et cellulaire de sujets sains avec des sujets transplantés rénaux sans complication ou avec complication rénale post-greffe. En ce qui concerne la population immunocompétente, le taux d'anticorps ainsi que la réponse spécifique T CD4 sont dépendant de l'âge et atteignent un pic d'efficacité entre 20 et 30 ans pour décroître ensuite avec l'âge. Les patients transplantés présentent une prévalence plus importante de LT spécifique anti-BKPyV. Enfin les patients présentant une réactivation virale post-greffe ont une plus forte proportion de lymphocytes T spécifiques mais une baisse de leur polyfonctionnalité.

Tableau IV : Synthèse des publications portant sur la réponse immunitaire cellulaire

Publication	Population	Résultats
Binggeli et al, Am J Transp 2007 (119) Retrospectif	10 donneurs sains 42 transplantés du rein dont : -22 patients avec CV plasmatique $>10^4$ cop/ml -20 patients avec CV plasmatique $<10^4$ cop/ml	Hausse de la réponse cellulaire spécifique anti-BKPyV ( fréquence de LT productrices d'IFN) chez les patients avec une réactivation virale modérée ( $<10^4$ cop/ml plasma).
Ginevri et al, Am J Transp 2007 (127) Prospectif	62 patients pédiatriques transplantés du rein	Baisse de la réponse cellulaire spécifique anti-BKPyV ( fréquence de LT productrices d'IFN) chez patients virémiques
Mueller et al, Transplantation 2011 (123) Rétrospectif	48 transplantés du rein dont : -19 patients avec une réactivation virale et des signes histologiques de NBKV -29 patients sans réactivation virale / ou réactivation faible et transitoire	Hausse de l'intensité de la réponse cellulaire spécifique anti-BKPyV (=fréquence de LTCD4) chez les patients avec une forte virémie -Réponse polyfonctionnelle IFN/TNF/IL2 plus fréquente chez les patients sans réactivation virale
Trydzenskaya et al Transplantation 2011 (124) Rétrospectif	44 transplantés du rein dont : -11 patients contrôlant la réactivation virale après une virémie prolongée (>3 mois) -16 patients contrôlant la réactivation virale après une virémie courte (<3 mois) -12 patients sans réactivation virale -5 patients sans contrôle de la réactivation virale	Hausse de la réponse cellulaire spécifique polyfonctionnelle anti-BKPyV ( fréquence de LT productrices d'IFN/IL2/TNF) chez les patients contrôlant rapidement l'infection
Schmidt et al, Am J Transp 2014 (126) Trans sectionnel	122 donneurs sains 25 patients hémodialysés 38 transplantés du rein dont : -24 patients avec une charge virale faible ou nulle -14 patients avec charge virale élevée	-Réponse T CD4 spécifique anti-BKv plus fréquente chez les patients transplantés du rein par rapport aux donneurs sains : hémodialysés. -Réponse TCD4 polyfonctionnelle plus fréquente chez les donneurs sains / hémodialysés que chez les transplantés du rein.
Schachtner et al, Am J transp 2015 (130) Prospectif (1 an de suivi)	Patients transplantés du reins dont : -24 patients avec réactivation virale -127 patients sans réactivation virale	-Risque de survenue d'une virémie associé à la perte de l'immunité spécifique anti AgT entre pré-transplantation et post-transplantation



#### **E.4 Intérêt de l'immunomonitoring des infections virales en transplantation d'organe**

La transplantation de cellule souche ou d'organe solide implique une immunosuppression induite pour éviter le rejet de greffe par l'hôte. De nombreux virus, ordinairement asymptomatiques chez le sujet sain, se réactivent et peuvent occasionner diverses pathologies. La famille virale la plus représentée dans ces infections opportunistes est celle des *Herpesviridae*, notamment le CMV, HSV1/2 (Herpes Simplex Virus 1/2), le VZV (Varicella-zoster virus) et HHV6. D'autres familles virales sont également susceptibles de déclencher des infections opportunistes après transplantation, tel que les *Adenoviridae* et bien entendu les *Polyomaviridae*.

Hormis les données virologiques, il semble désormais intéressant d'effectuer un suivi régulier des données immunologiques pour déterminer si le répertoire immun se reconstitue de manière adaptée ou s'il faut moduler le traitement immunosuppresseur post-greffe.

Actuellement, l'immuno-monitoring en transplantation rénale pour préserver le patient d'une infection à BKPyV n'est pas standardisé. Néanmoins des articles récents proposent des pistes pour surveiller la reconstitution des répertoires immuns et la prévention de la réactivation du BKPyV. On peut citer notamment le récent article de Schachtner et al (136) qui a suivi une cohorte de patient transplantés du rein et qui a quantifié l'immunité spécifique anti-BKPyV pré et post greffe (à M+1 / +2 / +3). Les patients démontrant une chute de l'immunité spécifique anti-BKPyV en post-greffe associé à une reconstitution du répertoire immun plus faible (CD3+ / CD4+ et CD8+) ont plus de risque de développer une virémie à BKPyV.

La démarche consistant à suivre l'activité immunologique du patient transplanté dans le cas du BKPyV s'appuie sur les recherches effectuées sur les autres virus suscités et notamment le CMV. Egli et al (137) ont dressé le panel des techniques disponibles pour suivre l'évolution de la réponse immunitaire post transplantation (ELISPOT, Cytométrie en flux avec marqueurs cellulaire ou cytokiniques, CMV-quantiféron pour la mesure de l'IFN, etc...). Ces outils, associés à la mesure de la charge virale, permettent de moduler efficacement le traitement immunosuppresseur selon les statuts sérologiques des couples donneurs-receveurs et de l'importance des cellules T les plus effectrices à court terme (CD8+) ou à long terme (CD4+).

---

## E.5 Modèle animal de néphropathie à polyomavirus

Parallèlement aux recherches cliniques, une équipe basée à Atlanta a développé un modèle de souris mimant la NBKV (138). Brièvement, le modèle consiste à transplanter un rein entre deux souches de souris différentes pour mimer une transplantation allogénique (les transplantations syngéniques servant de contrôle). L'infection par le MPyV (pendant murin du BKPyV) pouvant s'effectuer selon les besoins expérimentaux, les différents statuts sérologiques donneur-receveur peuvent être investigués. Plusieurs points ont ainsi pu être éclaircis sur le développement de l'infection virale à MPyV (et par analogie à BKPyV). Ils ont ainsi mis en évidence que la réactivation virale chez l'allogreffé est associée à une hausse de l'activité cytotoxique des LTCD8+ contre le greffon.

En s'appuyant sur les travaux d'Abend et al (139), qui montraient un effet inhibiteur de l'IFN $\gamma$  sur la transcription et la réplication du BKPyV dans un modèle *in vitro* (cellules tubulaires rénales primaires) ; ils ont démontré le rôle clé de l'IFN $\gamma$  dans le contrôle de l'infection *in vivo* (140). Tout d'abord lors de la primo infection, les souris KO pour les récepteurs à l'IFN $\gamma$  ont des charges virales plus élevées et sont plus susceptibles de développer des tumeurs associées au MPyV. Ensuite lors d'une transplantation rénale allogénique, les souris KO présentent des charges virales significativement plus élevées que les souris wild-type. Enfin, l'inoculation d'IFN $\gamma$  chez des souris wild-type avec une infection persistante au MPyV a permis de diminuer significativement la charge virale.

Pour une meilleure compréhension du développement de la NBKV et les facteurs de risques associés, leur dernière étude a souligné le rôle de divers facteurs de risque dans le développement de la néphropathie (141). Tout d'abord, une primo infection du receveur lors d'une transplantation avec un rein d'un donneur ayant une virémie aigue conduit systématiquement au décès de l'animal. La charge virale est également un facteur négatif pour la survie de l'animal et une correspondance des gènes de l'histocompatibilité ne procure pas de protection contre le développement de la NBKV. Enfin, ils ont mis en évidence le rôle de l'immunité cellulaire dans le développement de la NBKV en transplantant des reins de donneur séropositif chez des souris sans ganglions lymphatique et sans rate (donc sans réponse immunitaire adaptative). Le taux de survie de ces souris une fois transplantées est de 100% malgré des charges virales élevées.

Cependant, bien que ces résultats soient prometteurs et ouvrent des pistes d'étude intéressantes, le modèle souris a des limites et l'analogie avec l'infection par le BKPyV n'est

pas toujours pertinente. En effet, le mode d'infection, la séroprévalence et la prise en charge des patients après transplantation chez l'Homme diffèrent grandement des conditions expérimentales *in vivo* sur le modèle souris.

## OBJECTIFS

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de facteurs de pathogénèse des infections à BKPyV, en abordant deux aspects complémentaires, l'un lié au virus, l'autre lié à l'hôte.

La première partie de la section résultats est axée sur la variabilité génétique de la région régulatrice non codante du BKPyV, dont les conséquences en termes de « virulence », même si elles sont fortement suspectées, ne sont pas formellement établies. Cette thématique a été abordée *in vitro* dans un modèle d'infection de cellules épithéliales rénales humaines, cellules primaires qui constituent les cibles privilégiées du virus *in vivo*. Afin de compléter ces données, nous avons également étudié la variabilité NCCR à partir d'extraits d'ADN de sang total sélectionnés dans la bibliothèque des patients transplantés de rein suivis au CHU de Nantes. L'ensemble des résultats présentés pour la partie *in vitro* résulte entièrement du travail personnel réalisé pendant la thèse. Une partie des données cliniques et virologiques décrites pour la partie *in vivo* a été collectée et analysée avec un interne en biologie médicale dans le cadre de sa thèse d'exercice.

Le second axe d'investigation a concerné l'étude de la réponse immunitaire spécifique anti-BKPyV. L'objectif principal de ce travail était de mesurer la réponse spécifique anti-BKPyV médiée par les lymphocytes T à un temps précoce post-greffe, et de corrélérer ces données avec le suivi virologique au cours de la première année post-greffe afin de déterminer leur intérêt éventuel pour prédire la survenue d'une infection à BKPyV. Cette partie a été menée en collaboration avec le service clinique de Néphrologie Immunologie et la plate-forme d'immunomonitoring du CHU de Nantes. Toute la partie bibliothèque et analyse de la réponse lymphocytaire T a été effectuée dans le cadre du travail de thèse, ainsi l'analyse statistique qui a été réalisée en collaboration avec la cellule statistique de la Cellule de Promotion de la Recherche Clinique du CHU de Nantes. Nous avons également mis à profit la bibliothèque afin d'étudier la cinétique de la réponse humorale anti-BKPyV, en collaboration avec Antoine Touzé.

## **PARTIE EXPERIMENTALE I**

**La variabilité de la région régulatrice non codante du polyomavirus BK : profils des réarrangements, conséquences sur les activités de réplication et de transcription du virus.**

Simon Mazalrey, Benjamin Oliveiro, Mélanie Bouvin, Bernard Besse, Berthe-Marie Imbert-Marcille, Céline Bressollette-Bodin

## A) Contexte de la recherche et objectifs

Les séquences NCCR du génome du BKPyV sont séparées selon leur organisation: séquence archétypes (wwNCCR) ou réarrangées (rrNCCR). Les séquences réarrangées apparaissent spontanément au cours de l'infection à BKPyV tant chez les porteurs sains que chez les transplantés rénaux. Dans le cadre de la transplantation rénale, il a été observé une corrélation de la fréquence de ces souches réarrangées avec une virémie prolongée non contrôlée (1).

Plus récemment, des analyses de séquences ont été effectuées *in silico* pour rechercher des sites de fixation pour les facteurs de transcriptions humains sur différentes séquences NCCR. Ces recherches ont abouti à plusieurs hypothèses dont la dernière implique une hiérarchisation des facteurs de transcription humains dans la transcription et la réplication virale. Ainsi les sites de facteurs de transcription sp1-1 et sp1-2 seraient des acteurs indispensables de la transcription virale. Les facteurs sp1-4, Ets1-1 et Ets-2 orienteraient le cadre de lecture de la transcription (vers les gènes précoces ou tardifs) et enfin les facteurs NFI auraient un rôle de modulation fine de la transcription.

L'objectif du travail réalisé au cours de la thèse était de comparer la cinétique d'apparition et les profils de réarrangements obtenus *in vitro*, sur des cellules épithéliales rénales tubulaires humaines, à des données obtenues *in vivo* à partir d'une cohorte de patients transplantés de rein. Nous voulions confirmer l'association entre réarrangement et augmentation de la capacité répliquative virale. Nous avons observé la cinétique d'apparition des rrNCCR après infection de hRPTECs par une urine de patient BKPyV positif, et corrélié l'apparition de ces réarrangements avec les cinétiques de réplication et de transcription des gènes viraux précoces et tardifs. Nous avons également étudié la fréquence de détection des formes réarrangées dans le sang de patients transplantés de rein suivis au CHU de Nantes, en association avec les données de charges virales sanguines et urinaires chez ces patients.

## B) Matériel et Méthode

### B.1 Patients :

Les échantillons sanguins de patients utilisés pour étudier la variabilité génétique de la région NCCR *in vivo* proviennent d'un groupe de 46 patients transplantés du rein sélectionnés parmi les patients transplantés de rein au CHU de Nantes entre novembre 2008 et novembre 2011 (**Fig 18**). Les patients ont été sélectionnés car présentant une virémie persistante à BKPyV, définie par au moins deux virémies consécutives supérieures à 1000 copies de génomes/ml. Parmi eux, 16 patients avaient une NBKv confirmée, ayant entraîné la perte du greffon chez 7 d'entre eux.

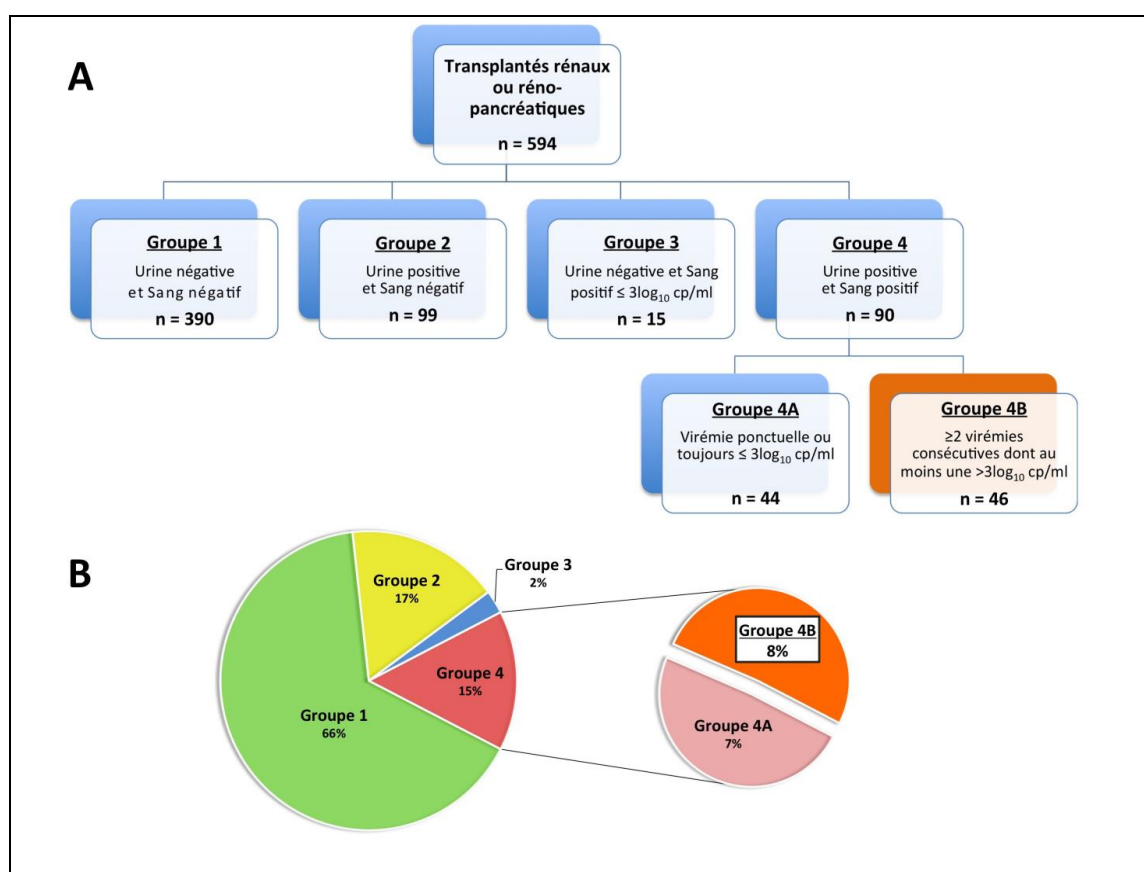


Figure 18 : Répartition des patients transplantés rénaux et réno-pancréatiques au CHU de Nantes entre 2008 et 2011 en fonction du monitoring virologique des infections à BKPyV

### B.2 Cellules épithéliales tubulaires proximales rénales humaines :

Les cellules HRPTEC (Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells, Lonza Walkersville, USA) sont des cellules épithéliales tubulaires proximales rénales humaines. Elles ne peuvent

être utilisées que sur un faible nombre de passages (<10). Elles correspondent au site naturel d'infection du BKPyV.

Au cours de la décongélation initiale, un aliquote de  $10^6$  HRPTECs est mis en suspension dans des flacons 25 cm<sup>2</sup> à bouchon ventilé contenant 5ml de milieu spécifique préalablement chauffé à 37°C pendant au moins 30 minutes, à raison de 150000 cellules/flacon. Le milieu spécifique REBM (Renal Epithelial cell Basal Medium, Clonetics®, Lonza, Walskerville, USA) utilisé pour la culture des HRPTEC est supplémenté avec les compléments de croissance REGM SingleQuots® (Renal Epithelial cell Growth Medium, Clonetics®, Lonza, Walskerville, USA) suivants : hEGF (human Epidermal Growth Factor) 0,5 ml, Hydrocortisone 0,5 ml, Epinephrine 0,5 ml, Insuline 0,5 ml, Triiothyronine 0,5 ml, Transferrine 0,5 ml, GA-1000 (Gentamicin sulfate Amphotericin B) 0,5 ml, SVF 2,5 ml (0,5%). Les flacons sont incubés à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu est renouvelé le lendemain puis deux fois par semaine. Lorsque les cellules sont confluentes à 70-80%, elles sont lavées avec du DPBS, trypsinées puis centrifugées à 200g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris dans 10 ml de REBM. Une numération sur cellule de Malassez est réalisée. Les cellules sont alors remises en culture en ajustant la concentration cellulaire à 30000 cellules/ml.

### **B.3 Souches de virus BK**

Les souches cliniques de BKPyV ont été isolées à partir d'échantillons urinaires fortement positifs en PCR BKPyV (charge virale  $>10^9$  cop/ml), collectés parmi les patients de la cohorte de patients transplantés de rein du CHU de Nantes. L'urine est filtrée avant d'être inoculée sur les cellules en culture.

### **B.4 Cinétiques d'infections des HRPTECs :**

#### ***B.4.1 Infection initiale***

L'infection est réalisée sur cellules confluentes à 70%. Les cellules sont d'abord lavées en PBS. Lors du premier cycle d'infection, un échantillon d'urine fortement positif filtré (filtre 0.45µm) est dilué en milieu de culture REGM auquel sont ajoutés 5 µl de polybrene pour un volume total de 1ml. Les cellules sont placées à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub>. Après 2h00, 4mL de REGM sont ajoutés par flacon. A J7 et à J14, deux aliquotes de 1mL de surnageant par flacon sont récupérés et conservés à -80°C. De même, les cellules sont trypsinées (trypsine 0,05%/EDTA 0,02%), lavées au PBS 1X, séparées en trois culots secs et conservées à -80°C.



---

### ***B.4.2 Transmission secondaire de l'infection***

A J14, une partie des cellules est congelée sous forme de culots secs pour les analyses moléculaires ultérieures (2 culots par flacon). L'autre partie des cellules ( $10^5$  cellules infectées) et 1 ml de surnageant sont prélevés et 4 séries de chocs thermiques de  $-80^{\circ}\text{C}$  à  $+37^{\circ}\text{C}$  sont réalisés pour casser les parois cellulaires et libérer les virions. Le pool surnageant/cellules lysées est utilisé pour l'infection de nouveaux flacons. Chaque cycle d'infection se déroule donc sur deux semaines et le « J14 » d'une cinétique permet l'infection « J0 » de la cinétique suivante. Cinq cycles d'infection successifs sont ainsi réalisés.

## **B.5 Extraction des acides nucléiques :**

### ***B.5.1 Urines des patients***

L'extraction d'ADN à partir d'urines de patients positives s'effectue par choc thermique, l'urine est bouillie à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes.

### ***B.5.2 Culots cellulaires***

L'extraction d'ADN à partir de culots cellulaires est réalisée avec la trousse d'extraction manuelle DNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Allemagne) en suivant les recommandations du fabricant. Le culot cellulaire est d'abord lysé puis fixé sur une membrane de silice. Les impuretés sont ensuite éliminées par des lavages avec différents tampons alcooliques. L'ADN est ensuite élué dans 200  $\mu\text{l}$  d'eau stérile et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

L'extraction d'ARN est réalisée à l'aide du kit RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Allemagne). Le principe est similaire à celui de l'extraction d'ADN mais une étape d'incubation avec de la DNase ( $37^{\circ}\text{C}$  15') est nécessaire pour éliminer les traces d'ADN résiduelles. De plus, après élution, les extraits sont aliquotés pour éviter les étapes de décongélation-congélation successives et préserver l'intégrité des ARN.

### ***B.5.3 Surnageants de culture***

L'ADN et l'ARN sont isolés à partir des surnageants de culture avec le kit NucleoSpin RNAvirus (Macherey Nagel). Brièvement, l'étape d'extraction consiste à lyser les cellules et à charger les acides nucléique sur des colonnes de silice. Après plusieurs lavages à l'aide de différent tampons alcooliques pour évacuer les impuretés cellulaires/protéiques, les acides nucléiques sont élués et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

---

### ***B.5.4 Extraits d'ADN de sang total***

La région NCCR a été amplifiée à partir d'extraits d'ADN de sang total positifs en PCR BKPyV. Ces extraits étaient stockés à -20°C au laboratoire de virologie (Secteur Biologie moléculaire). L'étape d'extraction avait été réalisée soit sur l'automate d'extraction MagNA Pure LC 2.0 (Roche®) soit sur l'automate d'extraction QIASymphony SP (QIAGEN®). Les différentes étapes de cette extraction sont les suivantes : lyse sous l'action de la Protéinase K, liaison des acides nucléiques sur des particules magnétiques (captées ensuite par un aimant), plusieurs lavages successifs puis une étape d'élution dans un tampon d'élution.

### **B.6 Quantification de l'ADN du BKPyV par PCR quantitative**

La qPCR duplex BKPyV albumine, est une PCR temps réel quantitative maison mise au point au laboratoire. Les séquences des amorces utilisées sont détaillées dans le **tableau V**.

Les amorces BKVRG1 et BKVRG2 amplifient un fragment de la région codant l'AgT tandis que les amorces ALBRG1 et ALBRG2 amplifient un fragment de l'albumine humaine. Ces duos d'amorces sont couplés respectivement aux sondes BKVRSG (reporter FAM) et ALBRSG (reporter JOE) qui émettent leur fluorescence quand elles sont dégradées lors de l'amplification.

Le mélange réactionnel est composé de : tampon 1X (Premix Ex Taq, Perfect Real Time, Takara Bio Inc, Shiga, Japon), amorces sens (BKVRG1, ALB1RG) et anti-sens (BKVRG2, ALB2RG) à 0,3 µM, sondes Taqman (BKVSRG, ALBSRG) à 0,1 µM, DMSO 2% et 5 µl d'extrait ADN. Le programme d'amplification comprend une étape d'activation Hot Start à 95°C pendant 5 minutes puis 45 cycles d'amplification (dénaturation 20 secondes à 94°C, hybridation 20 secondes à 57°C, élongation 20 secondes à 72°C).

Le standard de quantification pour le BKPyV est un plasmide contenant le produit d'amplification de la PCR BKPyV (142). Un stock de concentration 10<sup>8</sup> copies de standard BK/5µL est préparé en diluant un plasmide BK dans du tampon TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Le standard albumine est issu d'une suspension d'ADN humain à 0,2 µg/µl (Human Genomic DNA, Roche Diagnostic GmbH, Roche).

Une suspension de 5.10<sup>6</sup> copies/5 µl de standard pBK et 5.10<sup>4</sup> cellules/5 µl est alors obtenue en diluant 66 µl d'ADN humain de concentration 0,2 µg/µl et 10 µl de plasmide BK de concentration 10<sup>8</sup> copies/5 µl dans 124 µl de tampon TE. Cette suspension est ensuite diluée

de 10 en 10 pour obtenir la gamme standard BK/Alb couvrant des concentrations de 50 à  $5.10^6$  copies de génome BK/5 $\mu$ L et de 0,5 à  $5.10^4$  cellules/5  $\mu$ L.

### **B.7 Quantification des ARN viraux précoces (AgT) et tardifs (VP1)**

Deux RT-PCR ciblant respectivement une région (68pb) du gène précoce AgT et une région (83pb) du gène tardif VP1 ont été utilisées pour suivre la cinétique de transcription des ARNm viraux. Les couples d'amorces utilisés et leurs sondes associées, AGT1/AGT2/AGTS pour l'antigène grand T et VP1/VP2/VPS pour VP1, sont issues d'une publication et leurs séquences sont détaillées dans le **tableau V**.

Le mélange réactionnel est composé de : tampon One Step 1X, amorces sens (AgT1, VP1) et anti-sens (AgT2, VP2) à 0,4  $\mu$ M, sondes (AGTS et VPS) 0,1  $\mu$ M, T4 Gene 32 Protein (New England BioLabs® Inc) 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l, TaKaRa Ex Taq™ HS 0,1 U/ $\mu$ l, Prime Script RT 0,1 U/ $\mu$ l, 5  $\mu$ l d'ARN. Le programme d'amplification comprend une étape de rétro-transcription à 42°C pendant 5 minutes, une étape d'inactivation de la reverse-transcriptase à 94°C pendant 10 secondes, 5 cycles d'amplification (dénaturation 94°C 5 secondes, hybridation 55°C 20 secondes, élongation 72°C 15 secondes) suivis de 40 cycles (dénaturation 82°C 5 secondes, hybridation 45°C 20 secondes, élongation 72°C 15 secondes). Le seuil de détection est fixé à 0,025 unités de fluorescence et les extraits sont considérés comme positifs si leur seuil de fluorescence (Cycle threshold, Ct) est inférieur à 40.

Pour quantifier les ARN AgT et VP1, des gammes standard ont été produites sur le même principe que la gamme BK de la qPCR ADN. Les produits d'amplification AgT et VP1 ont été clonés dans un plasmide en utilisant le TOPO TA Cloning kit (Life Technologies). Après extraction plasmidique avec le kit « QIAprep Spin Miniprep » (Qiagen), amplification des inserts par PCR et dosage des produits d'amplification au nanodrop, des standards de concentration  $10^8$  copies de génome AgT et VP1/5 $\mu$ L sont préparés en diluant les plasmides dans du tampon TE. Des dilutions successives de 10 en 10 permettent d'obtenir des gammes standard pour AgT et VP1.

Les extraits d'ARN ont également été dosés au nanodrop. La quantité d'ARN est exprimée en copies de VP1/AgT par ng d'ARN total.

**Tableau V Amorces et sondes utilisées en biologies moléculaire (PCR / RT-QPCR)(1,142–144)**

Nom	Séquence	Utilisation	Position sur la séquence de référence	Taille Amplicon	Références bibliographiques
Amorce AGT1 sens	5'-ACT-CCC-ACT-CTT-CTG-TTC-CAT-AGG-3'	RT-PCR en temps réel		68 pb	Bernhoff et al., 2008 (142)
Amorce AGT2 anti-sens	5'-TCA-TCA-GCC-TGA-TTT-TGG-AAC-CT-3'				
Sonde AGTS	5' FAM-TTG-GCA-CCT-CTG-AGC-TAC-TAMRA 3'				
Amorce VP1 sens	5'-GGC-CTC-TTT-GTA-AAG-CTG-ATA-GC-3'	RT-PCR en temps réel	2318-2340	83 pb	Bernhoff et al., 2008 (142)
Amorce VP2 anti-sens	5'-CTG-TTG-TGT-TCC-AGA-GTC-GTT-AGT-A-3'		2400-2376		
Sonde VPS	5' FAM-CAG-CTG-CTG-ATA-TTT-G-TAMRA 3'		2351-2366		
Amorce BKVRG1 sens	5'-GAC-ATA-GCA-TGC-AAG-GGC-AGT-3'	qPCR en temps réel	4811-4831	84 pb	Bressollette-Bodin et al., 2005 (143)
Amorce BKVRG2 anti-sens	5'-CCT-CTT-TGC-CCA-GAT-ACC-CTG-3'		4895-4875		
Sonde BKVSRG	5' FAM-CAC-AGA-AGG-CTT-TTT-GGA-ACA-AAT-AGG-CCA-BHQ1-3'		4833-4862		
Amorce ALB1RG sens	5'-GCT-GTC-ATC-TCT-TGT-GGG-CTG-T-3'	qPCR en temps réel		74 pb	Bressollette-Bodin et al., 2008 (144)
Amorce ALB2RG anti-sens	5'-AAA-CTC-ATG-GGA-GCT-GCT-GGT-T-3'				
Sonde ALBSRG	5' JOE-CCT-GTC-ATG-CCC-ACA-CAA-ATC-TCT-CC-TAMRA 3'				
Amorce BRR1 sens	5'-GAG-CTC-CAT-GGA-TTC-TTC-3'	PCR en temps réel	5115-5131	473 pb	Gosert et al., 2008 (1)
Amorce BRR2 anti-sens	5'-CCA-GTC-CAG-GTT-TTA-CCA-3'		446-429		
Amorce BRR3 sens	5'-CCC-TGT-TAA-GAA-CTT-TAT-CCA-TTT-3'	PCR en temps réel	5132-5153	439 pb	Gosert et al., 2008 (1)
Amorce BRR4 anti-sens	5'-AAC-TTT-CAC-TGA-AGC-TTG-TCG-T-3'		429-409		

## B.8 Séquençage de la région NCCR :

### B.8.1 Amplification de la région NCCR

La région régulatrice non codante a été amplifiée grâce aux amorces externes (BBR1 et BBR2) ou internes (BBR3 et BBR4) qui amplifient respectivement des fragments de 484 et 450 paires de bases. Le mélange réactionnel de la PCR est constitué du Premix Ex Taq, Perfect Real Time (Takara) auquel on ajoute ces amorces à une concentration finale de 0,6µM ainsi que de 5µL d'extrait d'ADN. Le programme d'amplification comprend une étape d'activation Hot Start à 95°C pendant 5 minutes puis 45 cycles d'amplification : dénaturation 20 secondes à 94°C, hybridation 20 secondes à 56°C (interne) ou 54°C (externe), élongation 30 secondes à 72°C.

Afin d'augmenter la spécificité et la sensibilité, une PCR nichée ou semi-nichée a été réalisée sur certains échantillons. Le principe de la PCR nichée consiste à pratiquer une deuxième PCR en utilisant une deuxième série d'amorces spécifiques d'une région interne du premier produit ADN amplifié. Ainsi le fragment produit lors de la première PCR est utilisé comme matrice pour la seconde PCR. Le principe de la semi-nested est identique sauf qu'une

seule amorce interne est utilisée en couple avec une des deux amorces externes de la première PCR.

Avant séquençage, les produits d'amplification sont purifiés grâce à une exonucléase qui dégrade les ADN simples brins à 37°C. Cette protéase est désactivée en la mettant à une température de 80°C. La réaction de séquençage est ensuite effectuée avec le kit Big Dye terminator (Perkin Elmer) contenant la Taq polymérase, les quatre dNTP et les ddNTP couplés chacun à un fluorochrome. Les produits de séquençage obtenus après amplification sur thermocycleur sont purifiés par chromatographie d'exclusion sur gel G50 et séparés par électrophorèse dans le séquenceur capillaire en fonction de leur taille. Un laser couplé à 4 filtres permet d'exciter les fluorochromes et de déterminer chaque base du fragment.

Les séquences obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Mega5® et sont alignées avec la séquence NCCR de la souche de référence BK WW (ref Gen Bank AB211371.1)

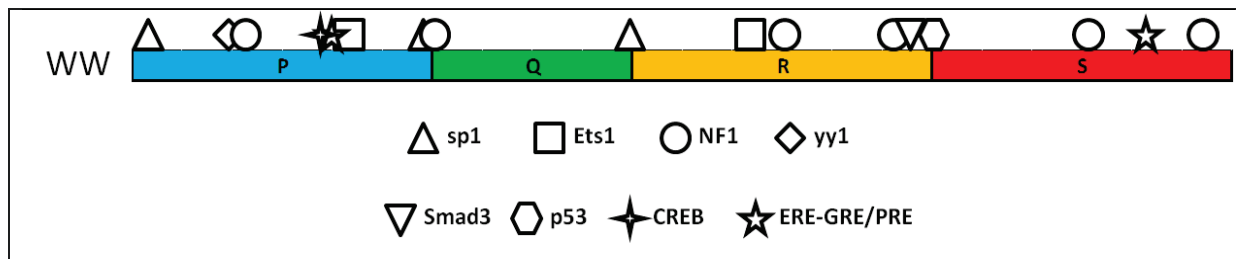
### ***B.8.2 Clonage de la séquence NCCR :***

Les produits d'amplifications de la région NCCR obtenus par PCR ont été clonés en suivant les recommandations du kit « TOPO vector (TOPO-TA Cloning Kit) ». Le mélange réactionnel pour la ligation du fragment amplifié dans le plasmide est composé de 2µL de produit PCR, 1 µL de solution saline, 2 µL d'eau stérile et 1 µL de TOPO vector fourni dans le kit. La transformation bactérienne s'effectue par choc thermique (4°C→42°C→4°C) dans les bactéries E. Coli TOPO10 fournies par le kit. Les bactéries sont ensuiteensemencées sur des géloses LB + ampicilline 50 µg/ml + X-gal et incubées à 37°C une nuit. La sélection des bactéries se fait grâce au système blanc-bleu et celles ayant intégré le plasmide sont réensemencées indépendamment sur des géloses. L'extraction de l'ADN plasmidique est effectuée avec le kit « QIAprep Miniprep » (Qiagen) qui consiste à casser les parois bactériennes, fixer les acides nucléiques sur une membrane de silice et, après différents lavages avec des tampons alcooliques, récupérer l'ADN par élution. Ce dernier est conservé à -80°C. Les extraits sont ensuite amplifiés par PCR NCCR, purifiés et séquencés.

### ***B.8.3 Identification bioinformatique des sites de fixation pour les facteurs de transcription cellulaires***

Les séquences NCCR archétypes sont composées de 5 blocs : O (142pb), P (68pb), Q (39pb), R (63pb) et S (63pb). A partir des publications de Liang et al et de Berthge et al ainsi que des logiciels de prédiction de sites AliBaba2.1 et PROMO, nous avons identifié 17 de ces sites représentés dans la **figure 19** sur la séquence WW. Les réarrangements qui peuvent

survenir lors d'une infection à BKPyV, à type de duplications et des délétions, peuvent modifier ces sites de fixation.



**Figure 19 Localisation des principaux sites de fixation aux facteurs de transcription cellulaire sur les blocs PQRS de la WW-NCCR.**

## C) Résultats

### C.1 Description de la cohorte

Le critère principal de sélection des patients au sein de la cohorte des transplantés était la détection de deux PCR BKPyV consécutives positives dans le sang dont au moins une avec une charge virale supérieure à 1000 copies de génome/ml. Deux patients sur les 46 sélectionnés ont été exclus en l'absence de conservation des extraits ADN. Sur les 44 patients restant, 40 avaient 2 virémies consécutives supérieures à  $10^3$  copies/ml dont 31 avec des virémies supérieures à  $10^4$  copies/ml.

Le délai moyen entre la date de la greffe et le 1er prélèvement de suivi était de 5 mois, mais avec une grande variabilité selon les patients (de 15 à 726 jours). Le délai moyen de la détection de la 1<sup>ère</sup> virémie positive était situé entre le 7<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> mois et le pic de virémie entre le 10<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> mois. La durée moyenne de virémie était de 12 mois (**Tableau VI**).

**Tableau VI Description du groupe de patients pour l'étude de la variabilité de la région NCCR**

<b>Données cliniques</b>		
Sexe masculin, n(%)		27/44 (61,4%)
Age, médiane (min-max)		55,5 (20-79)
Type de greffe, n (%)	Rénale	42/44 (95,5%)
	Réno-pancréatique	2/44 (4,5%)
<b>Données biologiques</b>		
Charge virale au pic de virémie, moyenne (min-max) en log <sub>10</sub> cp/mL		5,2 (3,1-7,8)
Charge virale à la première détection de virémie, moyenne (min-max) en log <sub>10</sub> cp/mL		4,3 (2-7,1)
Délai entre la greffe et le 1er temps de suivi réalisé par PCR dans le sang, moyenne (min-max) en jours		159 (15-726)
Délai entre la greffe et la détection de la 1 <sup>ère</sup> virémie, moyenne (min-max) en jours		233 (35-1030)
Délai entre la greffe et la détection du pic de virémie, moyenne (min-max) en jours		326 (78-1390)
Délai entre la greffe et la détection de la dernière virémie, moyenne (min-max) en jours		589 (78_1521)
Durée du suivi par PCR BKPyV, moyenne (min-max) en jours		718 (97-1546)
Durée moyenne de la virémie, moyenne (min-max) en jours		356 (12-1222)

Cent-quarante-sept échantillons ont été analysés, chez les 44 patients. La région NCCR a pu être amplifiée et séquencée sur 56 prélèvements chez 31 patients (**Fig 20**). Nous avons pu séquencer les régions NCCR de 46/57 (80.7%) des échantillons sanguins avec une charge virale supérieure à 4,4 log<sub>10</sub> cp/ml, mais seulement 10/61 (16.4%) des échantillons

dont la charge virale se trouvait entre 3.2 et 4.4 log<sub>10</sub> cp/ml. Nous n'avons pas réussi à amplifier la région NCCR des échantillons dont la charge virale était inférieure à 3.2log<sub>10</sub> cp/ml (n=29).

Sur les 31 patients pour lesquels au moins une séquence NCCR était analysable, une forme réarrangée était détectée chez 11 d'entre eux (**fig 21**). Parmi eux, 5 patients avaient une sous population réarrangée détectée pour la première fois dès la 1<sup>ère</sup> virémie, 4 patients lors du pic de virémie et 2 patients après le pic de virémie.

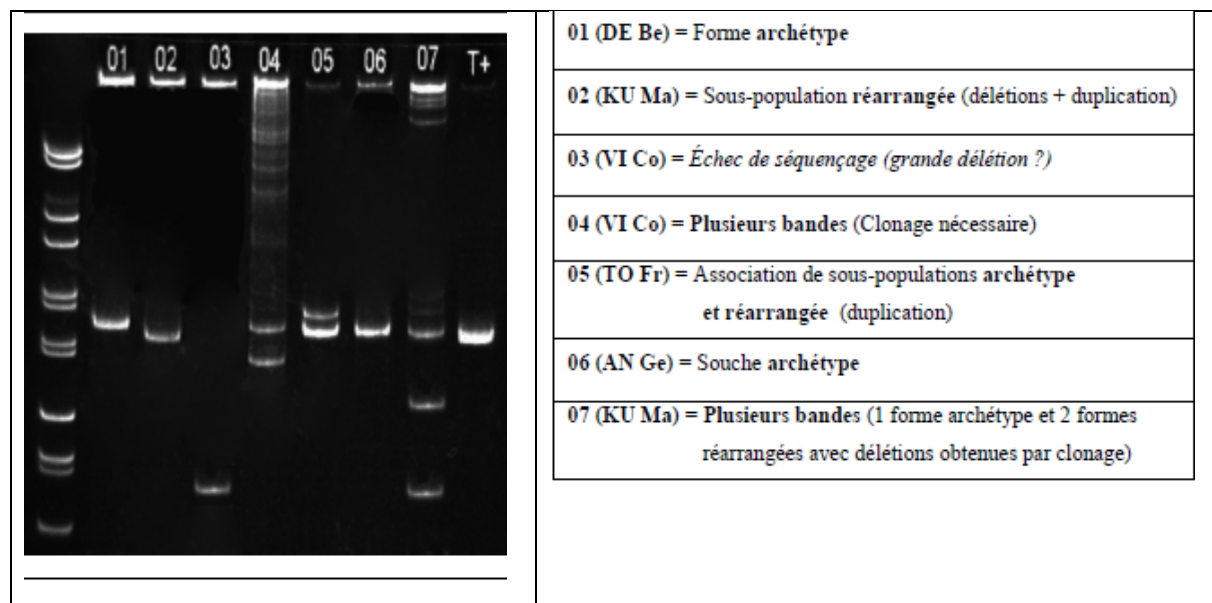


Figure 20 Exemple d'une migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide des produits d'amplification obtenus par PCR NCCR.

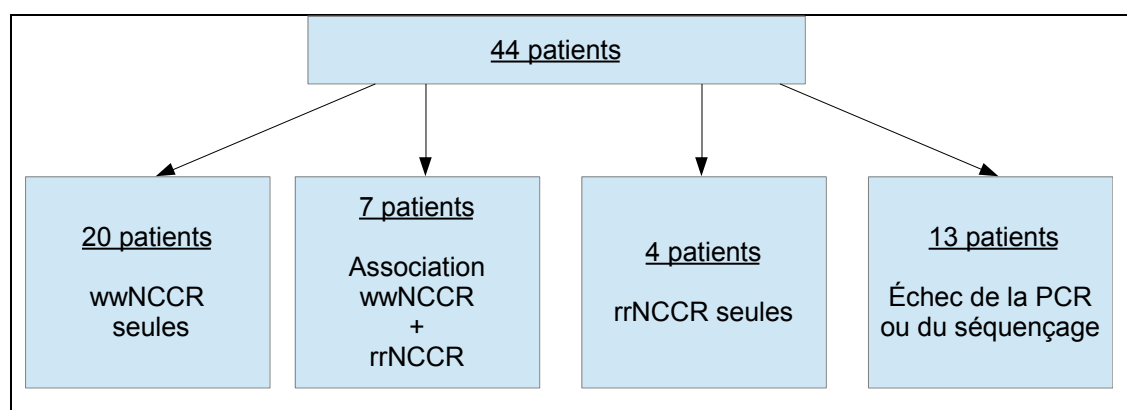


Figure 21 : Répartition des patients en fonctions des résultats du séquençage NCCR



---

## C.2 Profils des séquences NCCR *in vitro* et *in vivo*.

### C.2.a Profils des séquences NCCR issus des cinétiques d'infection *in vitro*

Des cycles d'infection *in vitro* ont été réalisés pour étudier les réarrangements spontanés de la région NCCR apparaissant au cours du temps. Quatre expériences ont été réalisées et les séquences obtenues à l'issue de ces infections sont répertoriées dans la **figure 22**.

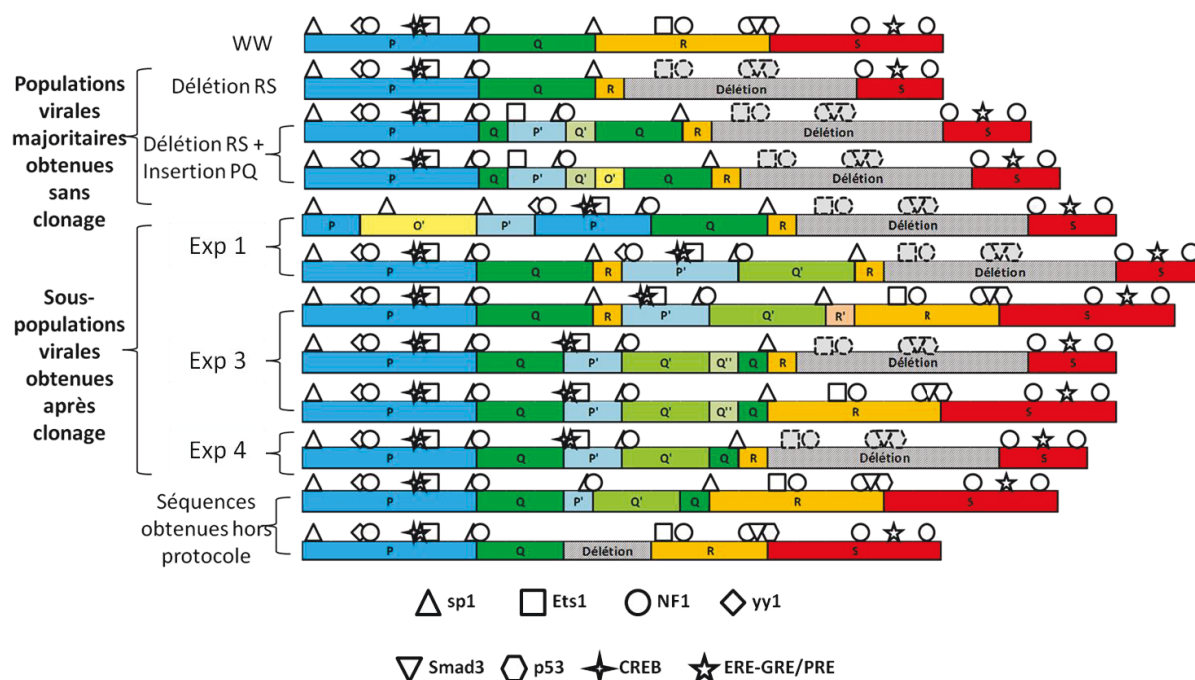
Une première analyse des séquences obtenues sans clonage a permis d'identifier les populations virales majoritaires. Les séquences WW restent détectables dans le temps diversement au cours des quatre expériences. Cependant le premier réarrangement observé demeure toujours le même, à savoir une délétion R5-S26. Elle apparaît à des temps précoces dans les expériences 1 et 4 (14<sup>ème</sup> jour de la deuxième cinétique ou C2J14) et à des temps plus tardifs pour l'expérience 2 (14<sup>ème</sup> jour de la quatrième cinétique ou C4J14) et l'expérience 3 (7<sup>ème</sup> jours de la quatrième cinétique ou C4J7). La délétion RS implique la disparition de sites de fixation aux facteurs de transcription ets1-2 (R22), NFI-3 (R32), NFI-4 (R51), smad3 (R57) et p53 (R53).

Un deuxième réarrangement est observé plus tardivement dans deux expériences : une insertion P49-Q5. Cette dernière apparaît respectivement à C4J14 et à C4J7 dans les expériences 3 et 4. Cette insertion PQ implique la duplication des sites de fixations aux facteurs de transcription suivants : sp1-1(P66), NFI-2(P68) et ets1-1(P48). A noter que dans le cas de l'expérience 4, une insertion de cinq bases issues du bloc O est également dupliquée mais les recherches de sites *in silico* n'ont pas permis de l'associer à un facteur de transcription.

L'utilisation du clonage avant le séquençage a permis d'isoler des sous-populations virales minoritaires dans les expériences 1, 3 et 4. En dehors de la délétion RS et de la duplication PQ précédemment décrites, les réarrangements observés consistent en une duplication plus importante des blocs PQ (plus ou moins grande selon les clones) et des sites de fixations aux facteurs de transcriptions correspondants : CREB (cAMP-responsive element binding protein) et GRE. D'autres réarrangements moins systématiques sont apparus parmi les clones. On peut notamment citer une duplication d'une cinquantaine de bases du bloc O et du site sp1 qui s'y trouve. Une duplication des 5 premières bases du bloc R permet l'apparition d'un autre site sp1 à la jonction QR. A noter que deux sous-populations de

l'expérience 3 ne possèdent pas la délétion RS qui semble pourtant être le réarrangement le plus fréquent.

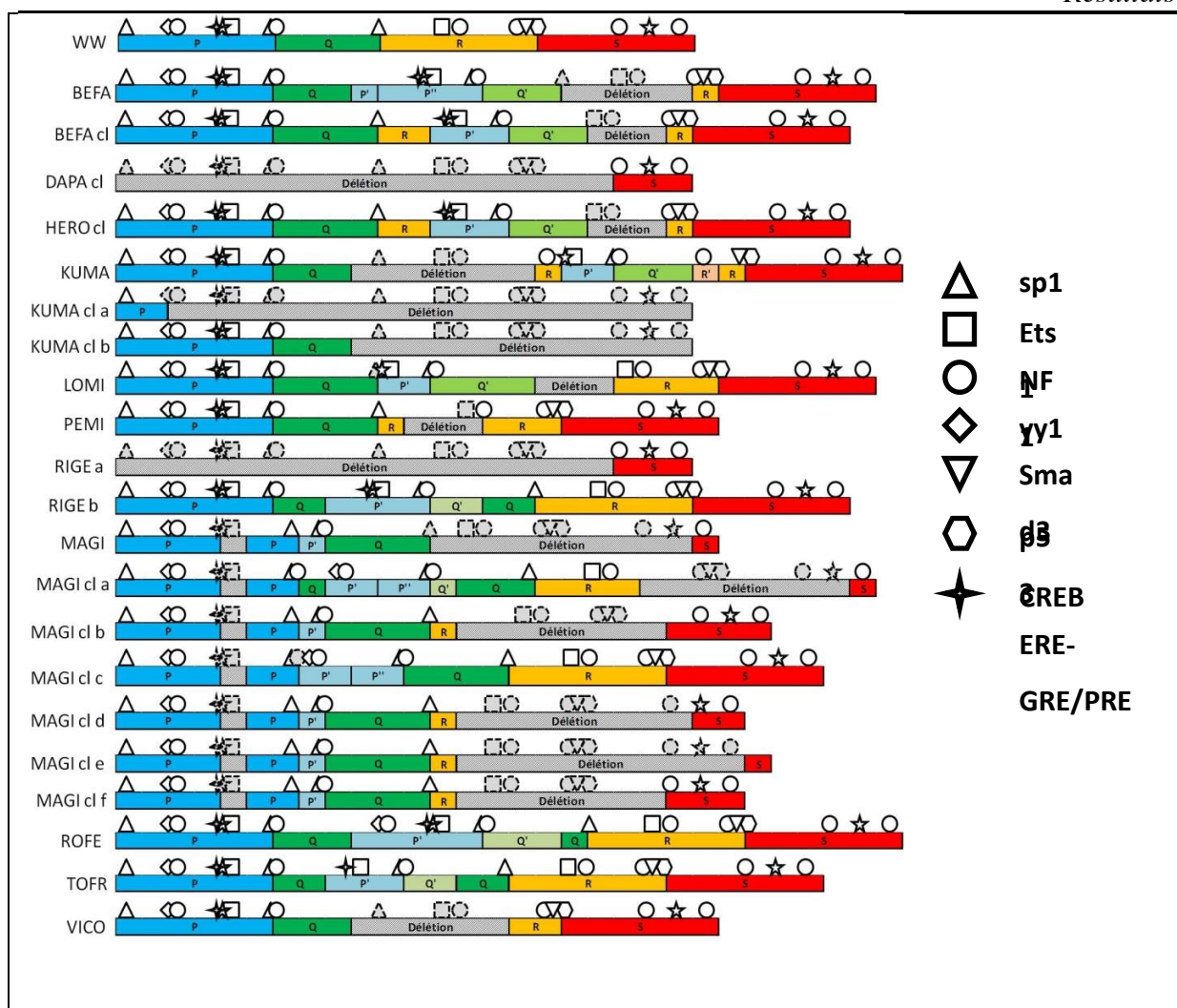
Deux autres séquences ont été obtenues hors-protocole. La première présente une duplication de la jonction PQ (sites sp1 et NFI) mais sans la délétion RS. La seconde présente une délétion de la jonction QR (disparition d'un site sp1).



**Figure 22 Représentation schématique des RR-NCCR obtenues *in vitro*.** Les séquences ont été obtenues au cours de 5 cinétiques successives d'infection de cellules hRPTECs. L'infection initiale (J0 du 1<sup>er</sup> cycle) est réalisée en inoculant les cellules avec un aliquote d'urines BKPvY fortement positives. La délétion RS apparaît à des temps différents selon les expériences (C2J14 pour les expériences 1 et 4 ; C4J7 pour l'expérience 3 et C4J14 pour l'expérience 2). L'insertion PQ est apparue dans l'expérience 4 à C4J7 et dans l'expérience 3 à C4J14. D'autres réarrangements minoritaires ont pu être révélés par clonage.

### C.2.b Profils des séquences NCCR issus des cinétiques d'infection *in vivo*

Nous avons isolé 21 sous-populations virales réarrangées différentes à partir des 11 patients ayant soit des rrNCCR seules soit des rrNCCR en association avec des wwNCCR (**fig 23**). Les profils obtenus à partir des échantillons de patients montrent une grande diversité mais néanmoins des réarrangements similaires sont retrouvés. Ainsi, sur les 11 patients analysés, 9 d'entre eux (81.8%) avaient au moins une délétion, 8 avaient au moins une duplication et 6 patients présentaient une forme réarrangée délétion + duplication (**Tableau VII**).



**Figure 23 Représentation schématique des rrNCCR détectées dans les échantillons sanguins de patients transplantés du rein.** Chaque patient est représenté par un code de quatre lettres et les séquences obtenues à la suite d'un clonage sont notées « cl ». Les délétions sont indiquées en gris. Les duplications sont indiquées en bleu pâle pour P, en vert pâle pour Q et en rose pour R.

Les sites majoritairement délétés sont situés principalement dans le bloc R. Ce sont les sites ets1-2(R22), NFI-3(R32), NFI-4(R51), smad3(R57) et p53(R53) avec respectivement 74.5%, 71.4%, 57.1%, 47.6 et 47.6% de délétion dans les régions rrNCCR analysées (**Tableau VIII**). En revanche les sites majoritairement dupliqués sont situés principalement dans le bloc P, avec Sp1-1(P66), NFI-2(P68) et ets1-1(P48) avec respectivement 42.9%, 42.9% et 38.1% de duplication dans les régions rrNCCR analysées

Bien que les réarrangements observés *in vivo* ne soient pas exactement identiques à ceux obtenus *in vitro*, on note de fortes similitudes sur les blocs touchés. C'est en effet le bloc RS qui est délété et le bloc PQ qui est dupliqué.

Tableau VII Répartition des délétions et insertions parmi les patients présentant des rrNCCR.

Type de réarrangements et bloc concerné		Effectif
Délétion	Délétion P	4/11 (36,4%)
	Délétion Q	6/11 (54,5%)
	Délétion R	9/11 (81,8%)
	Délétion S	4/11 (36,4%)
	Délétion QR	6/11 (54,5%)
	Délétion RS	4/11 (36,4%)
	Délétion QRS	3/11 (27,3%)
	Délétion PQRS	3 /11 (27,3%)
	<b>TOTAL DELETION</b>	<b>9/11 (81,8%)</b>
Insertion	Duplication P	8/11 (72,7%)
	Duplication Q	8/11 (72,7%)
	Duplication R	1/11 (9,1%)
	Duplication PQ	8/11 (72,7%)
<b>TOTAL DUPLICATION</b>	<b>8/11 (72,7%)</b>	
<b>Association Délétion + Insertion</b>		<b>6/11 (54,5%)</b>

Tableau VIII Proportion des rrNCCR selon les modifications (délétion / insertion) observées au niveau des sites de fixation aux facteurs de transcription

	DEL, n(%)	INS, n(%)
ETS1-2 (R22)	15 (71.4)	0
NFI-3 (R32)	15 (71.4)	0
NFI-4 (R51)	12 (57.1)	1 (4.8)
Smad3 (R57)	10 (47.6)	0
p53 (R63)	10 (47.6)	0
SP1-4 (Q33)	8 (38.1)	0
NFI-5 (S32)	6 (28.6)	0
yy-1 (P22)	4 (19.1)	3 (14.3)
SP1-3 (P66)	3 (14.3)	9 (42.9)
ETS1-1 (P48)	3 (14.3)	8 (38.1)
NFI-1 (P26)	3 (14.3)	3 (14.3)
NFI-2 (P68)	3 (14.3)	9 (42.9)
NFI-6 (S52)	3 (14.3)	0
SP1-2 (P7)	2 (9.5)	0

### C.3 Impact des réarrangements sur l'activité répllicative et transcriptionnelle du BKPyV

#### *C.3.a Cinétique de répllication génomique et transcription des ARNm viraux précoces et tardifs au cours des cinétiques d'infection*

Dans le but d'étudier l'impact que peuvent avoir les réarrangements identifiés, l'activité de répllication et de transcription virales ont été mesurées en quantifiant les copies de

génom/cellule ( $\log_{10}\text{cop/cellule}$ ) et copies d'ARN/ng d'ARN total ( $\log_{10}\text{cop/ngARN}$ ) par qPCR et RT-qPCR (**fig 24**).

Le niveau « basal » de réplication a été déterminé en faisant une moyenne de la quantité d'ADN (en cop/cellule) sur les points de cinétique avant l'apparition d'une forme réarrangée. Ces valeurs basales sont en dessous de 2  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  pour les quatre expériences menées en parallèle. Plus précisément, les charges virales moyennes pour les quatre expériences sont de 1.3  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  pour l'expérience 1, de 1.8  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  pour l'exp 2, de 1.9  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  pour l'exp3 et de 1.7  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  pour l'exp 4.

Le premier réarrangement observé dans les quatre expériences est une délétion de la région RS (de R5 à S26). La charge virale augmente d'un facteur allant de 2 à 3  $\log_{10}$  suivant les expériences dans une période de temps d'un cycle (14 jours) après l'apparition de ce réarrangement.

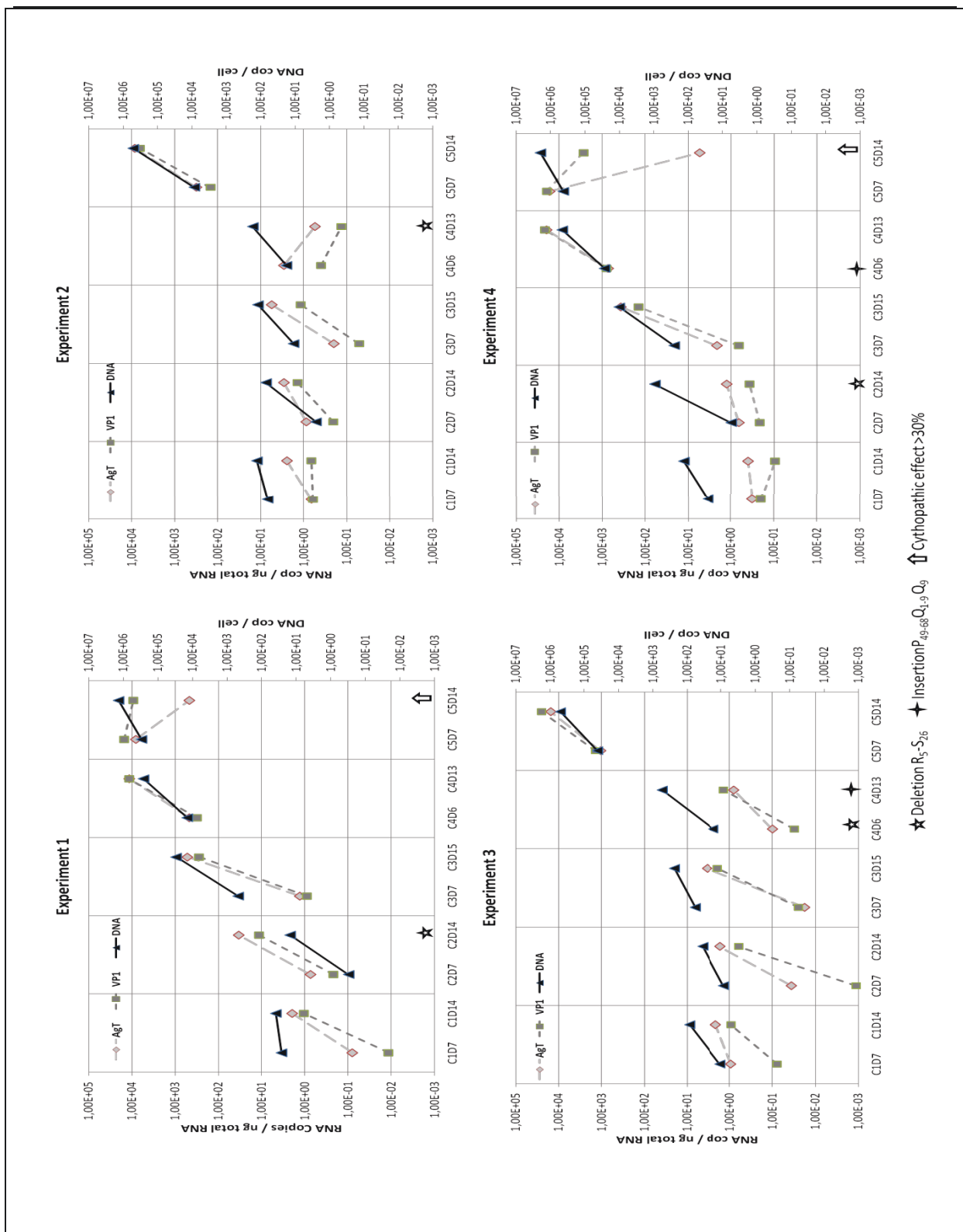
Dans le cas de l'expérience 1, la délétion RS apparaît au 14<sup>ème</sup> jour du deuxième cycle (C2J14) d'infection avec une charge virale de 1.2  $\log_{10}\text{cop/cellule}$ . Un cycle de multiplication plus tard (ici C3J14), la charge virale observée est de 4.5  $\log_{10}\text{cop/cellule}$ . Cette hausse de la charge virale est retrouvée dans les trois autres expériences de 2.2  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  (C4J13) à 5.7  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  (C5J14) pour l'expérience 2 ; de 1.2  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  (C4J7) à 4.6  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  (C5J7) pour l'expérience 3 ; et de 2.0  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  à 4.0  $\log_{10}\text{cop/cellule}$  pour l'expérience 4.

Cette hausse de la réplication virale entre le point de cinétique d'apparition de la délétion R-S et le point de cinétique à J+14 s'accompagne d'une activité transcriptionnelle plus importante. En effet, avant l'apparition de la délétion R-S, la quantité d'ARN AgT est en moyenne de 1.3, 1.9, 1.8 et 1.3  $\log_{10}\text{cop/ngARN}$  respectivement pour les expériences 1, 2, 3 et 4. La quantité d'ARN AgT augmente d'un facteur allant de 1 à 4  $\log_{10}$  suivant les expériences dans une période de temps d'un cycle (14 jours) après l'apparition de la délétion RS. Ainsi la quantité d'ARN AgT augmente de 3.0 à 4.3  $\log_{10}\text{cop/ngARN}$  pour l'exp1; de 1.5 à 5.9  $\log_{10}\text{cop/ngARN}$  pour l'exp2; 0.5 à 4.4  $\log_{10}\text{cop/ngARN}$  pour l'exp3 et de 2 à 4.2  $\log_{10}\text{cop/ngARN}$  pour l'exp4.

De même que pour l'ARN AgT, la transcription de VP1 augmente dans les quatre expériences après l'apparition de la délétion R-S. Les quantités moyennes des ARN VP1 sont respectivement de 0.9, 1.4, 1.4 et 0.8  $\log_{10}\text{cop/ngARN}$  pour les expériences 1 à 4 avant la délétion R-S. La quantité d'ARN VP1 est augmentée d'un facteur de 1.48 à 5.0 log selon les flacons entre le point de cinétique correspondant à la première détection de la délétion R-S et

---

le J+14. La quantité d'ARN VP1 augmente de 2.5 à 4.0  $\log_{10}\text{cop}/\text{ugARN}$  pour l'exp1; de 0.9 à 5.8  $\log_{10}\text{cop}/\text{ugARN}$  pour l'exp2; de 1 à 4.6  $\log_{10}\text{cop}/\text{ugARN}$  pour l'exp3 et 0.5 à 3.8  $\log_{10}\text{cop}/\text{ugARN}$  pour l'exp4.



**Figure 24** Quantité de génome par cellules ainsi que d'ARN VP1 et AGT par nanogrammes total d'ARN. Les graphes représentent les 4 expériences de cinétique d'infection menées en parallèle. Les abscisses représentent les point de prélèvements présentés sous la forme «Cinétique Day ou CxDy » avec « x » le numéro de la cinétique et « y » le jour du prélèvement dans la cinétique. Les ordonnées gauches représentent les copies d'ARN de VP1 (carré vert) et d'AgT (losange gris) par ng d'ARN total. Les ordonnées droites représentent les copies d'ADN par cellule (triangle bleu). L'étoile, la croix et la flèche en bas des graphiques représentent respectivement l'apparition de la délétion R<sub>5</sub>-S<sub>26</sub>, de l'insertion P<sub>49-68</sub>Q<sub>1-9</sub>Q<sub>9</sub>, et d'un effet cytopathique.

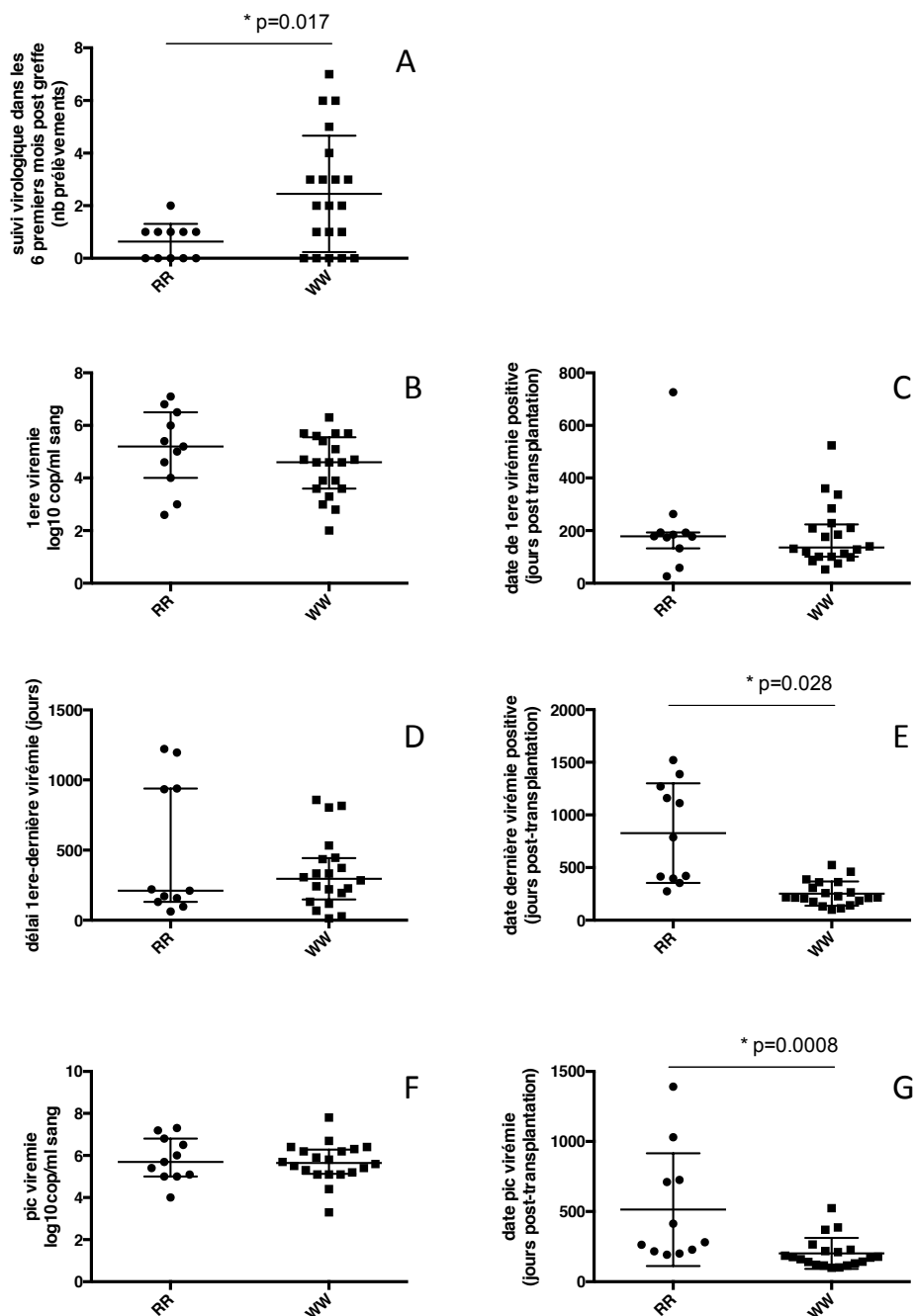
---

**C.3.b Impact des réarrangements sur l'évolution de la virémie et sur la survenue d'une NBKV :**

Les charges virales moyennes lors de la première virémie détectée positive entre les patients ayant une forme RR ou WW sont respectivement de 5.1 et 4.4 log<sub>10</sub>cop/ml sang à la première virémie (p=ns). De même, au pic de virémie les charges virales moyennes sont respectivement de 5.82 et 5.67 log<sub>10</sub>cop/ml sang pour les patients avec une forme RR et pour les patients avec une forme WW. La durée de la virémie n'est pas significativement plus longue pour ces patients (moyenne 486 vs 338 jours). La détection d'une forme réarrangée n'est pas associée à des charges virales sanguines plus élevées ni au moment de la première virémie, ni au pic virémique (**Fig 25**). Par contre, le monitoring virologique des patients semble différent, puisque les patients chez lesquels une forme réarrangée est détectée ont été moins bien suivis au cours des 6 premiers mois post-greffe (nombre médian de prélèvements : 1 (min 0-max2) dans le groupe RR, 2 (0-7) dans le groupe WW. De même, le pic de virémie et la dernière virémie positive sont plus tardifs dans le groupe RR que dans le groupe WW.

Le **tableau IX** résume les probabilités de NBKV pour les 44 patients présentant une réactivation virale ainsi que le type de sous-population virale retrouvée (WW, RR ou inconnue). Une forme réarrangée est retrouvée chez 7 patients sur 16 (43,7%) présentant une NBKV prouvée et chez 4 patients sur 18 présentant une NBKV probable (22,2%). Dans ce groupe de patients, la présence d'une forme réarrangée n'est donc pas associée à une plus forte probabilité d'avoir une NBKV prouvée par rapport à une NBKV probable (p=0,466 test de Fisher) (**Tableau X**).





**Figure 25 : Incidence des formes archétypes et réarrangées sur le suivi virologique des patients transplantés du rein.** A) Nombre de prélèvements dans les 6 premiers mois post-greffe. B) Charge virale à la première virémie. C) Date de la première virémie post-transplantation. D) Délai (en jours) entre la première et la dernière virémie. E) Date de la dernière virémie positive. F) Charge virale au pic de la virémie. G) Date du pic de la virémie

Tableau IX Type de sous-populations virales par classe de probabilité de néphropathie à BKPyV

		Néphropathie à BKPyV			
		Prouvée (16/44)	Probable (18/44)	Possible (6/44)	Absence (4/44)
Type de souche de BKPyV	Sauvage (WW)	9	10	0	1
	Réarrangée (RR)	7	4	0	0
	Inconnue	0	4	6	3

Tableau X Relation entre la présence d'une NBKV prouvée ou probable et la présence d'une forme WW ou RR.

NBKV	Patients avec forme WW n=19	Patients avec forme RR n=11	Significativité (test de Fisher)
	Prouvée (effectif)	9	
Probable (effectif)	10	4	

## D) Conclusion-Discussion

Le polyomavirus BK est un virus responsable de néphropathies interstitielles chez les transplantés rénaux. La survenue de cette complication peut aller jusqu'à la perte du greffon en l'absence d'une prise en charge adaptée. Bien que la réactivation virale et l'apparition d'une NBKV semblent principalement liées au degré d'immunosuppression des sujets, les causes de réactivations virales sont polyfactorielles.

En premier lieu, comme l'a montré l'étude de Gosert et al (2008), la variabilité génétique de la région NCCR du BKPyV semble être impliquée dans la pathogénicité du virus notamment vis-à-vis des atteintes tissulaires. La région NCCR est la région régulatrice de l'expression des gènes du BKPyV tant dans leur intensité que dans leur temporalité (gènes précoces puis tardifs). Elle est constituée de 5 blocs O, P, Q, R et S contenant chacun de nombreux sites de fixations à des facteurs de transcriptions viraux ou cellulaires. Les séquences réarrangées apparaissent spontanément *in vivo* chez les transplantés du rein et *in vitro* à partir de passages successifs sur cellules.

Les séquences obtenues *in vitro*, à partir de l'infection de cellules HRPTEC par de l'urine de patient infecté ont permis d'identifier deux zones préférentielles pour les réarrangements. La première est une délétion RS impliquant la disparition de 5 sites de

fixation aux facteurs de transcription. Ces sites de fixation sont : ets1-2(R22), NFI-3(R32), NFI-4(R51), smad3(R57) et p53(R53). La deuxième zone est la jonction PQ avec une duplication de trois sites de fixation aux facteurs de transcriptions que sont sp1-1(P66), NFI-2(P68) et ets1-1(P48).

Hormis les séquences présentant plusieurs blocs délétés, les séquences obtenues *in vivo* montrent des réarrangements similaires à ceux *in vitro*. En effet, les 5 sites de fixations les plus fréquemment délétés chez les 21 sous-populations virales isolées coïncident avec ceux *in vitro* : ets1-2(R22), NFI-3(R32), NFI-4(R51), smad3(R57) et p53(R53). De même, les trois principaux sites dupliqués correspondent à ceux retrouvés *in vitro* : sp1-1(P66), NFI-2(P68) et ets1-1(P48).

Des expériences de clonage ont été utilisées sur les échantillons obtenus *in vivo* et *in vitro* et ont permis d'identifier des sous-populations virales minoritaires dans les échantillons. Il est cependant indiscutable que la méthode du séquençage de Sanger est trop limitée pour être entièrement représentative des différents profils génomiques malgré une différenciation des différentes souches par clonage. L'utilisation de séquençage à haut débit apparaît donc indispensable pour dresser une carte complète des séquences retrouvées dans un échantillon.

Pour étudier le lien entre néphropathies à BKPyV chez les transplantés rénaux et présence de sous-populations réarrangées, les caractéristiques clinico-biologiques de deux groupes (patients WW ou RR) ont été comparés en fonctions du profil de leur NCCR. Aucune différence significative au niveau de l'intensité et de la durée de la virémie n'a été observée. Ces résultats vont à l'encontre de ceux décrits dans la publication de Gosert qui observait des charges virales plus élevées pour les patients avec formes réarrangées (1). Deux limites de notre étude peuvent expliquer cette discordance. La première est le recueil rétrospectif des données avec un suivi non-homogène et tardif pour certains patients. Une deuxième limite est l'échec de l'amplification de la région NCCR pour 13 patients, possiblement à l'origine d'un biais sur la répartition des patients entre les groupe archétype et réarrangés. Par contre, les observations que nous avons effectuées *in vitro* confirment l'augmentation des activités de réplication et de transcription après l'apparition des réarrangements de NCCR. En effet les résultats obtenus sur la charge virale de nos quatre expériences en parallèle ont permis d'identifier une hausse de 2 à 3 log dans les 14 jours suivant l'apparition du premier réarrangement (délétion R5-S26). Cette augmentation de la charge virale et de l'activité transcriptionnelle est cohérente avec les résultats précédemment publiés sur le rôle des différents sites de fixation aux facteurs de transcription. En effet, le site ets1-2 (R22), est un site prépondérant dans le contrôle de l'activité répllicative virale (112). De même les sites

NFI-3, NFI-4 et Smad 3, ont un rôle démontré de contrôle de l'orientation de la réplication virale (108,111,112). NFI-3 a été montré comme un inhibiteur de la transcription des gènes tardifs (108,145) tandis que NFI-4 semble inhiber la transcription des gènes précoces (112). La délétion de deux inhibiteurs de la transcription est cohérente avec les hausses des ARNm AgT et VP1 observés *in vitro*. La délétion de ces sites a déjà été associée à des hausses de la réplication virale tant dans des infections de cellules *in vitro* que chez des patients virémiques. A partir des échantillons cliniques, le site sp1-4 est également délété. Ce dernier, à l'instar d'Ets1-2 est primordial dans le contrôle de la réplication virale, et sa délétion implique une forte hausse de la charge virale chez les patients. La duplication de la jonction PQ arrive plus tardivement que la délétion RS dans les expériences *in vitro*. Le site sp1-1 semble être un activateur de la réplication virale, en effet son silencing induit une baisse de la production virale *in vitro* (112). De même, Liang et al ont montré que NFI-2 avait lui aussi un rôle d'activateur dans la réplication virale (108).

Ces résultats pris dans leur ensemble confirment le rôle des sites de fixation aux facteurs de transcription de la région NCCR dans le contrôle de la réplication et la transcription virale. Pour aller plus loin, deux pistes sont à envisager. La première consisterait à monter une cohorte prospective avec un suivi longitudinal pour obtenir une base homogène de données cliniques. Les expériences *in vitro* mériteraient d'être reproduites avec d'autres urines de patients comme échantillon de départ. Enfin l'utilisation du séquençage à haut débit permettrait d'obtenir un aperçu plus complet des différentes sous-populations virales présentes tant chez les patients que dans les expériences *in vitro*.

**PARTIE EXPERIMENTALE II :**

**Étude de la réponse immunitaire spécifique anti-BKPyV dans une cohorte prospective de patients adultes transplantés rénaux.**

Simon Mazalrey, Cécile Braudeau, Dorian McIlroy, Antoine Touzé, Maryvonne Hourmant, Audrey Rodallec, Marie Rimbert, Aurélie Le Thuault, Berthe-Marie Imbert-Marcille, Regis Josien, Céline Bressollette-Bodin

## **A) Contexte de la recherche et objectifs**

Après une transplantation rénale, la réactivation du BKPyV peut être détectée dans les urines (virurie) et dans le sang (virémie) respectivement chez 50 et 10-30% des patients. A terme elle peut provoquer une néphropathie interstitielle (NBKV) et conduire à la perte du greffon (142,146).

Il n'y a actuellement aucun traitement spécifique pour prévenir ou traiter les infections BKPyV. Cependant il est recommandé d'effectuer un dépistage précoce post-transplantation afin de détecter de hauts niveaux de virurie/virémie avant le développement de dommages histologiques (147) Actuellement, seule la modulation du traitement immunosuppresseur permet de limiter la réactivation virale.

Le monitoring de la réponse immunitaire cellulaire médiée par les lymphocytes T semble être une piste intéressante pour prévenir les réactivations virales du BKPyV post-transplantation. Les principaux résultats cliniques ont montré qu'une hausse du répertoire T spécifique contre le BKPyV était associée à la clairance de la virémie et/ou à la résolution de la NBKV (125). De plus, l'établissement d'une réponse cellulaire T spécifique corrèle avec un contrôle de la réactivation virale tandis qu'une réponse T indétectable est associée à une réplication du BKPyV (133,135).

Les mécanismes précis de la réponse cellulaire anti-BKPyV restent encore méconnus, néanmoins les premiers résultats publiés dans des études trans-sectionnelles montrent que la réponse CD4 contre VP1 est plus fréquemment détectée chez les patients avec une réactivation virale comparé aux patients qui contrôlent l'infection (132) (130) De plus, les lymphocytes des patients avec une réactivation virale semblent avoir une réponse polyfonctionnelle plus faible (132).

La plupart des données de la littérature concernent la réponse anti-BKPyV après l'apparition de la réactivation virale. Par conséquent, nous avons mené une étude prospective pour mesurer systématiquement cette réponse trois mois après la transplantation du rein dans une cohorte de patients adultes. L'objectif principal était de mesurer l'immunité spécifique à trois mois post-transplantation, et de comparer l'expression de la réponse immunitaire entre les patients selon la survenue d'épisodes viruriques et/ou virémiques durant la première année post-transplantation. Ce travail a permis de fournir des données systématiques sur la réponse immunitaire spécifique humorale et cellulaire anti-BKPyV dans une cohorte de 160 patients transplantés rénaux.

---

## **B) Matériel et méthodes**

### **B.1 Description de la cohorte**

Cent soixante patients de 18 à 80 ans ont été inclus dans cette étude monocentrique prospective. Ils ont été transplantés au CHU de Nantes entre octobre 2010 et août 2013. Tous les participants ont donné leur consentement éclairé et l'étude a été approuvée par le comité local d'éthique et déclarée à la CNIL (n°1600141)

### **B.2 Monitoring des infections à BKPyV**

Le dépistage des infections à BKPyV a été effectué par qPCR à partir d'échantillons de sang EDTA et d'urines. Les échantillons ont été systématiquement collectés aux mois 1, 2, 3, 6, 9, and 12 post-transplantation. De plus des prélèvements supplémentaires ont été effectués en cas de virurie > 10<sup>7</sup>cop/ml ou de virémie positive.

Les patients ont été séparés en trois groupes selon leur charge virale dans le sang et les urines comme suit :

- Groupe 1 (G1), pas d'infection : PCR BKPyV négative dans le sang et les urines dans les 12 mois de suivi ou virémie faible (<500 cop/mL sang) sans virurie
- Groupe 2 (G2), répllication modérée : virurie positive (>4000 cop/mL d'urine) et virémie négative ou <1000 cop/mL de sang total
- Groupe 3 (G3), forte répllication : virurie positive et au moins un échantillon de virémie positive > 1000 cop/ mL de sang total

### **B.3 Immunophénotypage lymphocytaire**

Les lymphocytes T (marqueurs CD3+ et CD4+ ou CD8+) ainsi que les lymphocytes B (marqueur CD19+) et les cellules NK (marqueur CD56+) ont été quantifiés par cytométrie en flux. La numération totale des lymphocytes a été effectuée en utilisant les tests «BD Multitest™CD3/CD8/CD45/CD4» ou «BD Multitest™CD3/CD19/CD16+56/CD4» dans les tubes «BD Trucount™ Tubes» (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### **B.4 Cytométrie en flux**

Vingt à trente ml de sang total hépariné ont été recueillis à chaque point de suivi, ainsi que des échantillons pour la PCR BKPyV. Les cellules mononucléées périphériques ont été isolées à

partir de sang total par gradient de densité standard Ficoll Hypaque. Les cellules ont été stockées en DMSO/SVF8% et conservées dans l'azote liquide avant analyse. L'analyse de la réponse T CD4+ et T CD8+ anti-BKPyV a été réalisée pour tous les patients à trois mois post-greffe. En outre, la détection des lymphocytes spécifiques du BKPyV a également été réalisée aux mois 6 et 9 après transplantation pour les patients du groupe 3. Pour mesurer la réponse cytokinique, les lymphocytes sont décongelés et laissés une nuit à 37°C / 5%CO<sub>2</sub>, dans du milieu RPMI complet (10% SVF, 1% de pénicilline / streptomycine). Les cellules sont ensuite stimulées pendant 5h par contact avec un pool de peptides viraux. Deux pools de peptides viraux ont été utilisés, respectivement dérivés des protéines Ag T et VP1 du BKPyV. Ces pools sont constitués de peptides de 15-mères avec un chevauchement de 11 acides aminés (Swiss- ID Prot P14999, 170 peptides et Swiss-Prot ID 14996, 88 peptides ; JPT, Berlin, Allemagne) et reconstitués selon les recommandations du fabricant. Pour le contrôle positif, les PBMC sont stimulés par 2,5mg/mL de Staphylococcus aureus enterotoxin B (SEB ; Sigma, Deisenhofen, Germany). Le contrôle négatif est une condition sans stimulation. Les PBMC sont incubés avec chacun des pools de peptides pendant cinq heures en présence de 1mg/ml d'anti-CD28 et d'anti-CD49d (BD, Heidelberg, Germany). Une heure après l'initiation de la stimulation, du Golgi Plug et du Golgi Stop (BD) sont ajoutés dans les milieux pour inhiber l'excrétion des cytokines.

Après les 5 heures de stimulation, les cellules sont mises en contact avec 2mM d'EDTA pendant 10 min pour casser les interactions cellules-cellules puis marquées avec un marqueur de viabilité pendant 30 min (LIVE/DEAD®, Invitrogen). Après lavage, un marquage membranaire est effectué grâce aux anticorps fluorescents anti-CD3 et anti-CD8 (BD), puis les cellules sont perméabilisées avec la solution Cytofix/Cytoperm (BD) et immunomarquées avec les anticorps anti interféron-gamma (IFN $\gamma$ ), anti Interleukine 2 (IL-2) et anti Tumor-Necrosis-Factor alpha (TNF $\alpha$ ) (BD). Les cellules sont ensuite analysées sur un cytomètre en flux FACS Canto II avec le logiciel FACS-Diva (BD).

Pour l'analyse des réponses, les fréquences des T-CD4 et TCD8 des contrôles négatifs ont été soustraites des valeurs des tubes tests (VP1 et Ag T). La réponse a été considérée comme positive quand la réponse dans les tubes tests était au moins deux fois supérieure au contrôle négatif avec un minimum de 20 événements positifs.

### **B.5 Sérologie BKPyV**

Pour la mesure des taux d'IgG anti-BKPyV, des VLP (virus like particule) de VP1 ont été produites dans des cellules d'insecte, purifiées et liées enzymatiquement pour un test ELISA.



200 ng de BKPyV VLP ont été déposées par puits. Les sérums ont été dilués par dilution sérielle 2X à partir d'1/100<sup>ème</sup>. Le substrat peroxydase couplé à l'anti IgG humain (Southern Biotech) dilué au 1/200000 a été utilisé pour détecter la fixation des IgG. Les titres d'IgG ont été déterminés sur la dernière valeur positive donnée par une dilution sérielle ayant une densité optique > 0.2.

### **B.6 Analyse statistique**

Les données sont décrites par moyenne  $\pm$  écart type ou médiane et IQR (inter quartile range) selon les variables.

Une analyse univariée a été effectuée pour analyser les facteurs de risques associés aux statuts virologiques des patients. Les trois groupes ont été comparés en utilisant le test de Pearson ou le test exact de Fisher pour les variables qualitatives et en utilisant les tests ANOVA ou le test de Kruskal-Wallis pour les variables quantitatives.

## C) Résultats

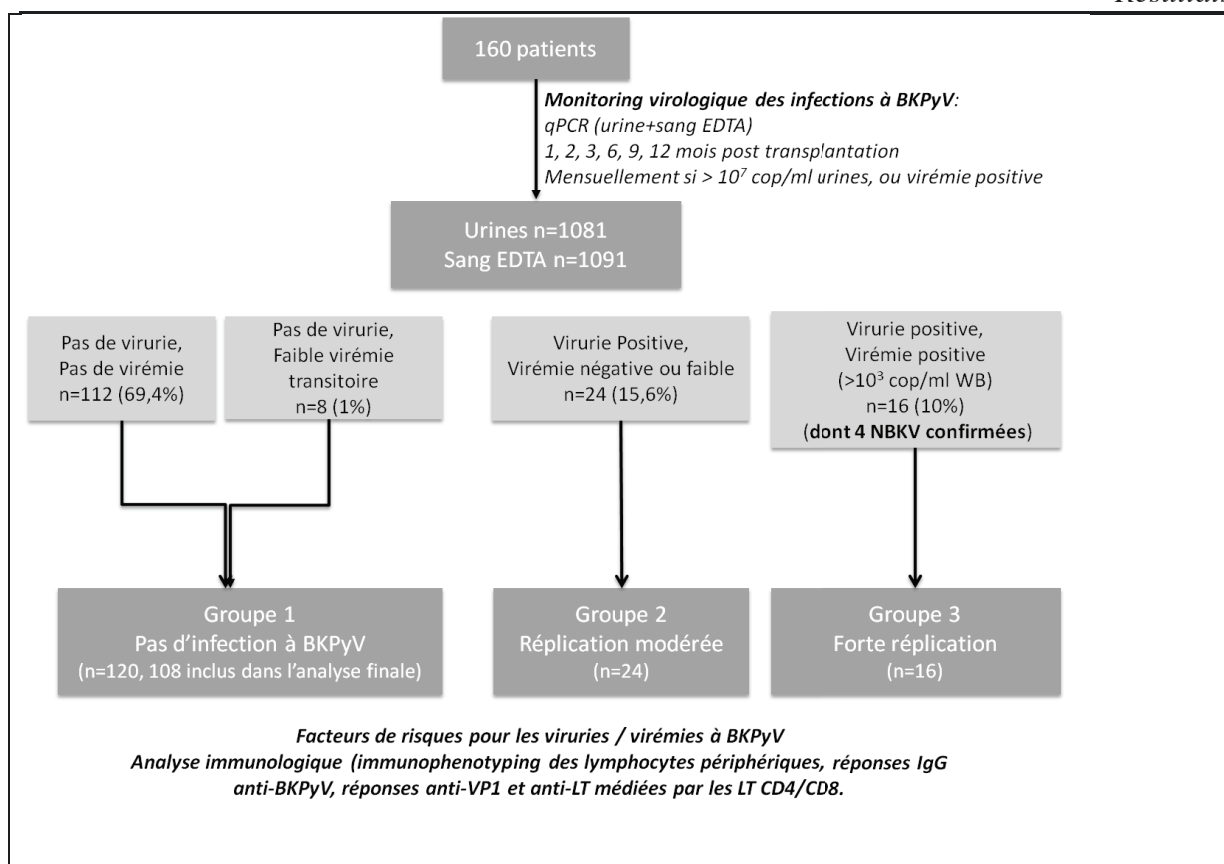
### C.1 Prévalence des réactivations du BKPyV

Chez les 160 patients, 1081 échantillons d'urine et 1091 échantillons de sang ont été collectés. La médiane du nombre d'échantillons analysés est de six les urines (moyenne 6, min 4, max 13) et pour le sang total EDTA (moyenne 6,6, min 4 max 13)

A une année de suivi post-transplantation, 112 patients sont demeurés BKPyV négatifs (70%), 40 ont été testé positifs au moins une fois dans les urines (25%) et 29 ont été testés positifs au moins une fois dans le sang (18,1%).

Parmi les patients BKPyV positifs, 24 d'entre eux ont une virurie positive associée à une virémie négative ou faible ( $<10^3$  cop/ml de sang) et ont été classés dans le G2 (réplication modérée). 16 autres patients ont eu au moins une virurie positive associée à une virémie  $>10^3$  cop/ml de sang et ont été classés dans le G3 (forte réplication) (**Figure 26**)

Huit patients ont eu de faibles virémies transitoires sans virurie. Nous avons considéré ces résultats comme la détection d'un virus persistant sans réplication active et les patients ont donc été classés dans le G1.



**Figure 26** Design de l'étude sur 160 patients transplantés du rein

Les taux d'incidence maximaux de virurie et virémie positives ont été observés respectivement aux mois 12 et 9 post-transplantation (16,5% et 8% respectivement) (**Fig 27**) La médiane pour l'apparition de la première détection de la virurie à BKPyV était 2 mois post transplantation pour G2 [moyenne 4,3+/-4.0, min-max: 1-12] et pour G3 [moyenne 3,0+/-2,8, min-max: 1-9]. Pour G3, la réactivation virale a été détectée pour la première fois dans les trios premiers mois post-transplantation chez 12/16 des patients (75%) (**Tabl XI**)

**Tableau XI** Statuts virologiques des patients durant une année de suivi post-transplantation

	Mois post-transplantation					
	M1	M2	M3-4	M6 (5-7)	M9 (8-10)	M12 (11-13)
<b>Urines</b>						
Patients positifs (n, %)	14/155 (9,0)	20/152 (13,1)	20/158 (12,6)	23/154 (14,9)	21/148 (14,2)	25/146 (17,1)
Échantillons positifs / total n	14/155	20/152	39/200	50/211	37/179	44/183
<b>Sang Total</b>						
Patients positifs (n, %)	2/158 (1,2)	11/152 (6,6)	12/156 (7,7)	11/156 (7,0)	12/149 (8,0)	9/145 (6,2)
Forte répliation (G3)	n=1	n=6	n=11	n=8	n=9	n=7
Répliation modérée (G2)	n=1	n=1	n=1	n=2	n=2	n=2
Virémie transitoire faible (G1)		n=4		n=1	n=1	
Échantillons positifs / total n	2/158	11/152	25/202	25/215	24/181	14/183

Les charges virales urinaires et sanguines sont présentées dans la figure 28 : pour le groupe 3, les charges virales maximales ont été observées dans des temps précoces post-transplantation (de M1 à M3), tandis que pour le groupe 2, les charges virales urinaires ont été observées plus tardivement (de M3 à M9). Vingt-quatre patients ont développé des viruries considérées élevées  $>10^7$  cop/ml (15%, 10 pour G2, 14 pour G3), et 8 patients du groupe 3 ont eu des virémies  $>10^4$  cop/ml (5%). Une NBKV a été confirmée chez 4 patients du groupe 3 (deux à M3, un à M5 et 1 à M6).

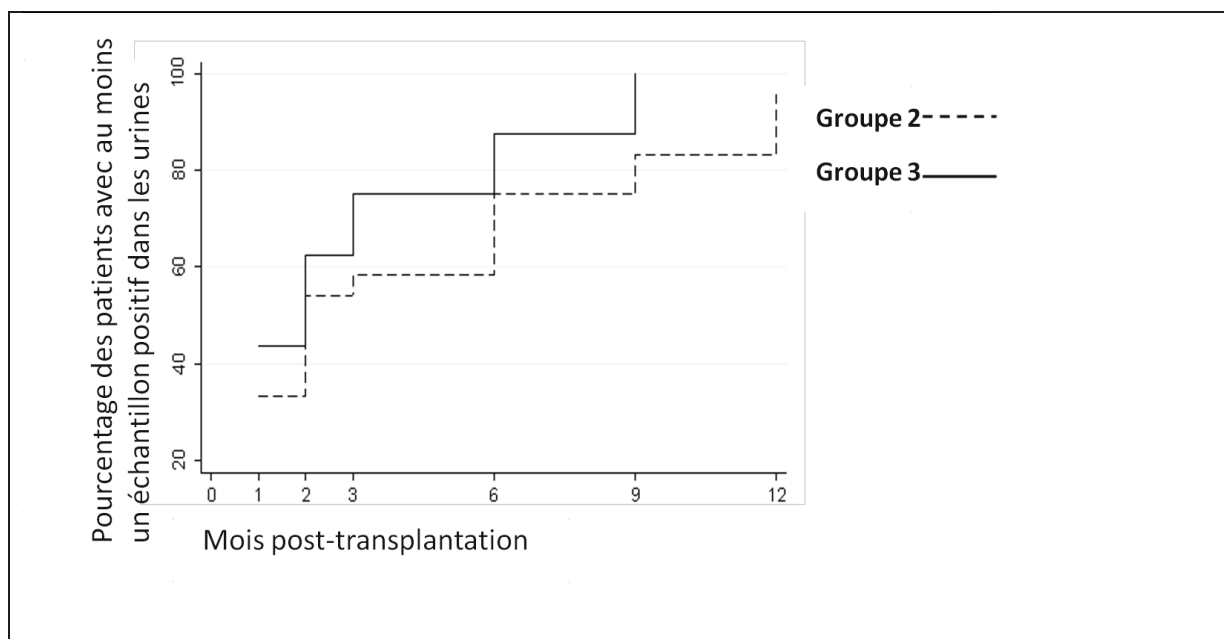


Figure 27 Incidence cumulée du nombre de patients avec au moins un échantillon positif dans les urines

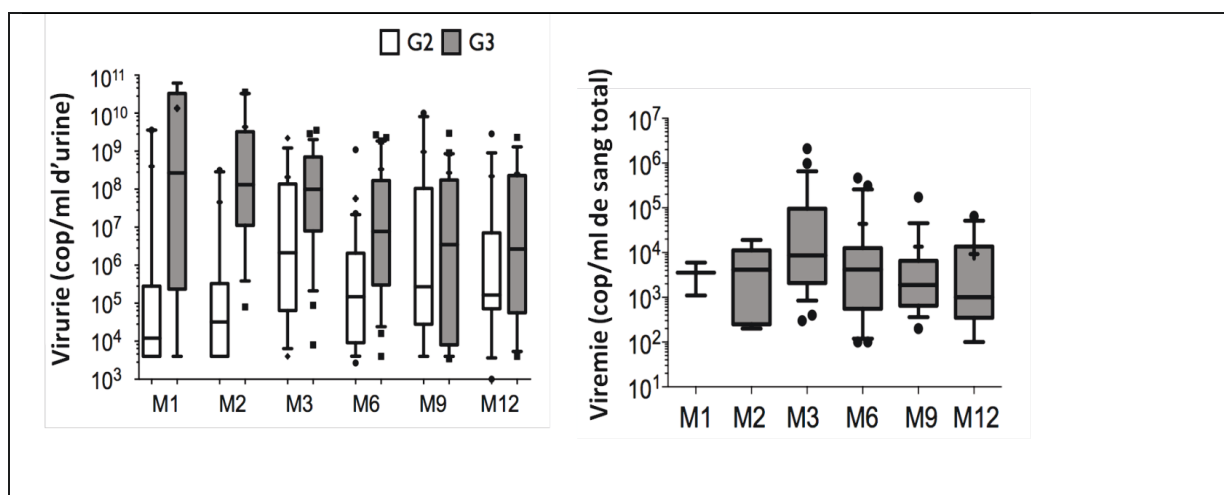


Figure 28 Comparaison des charges virales urinaires (graphique gauche) et sanguines (graphique droit) des groupes 2 et 3

---

## C.2 Facteurs de risques des infections à BKPyV

Les données immunologiques et les facteurs de risque ont été analysés pour 108/120 des patients du G1 ainsi que pour tous les patients du G2 (n=24) et du G3 (n=16)

En comparant les groupes séparément G1 vs G2 vs G3, par incidence de virémie élevée (G1+G2 vs G3) ou par incidence de virurie (G1 vs G2+G3), aucun facteur de risque n'a été identifié parmi les éléments étudiés : l'âge, le sexe, les statuts sérologiques des paires donneurs/receveurs pour le CMV et l'EBV, le nombre de mismatch HLA, la créatinémie du donneur à la transplantation ou le type de traitement d'induction. (**Tableau XII**)

Au cours de la première année post-transplantation, aucune différence entre les groupes n'a été décelée concernant la fréquence de survenue des infections virales post-greffe (CMV, HSV, VZV), des infections urinaires, la fonction rénale, la survenue d'épisodes de rejet du greffon (**Tableau XIII**). Cependant les patients du G3 sont retournés plus fréquemment en dialyse que ceux du G2 (25% pour G3 vs 4% pour G2 et 1,9% pour G1, p=0.004).

Tableau XII Description des caractéristiques de la cohorte en pré-transplantation

	Total n=148	G1 (virurie négative, virémie négative) n=108	G2 (virurie positive, virémie négative) n=24	G3 (virurie positive, virémie positive >1000 cop/mL) n=16	p 1vs2vs3	p (1+2)vs3	p 1vs(2+3)
Type de greffe							
Rein	142 (95.9)	104 (96.3)	23 (95.8)	15 (93.8)	0,80	0,50	0,66
Rein-pancréas	6 (4.1)	4 (3.7)	1 (4.2)	1 (6.3)			
Rang de greffe							
1er	112 (75.7)	80 (74.1)	22 (91.7)	10 (62.5)	0,19	0,28	0,68
2ème	32 (21.6)	24 (22.2)	2 (8.3)	6 (37.5)			
3ème	4 (2.7)	4 (3.7)	0 (0)	0 (0)			
Age du receveur, moyenne (écart type)	51.7 (13.3)	52.6 (12.8)	47.1 (14.4)	52.6 (14.4)	0,18	0,77	0,18
Age du donneur, moyenne (écart type)	53.2 (14.9)	54.5 (13.1)	46.3 (19)	54.9 (17.9)	0,05	0,63	0,09
Sexe du receveur							
Femme	53 (35.8)	39 (36.1)	10 (41.7)	4 (25)	0,56	0,42	1,00
Homme	95 (64.2)	69 (63.9)	14 (58.3)	12 (75)			
Sexe du donneur							
Femme	69 (46.6)	49 (45.4)	13 (54.2)	7 (43.8)	0,71	1,00	0,71
Homme	79 (53.4)	59 (54.6)	11 (45.8)	9 (56.3)			
IMC du receveur, moyenne (écart type)	24.6 (4.5)	25 (4.5)	22.9 (3.8)	24.6 (5.1)	0,12	0,99	0,09
Statut du donneur							
Vivant	19 (12.8)	16 (14.8)	3 (12.5)	0 (0)	0,29	0,23	0,28
Décédé	129 (87.2)	92 (85.2)	21 (87.5)	16 (100)			
MismatchesHLA sur locus A, B, DR							
<3	36 (24.3)	26 (24.1)	6 (25.0)	4 (25.0)	0,99	0,95	0,91
3-6	112 (75.7)	82 (75.9)	18 (75.0)	12 (75.0)			
Immunisation anti-HLA avant la greffe							
anti-HLA de classe I	72 (50.3)	49 (46.2)	14 (58.3)	9 (69.2)	0,22	0,24	0,13
anti-HLA de classe II	54 (38)	39 (36.8)	8 (34.8)	7 (53.8)	0,47	0,24	0,69
Creatinémie du donneur à la greffe	78 [60.5-102]	74 [60-94.5]	85.5 [61.5-111.5]	99.5 [71-125]	0,11	0,08	0,05
Ischémie froide, heures moyenne (écart type)	15.7 (8.2)	15.7 (8.4)	15.5 (9)	16.4 (5.9)	0,93	0,71	0,90
Traitement d'induction							
SAL lapin	62 (41.9)	43 (39.8)	9 (37.5)	10 (62.5)	0,23	0,11	0,45
Simulect	85 (57.4)	64 (59.3)	15 (62.5)	6 (37.5)	0,23	0,11	0,46
Traitement corticoïde à la greffe	100 (67.6)	73 (67.6)	15 (62.5)	12 (75)	0,74	0,58	1,00
Traitement de maintenance							
MMF	148 (100)	108 (100)	24 (100)	16 (100)	-	-	-
Tacro	147 (99.3)	108 (100)	23 (95.8)	16 (100)	0,27	1,00	0,27
CSA	1 (0.7)	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)	0,27	1,00	0,27
AZA	1 (0.7)	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)	0,27	1,00	0,27
Traitement Immuno-globuline en IV	24 (16.2)	19 (17.6)	2 (8.3)	3 (18.8)	0,62	0,73	0,62
Sérologie EBV (receveur)							
Négative	4 (2.7)	2 (1.9)	2 (8.3)	0 (0)	0,18	0,99	0,30
Positive	142 (97.3)	104 (98.1)	22 (91.7)	16 (100)			
Sérologie EBV (donneur)							
Négative	4 (2.7)	1 (0.9)	1 (4.2)	2 (12.5)	0,04	0,06	0,06
Positive	144 (97.3)	107 (99.1)	23 (95.8)	14 (87.5)			
Sérologie CMV donneur/receveur							
négative/négative	51 (34.9)	33 (30.8)	10 (43.5)	8 (50.0)	0,75	0,65	0,37
négative/positive	35 (24.1)	26 (24.3)	6 (26.1)	3 (18.7)			
positive/négative	30 (20.5)	24 (22.4)	4 (17.4)	2 (12.5)			
positive/positive	30 (20.5)	24 (22.4)	3 (13.0)	3 (18.7)			
Traitement CMV prophylactique	98 (66.2)	76 (70.4)	14 (58.3)	8 (50)	0,19	0,17	0,12

Tableau XIII Caractéristiques du suivi clinique des 12 premiers mois.

	Total n=148	G1 (negative viremia, negative viremia) n=108	G2 (positive viremia, negative viremia) n=24	G3 (positive viremia, positive viremia>1000 cop/mL) n=16	p 1vs2vs3	p (1+2)vs3	p 1vs(2+3)
Au moins un épisode de rejet dans les 12 premiers mois	12 (8.1)	9 (8.3)	2 (8.3)	1 (6.3)	1,00	1,00	1,00
Retour en dialyse	7 (4.7)	2 (1.9)	1 (4.2)	4 (25)	0,004	0,003	0,02
Dysfonction chronique du greffon	2 (1.4)	1 (0.9)	0 (0)	1 (6.3)			
PVAN	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)			
Microangiopathie thrombotique	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)			
Maladie vasculaire	1 (0.7)	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)			
Rejet aigu et chronique	1 (0.7)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)			
Récurrence de la maladie	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)			
Infection à CMV dans les 12 premiers mois	17 (11.5)	13 (12)	3 (12.5)	1 (6.3)	0,84	0,70	1,00
Infection urinaire	58 (39.2)	47 (43.5)	7 (29.2)	4 (25)	0,22	0,28	0,09
Infection HSV	5 (3.4)	3 (2.8)	1 (4.2)	1 (6.3)	0,41	0,44	0,61
Infection VZV	7 (4.7)	6 (5.6)	0 (0)	1 (6.3)	0,55	0,56	0,67
Neoplasie	15 (10.1)	11 (10.2)	4 (16.7)	0 (0)	0,26	0,37	1,00
Complication urologique sur le greffon	25 (16.9)	21 (19.4)	3 (12.5)	1 (6.3)	0,42	0,31	0,22
Complication vasculaire sur le greffon	4 (2.7)	4 (3.7)	0 (0)	0 (0)	1,00	1,00	0,57
Décès	4 (2.7)	1 (0.9)	1 (4.2)	2 (12.5)	0,04	0,06	0,06
Accident vasculaire-cérébral	1 (0.7)	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)	-	0,06	-
Cause inconnue	1 (0.7)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)			
Complication chirurgicale	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)			
Infection opportuniste (disseminated mycosis)	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)			
<b>Mois 3</b>							
IMC, moyenne (écart type)	24.5 (4)	24.8 (3.9)	23.1 (3.3)	24.8 (5.2)	0,16	0,79	0,16
Creatinémie, médiane [25-75]	138 [109-170]	138 [109-169]	140 [118-170.5]	137 [106-186]	0,94	0,91	0,84
Proteinurie, médiane [25-75]	0.22 [0.12-0.42]	0.205 [0.11-0.35]	0.215 [0.13-0.455]	0.335 [0.15-0.875]	0,11	0,04	0,10
Clairance MDRD, moyenne (écart type)	47.6 (17.5)	47.2 (16.9)	47.7 (20.2)	49.7 (19.1)	0,88	0,62	0,70
Traitement immunosuppresseur:							
Advagraf	62 (41.9)	45 (41.7)	10 (41.7)	7 (43.8)	0,69	0,98	0,69
FK-506	83 (56.1)	61 (56.5)	13 (54.2)	9 (56.3)			
Non	1 (0.7)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)			
Néoral	1 (0.7)	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)			
FK-506 dose mg/jour; médiane [25-75]	7 [4.5-11]	7 [4-10]	10.75 [5.25-13.5]	6 [4.25-9]	0,01	0,30	0,23
Traitement corticoïde							
Non	78 (53.1)	61 (57)	10 (41.7)	7 (43.8)	0,28	0,44	0,14
Oui	69 (46.9)	46 (43)	14 (58.3)	9 (56.3)			
<b>Mois 6</b>							
IMC, moyenne (écart type)	24.9 (4.4)	25.3 (4.3)	23 (3.8)	25.3 (5.6)	0,08	0,74	0,10
Creatinémie, médiane [25-75]	134 [108-177]	133 [108-176]	136.5 [110-180.5]	138 [105-180]	0,96	0,77	0,90
Proteinurie, médiane [25-75]	0.185 [0.11-0.33]	0.18 [0.09-0.325]	0.17 [0.11-0.26]	0.25 [0.135-0.47]	0,57	0,31	0,71
Clairance MDRD, moyenne (écart type)	48 (18.1)	47.5 (17.4)	50 (20.1)	48.5 (20.8)	0,84	0,92	0,59
Traitement immunosuppresseur:							
Advagraf	72 (48.6)	54 (50)	11 (45.8)	7 (43.8)	0,41	0,37	0,33
FK-506	70 (47.3)	50 (46.3)	12 (50)	8 (50)			
Non	3 (2)	3 (2.8)	0 (0)	0 (0)			
Néoral	1 (0.7)	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)			
FK-506 dose mg/jour; médiane [25-75]	7 [4.5-10]	6.5 [4.5-9.75]	6.5 [4.5-10]	6 [5-10]	0,13	0,73	0,11
Traitement corticoïde							
Non	76 (52.1)	56 (52.3)	13 (54.2)	7 (46.7)	0,93	0,79	1,00
Oui	70 (47.9)	51 (47.7)	11 (45.8)	8 (53.3)			
<b>Mois 12</b>							
IMC, moyenne (écart type)	25.1 (4.4)	25.5 (4.3)	22.6 (3.1)	26.5 (5.9)	0,01	0,25	0,11
Creatinémie, médiane [25-75]	137 [111-172]	137 [111-169]	132 [102.5-172]	144 [125-199]	0,35	0,16	0,65
Proteinurie, médiane [25-75]	0.23 [0.115-0.535]	0.235 [0.125-0.495]	0.15 [0.115-0.34]	0.505 [0.105-0.88]	0,40	0,25	0,97
Clairance MDRD, moyenne (écart type)	48 (17.5)	47.9 (16.8)	52.5 (20.1)	41.3 (17.8)	0,22	0,16	0,92
Traitement immunosuppresseur:							
Advagraf	71 (48)	50 (46.3)	14 (58.3)	7 (43.8)	0,22	0,08	0,23
FK-506	59 (39.9)	45 (41.7)	9 (37.5)	5 (31.3)			
Non	7 (4.7)	7 (6.5)	0 (0)	0 (0)			
Néoral	6 (4.1)	3 (2.8)	1 (4.2)	2 (12.5)			
FK-506 dose mg/jour; médiane [25-75]	6 [4.5-10]	6 [4-10]	9 [5.5-14]	6.25 [5.3-9]	0,06	0,63	0,03
Traitement corticoïde							
Non	83 (58)	63 (60)	12 (50)	8 (57.1)	0,69	0,94	0,45
Oui	60 (42)	42 (40)	12 (50)	6 (42.9)			

### C.3 Une lymphopénie T est observée chez tous les patients, indépendamment de toute réactivation BKPyV

Les valeurs absolues de CD3, CD4, CD8, LB et cellules NK ont été comparées aux mois 3, 6 et 12 post transplantation. Malgré une tendance à une lymphopénie T CD4 plus intense entre M3 et M6 dans le groupe 3, celle-ci n'est pas significative. De plus, aucune différence n'a été notée entre les groupes pour les sous-populations lymphocytaires B et cellules NK (**Fig 29**)

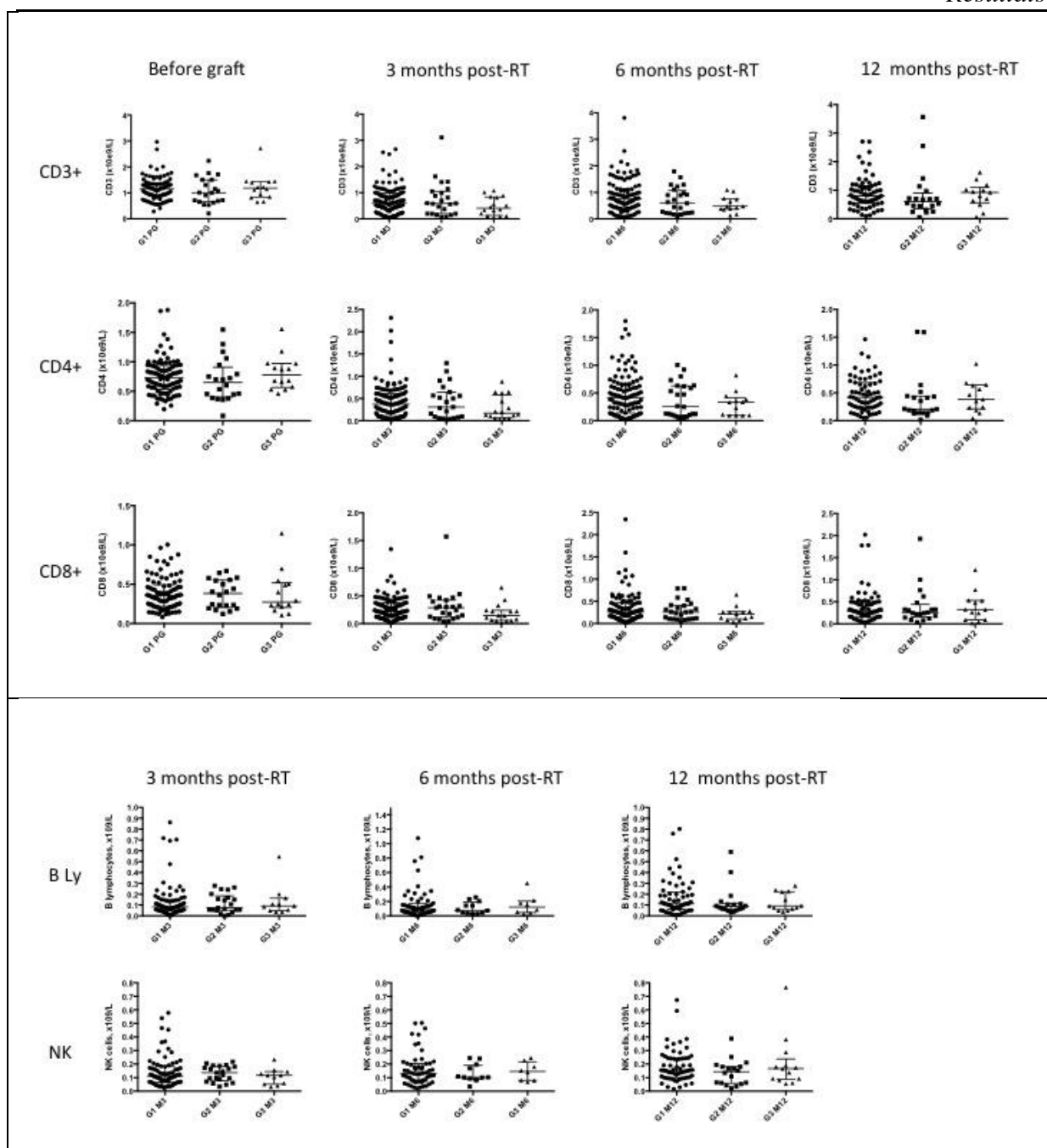


Figure 29 : Immunophénotypes lymphocytaires. Comparaison des valeurs absolues de chaque sous-population lymphocytaire (CD3, CD4, CD8, B, NK) à différents temps post transplantation, en fonction des groupes BKPyV. Les barres représentent la médiane et les intervalles 25-95% (valeurs interquartile).

#### C.4 Les titres d'IgG anti-VP1 augmentent chez les patients présentant une réactivation virale

Afin d'étudier l'immunité humorale BKPyV spécifique au cours du temps en post-transplantation, les niveaux d'IgG anti-VP1 ont été comparés entre les trois groupes avant la transplantation et aux mois 6 et 12 post-transplantation (Fig 30).

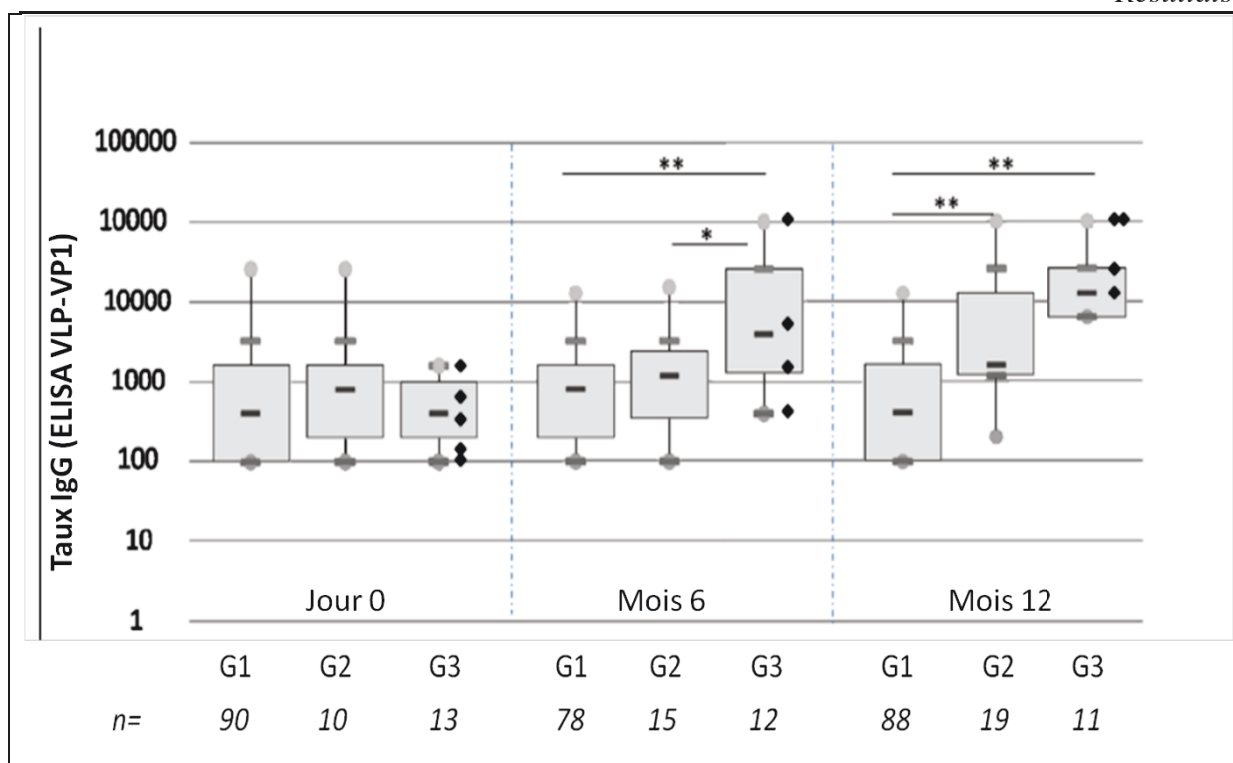


Avant la transplantation, le pourcentage de patients séropositifs est de 84,7% (n=122/144 patients testés): 16/107 patients sont séronégatifs dans G1, 5/23 dans G2 et 1/14 dans G3. Les taux médians d'IgG sont respectivement de 400 en G1 (IQR 1500, 100-25600), 800 en G2 (IQR 1400, 100-25600) et 400 dans le G3 (IQR 800, 100-1600). Il n'y a pas de différence significative entre les trois groupes avant la transplantation.

A six mois post-transplantation, les taux médians d' IgG anti-BKPyV sont respectivement de 800 en G1 (IQR 1400, 100-12800), 800 en G2 (IQR 1300, 100-15600) et 4000 en G3 (IQR 24300, 400-102400). L'augmentation de la réponse humorale spécifique est significative pour le groupe 3 à ce stade, comparé aux deux autres groupes ( $p = 0,034$ ).

Cette différence est encore plus marquée à 12 mois post-transplantation, car les deux groupes avec réactivation virale ont des niveaux d'IgG anti-BKPyV plus élevés que le groupe négatif (G2: médiane 1600, IQR = 11600, 200-102400; G3: 12800 médiane, IQR = 19200, de 6400 à 102400; G1: médiane 400, IQR = 1500, 100-12800) (G1 G2 vs  $p = 0,0006$  et G1 vs G3  $p < 0,0001$ ). En outre, les patients avec une NBKV confirmée ou une forte suspicion de NBKV ( $n = 5$ ) ont les plus hauts niveaux d'IgG parmi les patients G3 (médiane 64000, IQR = 80000, 12800 à 102400).

Tous les patients qui étaient séronégatifs avant la transplantation en G2 ( $n = 5$ ) et G3 ( $n = 1$ ) ont présenté une séroconversion à 12 mois, mais étonnamment, ils avaient de faibles taux d'IgG par rapport à la médiane de leurs groupes respectifs, excepté pour l'un d'entre eux (moyenne des taux d'IgG: G2 = 500, G3 = 6400). Dans G1, 7/16 patients séronégatifs avaient séroconverti à 12 mois, avec un taux d'IgG à la limite de détection (médiane = 100, IQR = 175, 100-1600).



**Figure 30 Réponse humorale spécifique au cours de la première année post-transplantation.** Les taux d'IgG ont été mesurés en utilisant un test ELISA sur les sérums pré-greffes, et à M6 et M12 post transplantation. Ces taux ont été comparés entre les patients du groupe 1 (G1=pas de réplication virale), du groupe 2 (G2 = réplication modérée = virémie  $< 10^3$  cop/mL) et les patients du groupes 3 (G3=forte réplication, virémie  $> 10^3$  cop/mL). Les losanges noirs dans le groupe 3 représentent les valeurs d'IgG des patients avec une NBKV

### C.5 La réponse spécifique T-CD4 anti BKPyV est plus fréquemment détectée que la réponse T-CD8.

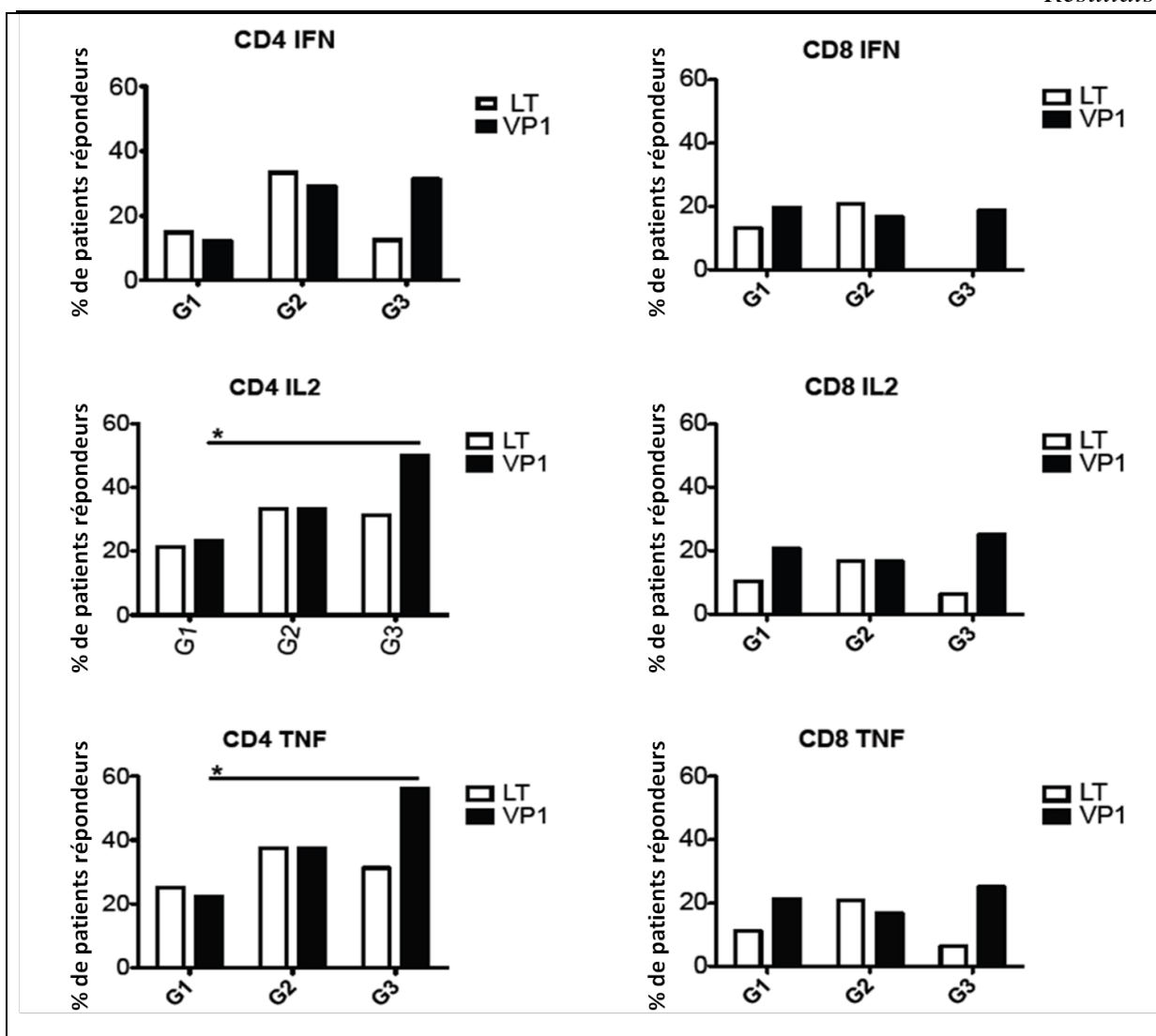
A trois mois post-transplantation, la réponse spécifique T-CD4 anti-BKPyV a été détectée chez respectivement 44/108 patients du G1, 11/24 patients du G2 et 9/16 patients du G3. La réponse spécifique T-CD8 a quant à elle été détectée chez 30 patients du G1, 5 du G2 et 6 du G3. Les deux réponses spécifiques T-CD4 et T-CD8 ont été détectées chez 27 patients (18,2%). La réponse T-CD4 a donc été détectée plus fréquemment que la réponse T-CD8 ( $p=0,0052$ ). Cette différence a été observée quelque soit le pool de peptide : 50 patients ont une réponse spécifique T-CD4 anti VP1 contre 33/148 pour une réponse T-CD8 anti-VP1. ( $p=0,02$ ). De même, 48 patients ont une réponse spécifique T-CD4 anti-AgT contre 24/148 pour une réponse T-CD8 anti AgT ( $p=0,0017$ ).

En analysant indépendamment les différents groupes, la réponse spécifique T-CD4 anti-AgT est plus fréquemment détectée que la réponse T-CD8 anti-AgT pour G1 et G2 : 34 vs 17 patients/108 pour G1 ( $p=0.021$ ), 9 vs 5 patients/24 pour G2 ( $p=0.041$ ), et 5 vs 1 patient/16 pour G3 (NS). L'écart entre la réponse T-CD4 anti-VP1 et T-CD8 anti-VP1 n'est significatif

que pour G2 : 41,7% des patients (10/24) ont eu une réponse CD4 et 16,7% ont eu une réponse CD8.

### **C.6 Une réponse lymphocytaire T CD4 + anti-VP1 est plus fréquemment détectée en cas de virémie, mais le pourcentage de cellules fonctionnelles ne varie pas**

L'immunité cellulaire a été étudiée à partir de stimulation de PBMC à M3 post transplantation en mesurant la production des cytokines suivantes  $IFN\gamma$ , IL-2 et  $TNF\alpha$ . Pour chaque cytokine, le nombre de patients positifs et le pourcentage de lymphocytes fonctionnels dans les échantillons positifs ont été comparés entre les différents groupes de patients. Dans l'ensemble, une réponse à médiation CD4 + contre VP1 a été détectée plus souvent détecté dans G3 que chez les patients G1 ( $p = 0,047$ ), avec une fréquence intermédiaire dans G2. Cette différence significative est retrouvée pour IL2 ( $p = 0,0348$ ) et  $TNF\alpha$  ( $p = 0,0119$ ), mais pas  $IFN\gamma$  ( $p = 0,0587$ ) (**Fig 31**). Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les trois groupes en terme de pourcentages de lymphocytes T fonctionnels pour chaque cytokine (**Fig 32**). De plus, il n'y avait pas de différence entre les trois groupes en ce qui concerne les réponses CD4-LT, LT CD8-LT ou CD8-VP1.



**Figure 31 Réponse cellulaire spécifique à 3 mois post transplantation.** Pourcentages des patients ayant une réponse anti BKPyV spécifique médiée par les lymphocytes CD4 et CD8. Un patient est considéré comme ayant une réponse positive quand au moins une cytokine (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL2) est détectée après la stimulation par des pools peptidiques (VP1 ou LT)

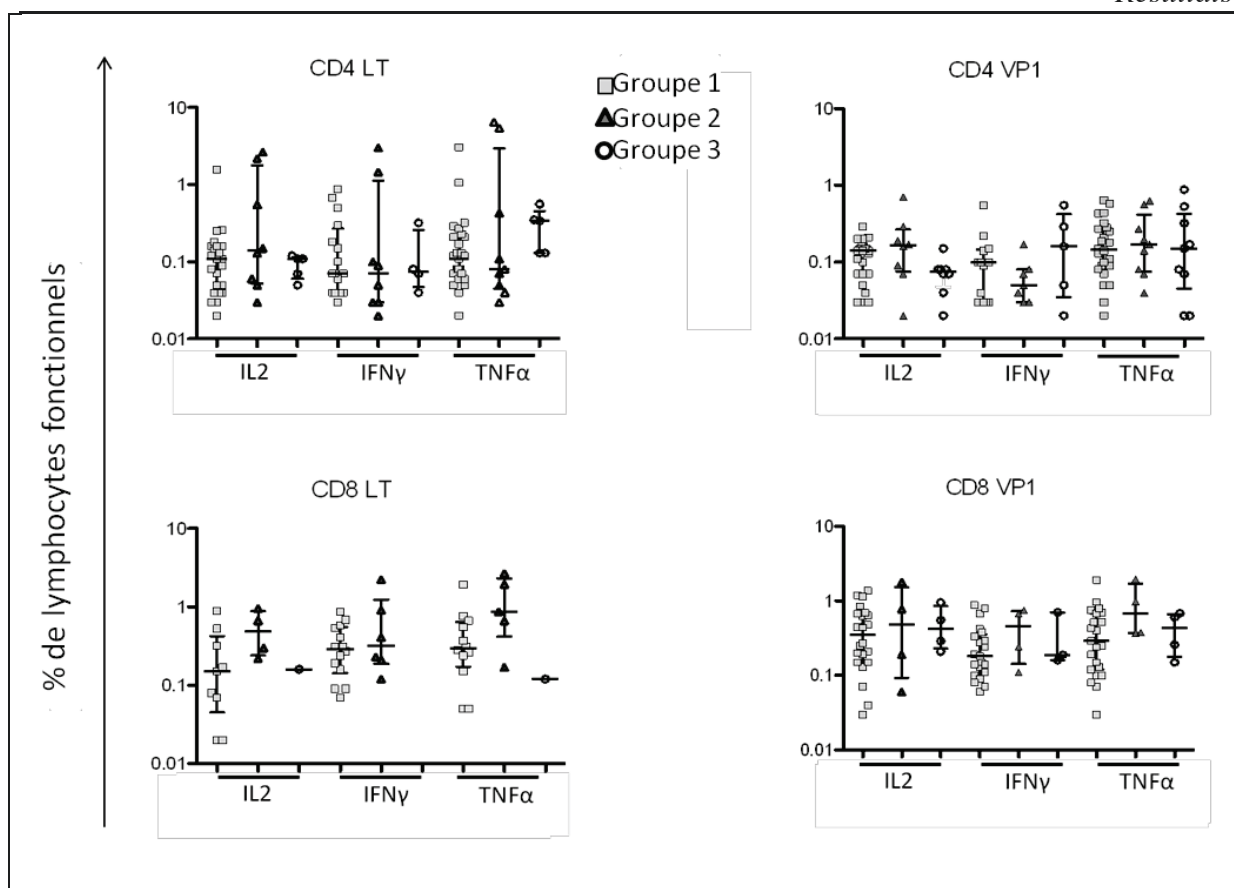


Figure 32 Pourcentage de lymphocytes T-CD4 et T-CD8 fonctionnels. Chaque point représente la fréquence des LT CD4 et CD8 producteurs des cytokines  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  et IL2 après la stimulation par des pools peptidiques VP1 ou LT sur les PBMC collectés à 3 mois post-transplantation.

### C.7 La fréquence des lymphocytes polyfonctionnels BKPyV ne varie pas selon les groupes à M3 post transplantation

Nous avons déterminé le profil polyfonctionnel des lymphocytes chez les patients. Une réponse a été considérée comme polyfonctionnelle quand la même cellule produisait au moins deux cytokines parmi  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  ou IL-2. L'association de ces trois cytokines a permis de déterminer 7 profils différents (Fig 33). En comparant la distribution de ces différents profils, nous n'avons observé aucune différence entre les groupes de patients. Cependant, à cause du faible nombre d'événements pour chaque combinaison, ces résultats sont à interpréter avec précaution. De plus, la production de CD107a, qui est un marqueur de cytotoxicité, a été rarement détectée. Seulement 21 patients ont eu des lymphocytes T-CD8 exprimant le CD107 (15/108 dans G1, 5/24 dans G2, 1/16 dans G3). Les lymphocytes T-CD4 ont quant à eux été détectés chez 18 patients (9/108 G1, 5/24 G2, 4/16 G3). Les pourcentages de lymphocytes exprimant du CD107 ne sont pas significativement différents entre les trois groupes.

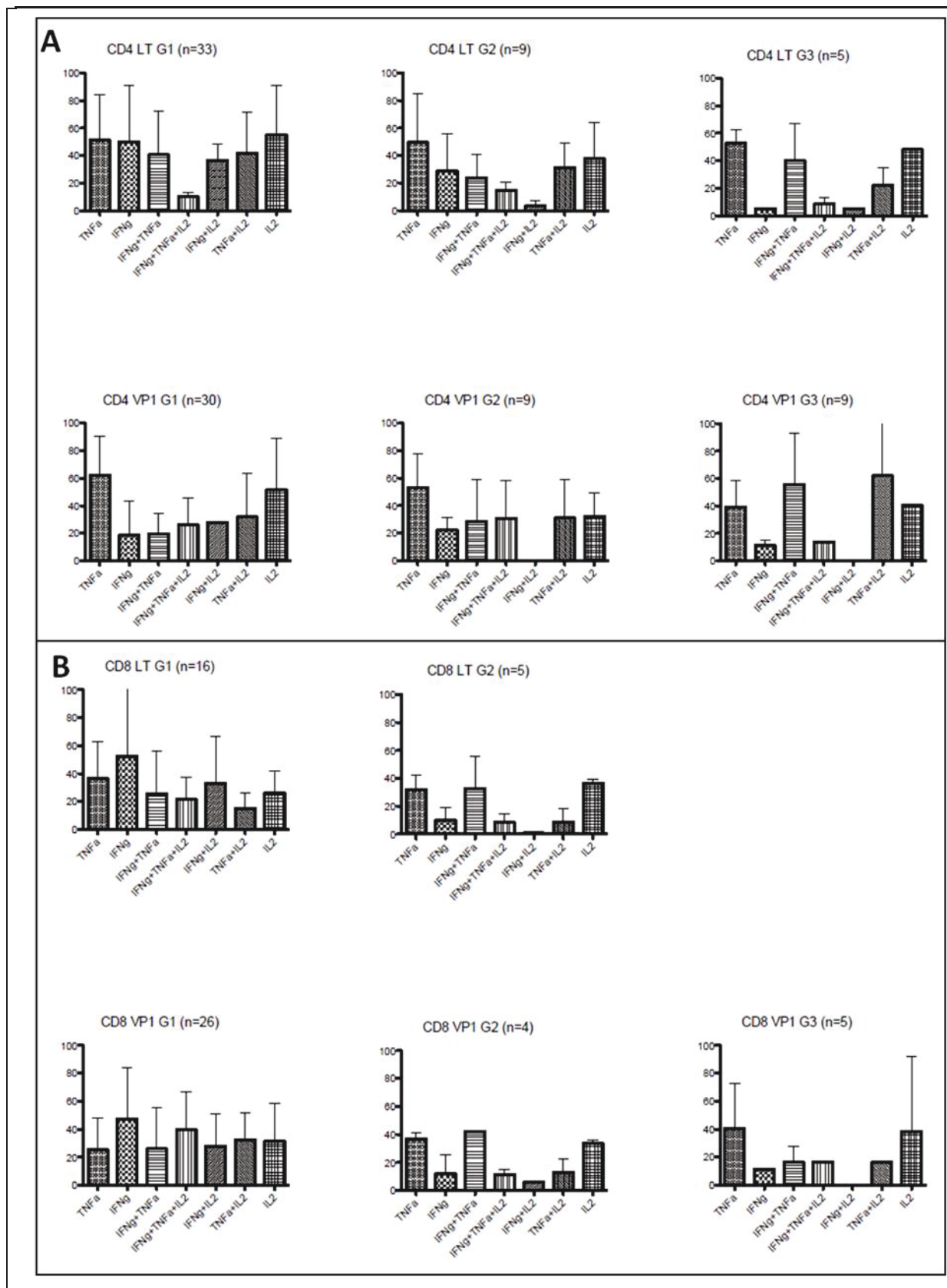


Figure 33 Fréquence de la réponse polyfonctionnelle. Les histogrammes représentent les sous populations (moyenne et écart-type) des cellules productrices de cytokines (simple, bi ou triple fonctionnelles) parmi les cellules stimulées pour chaque condition (VP1 ou LT) dans les LTCD4 (A° et les LTCD8 (B)

---

## **C.8 Le contrôle de la virémie est associé à une réponse LT multifonctionnelle dans le groupe virémique**

Afin de décrire les cinétiques de la réponse lymphocytaire anti-BKPyV au sein du groupe virémique, nous avons mesuré la réponse lymphocytaire des patients de G3 à la première virémie et à M3, M6 et M9 post-transplantation.

Selon les cinétiques de réactivation du BKPyV, les patients du G3 ont été séparés en trois différents profils. Le premier profil correspond aux patients réussissant à contrôler leur virémie dans la première année post-transplantation (groupe clairance virale, n=5). Le second profil correspond aux patients dont la virémie persiste (n=6). Enfin, le dernier profil correspond à des patients avec une virémie transitoire (n=4). Le dernier patient du groupe 3 est décédé avant la fin du protocole de suivi. C'est dans le groupe « clairance virale » que l'on observe des réponses « multifonctionnelles », c'est à dire qui associent plusieurs types de réponse. Dans les patients avec une virémie persistente ou à l'inverse transitoire, le profil de réponse était caractérisé par son caractère étroit ou non détectable.

Peu de patients présentaient un taux de lymphocytes fonctionnels supérieur à >1%. Dans le groupe « clairance virale », les réponses maximales étaient observées dans le premier mois suivant la première virémie puis diminuaient ou sont devenaient indétectables avec la négativation de la virémie.

## D) Discussion

Au cours de la première année post-transplantation, le pourcentage de patients ayant une réactivation virale au moins une fois est de respectivement 25,6 et 21,2% dans les urines et dans le sang. La prévalence de virurie positive est plus faible que les données de la littérature (142,147,148). Cette faible prévalence de la virurie pourrait être expliquée par la méthode de détection et de quantification du BKPyV que nous avons utilisée: les urines sont bouillies et diluées (il n'y a pas d'extraction d'ADN spécifique) et le seuil de quantification est de  $10^4$  BKPyV copies/ml d'urines. Cependant, même en considérant que nous avons manqué les faibles viruries, le seuil de quantification est compatible avec les standards cliniques, puisque les faibles viruries ne modifient pas le suivi virologique ou le traitement immunosuppresseur. De plus la fréquence de hautes virémies ( $>10^7$  cop/ml, 15,6% des patients) est aussi plus faible que celles reportées dans d'autres cohortes.

Parmi les patients virémiques, huit ont été considérés comme non infectés activement à cause de l'absence de virurie concomitante. Des virémies supérieures à  $10^3$  cop/ml dans le sang total ont été détectées chez 10% des patients et des fortes virémies  $>10^4$  cop/ml ont été détectées chez seulement 8 patients (5%). Ces résultats concordent avec les autres études prospectives (148,149). Cependant, plusieurs études ont montré que la fréquence de la réactivation à BKPyV était significativement plus élevée chez les patients recevant du tacrolimus, comparés à ceux recevant de la ciclosporine (142,150). Le faible pourcentage de patients viruriques dans notre cohorte est donc surprenant puisque nous avons inclus uniquement des patients recevant du mycophénolate mofétil et du tacrolimus comme traitement d'entretien, associé à des corticoïdes durant le premier mois. Nous avons analysé les facteurs de risque traditionnellement associés à l'infection à BKPyV, dont les facteurs pré-transplantation associés aux receveurs ou aux donneurs. Aucun d'entre eux n'a été associé à un risque plus important de développer une virurie ou virémie. Dans une récente étude multicentrique analysant ces facteurs de risques associés à la virémie/virurie, l'âge, le sexe (masculin) et le tacrolimus ont été associés à une augmentation du risque de virémie un an après transplantation (150). Cependant ces facteurs de risque ne sont pas systématiquement retrouvés dans d'autres études.

Nous avons observé une lymphopénie T plus prononcée dans le groupe virémique, même si le faible effectif ne permet pas d'atteindre des valeurs significatives. Ce résultat corrobore ceux de Schachtner et al (136), et souligne l'intérêt d'intégrer l'immunophénotypage systématique dans le suivi post-transplantation pour identifier les patients sévèrement lymphopéniques.



Nous avons étudié les réponses immunitaires humorale et cellulaire anti-BKPyV. En ce qui concerne la réponse humorale, aucune différence significative dans les taux d'IgG entre les différents groupes n'a été observée avant la greffe. Nous n'avons pas pu effectuer d'analyse sérologique chez les donneurs, il n'a donc pas été possible de retrouver l'association entre donneur séropositif / receveur séronégatif et un risque accru d'infection à BKPyV (123). Cependant, certains patients de la cohorte étaient séronégatifs avant la greffe et ont séroconverti durant la première année post-greffe sans pour autant présenter des virémies élevées ou le développement d'une NBKv. En étudiant la réponse humorale à travers le temps, nous avons observé une forte augmentation des IgG pour les patients ayant une réactivation du BKPyV, alors que nous n'avons pas observé de changements significatifs chez les patients sans réactivation virale. L'augmentation du titre des anticorps IgG peut être interprétée de deux façons. La première est qu'elle accompagnerait la résolution de la NBKv et suggère que la réponse humorale contribue au contrôle de l'infection (151). La deuxième façon est de considérer que la hausse du titre d'anticorps comme un simple marqueur de la réplication virale (119). Dans notre étude, les titres d'anticorps les plus élevés sont retrouvés chez les patients virémiques et ne sont pas systématiquement associés à un contrôle de l'infection, ce qui serait en accord avec la deuxième hypothèse.

Dans cette étude nous avons également étudié la réponse LT-CD4 et LT CD8 contre deux pools de peptides viraux (Ag T et VP1). La réponse médiée par les lymphocytes T a été mesurée 3 mois post-transplantation chez tous les patients. Ce temps correspond au moment de la baisse du traitement immunosuppresseur (baisse de la corticothérapie) et au début de la période de réactivation du BKPyV. Nous avons utilisé la cytométrie en flux pour étudier l'expression de l'IFN $\gamma$ , du TNF $\alpha$  et de l'IL-2, ainsi que du facteur de dégranulation CD107a. Dans son ensemble la réponse CD4<sup>+</sup> est plus fréquemment détectée que la réponse CD8<sup>+</sup>. L'utilisation de pools de peptides 15-mères a été choisie pour détecter les deux réponses : CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. L'absence de détection de la réponse CD8<sup>+</sup> spécifique anti-BKPyV, avec une méthodologie proche de la notre, a été rapportée dans une publication récente (132). De plus nous avons mesuré les réponses anti-BKPyV sans expansion lymphocytaire *in vitro*, dans le but de correspondre au plus près à la réalité clinique des patients, mais qui a peut-être empêché la détection des très faibles réponses.

## DISCUSSION GENERALE

La réactivation du polyomavirus BK est une complication fréquente, et dont la prise en charge reste problématique après transplantation de rein. En l'absence de traitement antiviral efficace, il est important de mieux comprendre la biologie du virus et ses interactions avec l'organisme hôte pour optimiser la prise en charge des patients. La régulation de la réplication virale et, dans le cadre de la transplantation du rein, la progression vers des lésions histologiques de NBKV sont la conséquence de divers facteurs de risques.

Ce travail de thèse s'est articulé autour de deux aspects pouvant influencer sur le développement d'une NBKV après une transplantation rénale. Le premier aspect, lié au virus lui-même, est le polymorphisme de la région NCCR. Le deuxième aspect, lié à l'hôte, est la réponse immunitaire cellulaire spécifique anti-BKPyV post-greffe.

La région NCCR est la région régulatrice de l'expression des gènes viraux ainsi que de la réplication virale. Elle existe sous deux formes : native (wwNCCR) ou réarrangée (rrNCCR) et est porteuse de multiples sites de fixation à des facteurs de transcription cellulaires ou viraux. Les principaux résultats de la littérature suggèrent que la forme réarrangée est associée avec une persistance de niveaux élevés de réplication virale post-greffe et des lésions histologiques plus sévères (1), qui seraient dues aux délétions / insertions des sites de fixation de différents facteurs de transcription (108,112)

Pour confirmer l'hypothèse selon laquelle les rrNCCR induiraient une hausse de l'activité de multiplication virale, nous avons abordé cet aspect selon deux approches : *in vitro* en infectant des cellules épithéliales rénales avec des souches issues d'échantillons cliniques ; et *in vivo*, à partir d'une bibliothèque d'ADN de patients transplantés de rein.

En effet, bien que les zones de délétions / insertions concordent dans nos expériences de cinétiques *in vitro* et dans les données de la cohorte rétrospective, l'implication de ces réarrangements ne semblent pas coïncider. En effet, le traitement des données sur la cohorte rétrospective de transplantés du rein n'a démontré aucun développement préférentiel de NBKV chez des patients transplantés selon la nature de leur NCCR. De même, les données virologiques (virémie au pic, durée de la réactivation...) ne semblent pas tendre vers une association vers l'une ou l'autre des deux formes. En revanche les données issues des

expériences de cinétiques *in vitro* vont dans le sens des données de la littérature. En effet les modifications retrouvées, à savoir la délétion partielle des blocs RS et la duplication des blocs PQ sont bel et bien associées à une hausse de la réplication et de la transcription virale. Néanmoins des expériences complémentaires avec d'autres échantillons de départ sont nécessaires pour confirmer l'apparition spontanée des rrNCCR *in vitro* et leur impact sur la biologie du virus.

Une limite de cette étude est le recueil rétrospectif des données *in vivo* avec un suivi non homogène et pas forcément précoce après la greffe, contrairement à l'étude de Gosert et al (1) dont une partie de l'étude a été réalisée sur une cohorte plus importante de patients en prospectif avec étude de la cinétique d'apparition des formes réarrangées. Une autre limite de l'étude est l'échec d'amplification de la région NCCR sur 62% des prélèvements sélectionnés (13 patients ; 29,5%), ce qui peut être à l'origine d'un biais de répartition des patients entre les groupes réarrangé et archétype.

Ce décalage entre les résultats obtenus *in vivo* en rétrospectif et *in vitro* de l'effet des rrNCCR sur la réplication et la transcription virale ne permet pas de poser une conclusion franche sur une pathogénicité virale accrue due aux formes rrNCCR. Il est cependant intéressant de remarquer que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, les séquences réarrangées présentent des profils similaires. Notamment au niveau du bloc R qui est délété chez 9 des 11 patients ayant des rrNCCR et également dans les populations majoritaires de nos expériences *in vitro*. De même, la duplication de la région du bloc PQ est fréquemment retrouvée, chez 8 des 11 patients ainsi que dans 3 des 4 expériences menées *in vitro*. Les sites de facteurs de transcriptions associés à la délétion du bloc R ont déjà été présentés comme inhibiteurs de la transcription des gènes précoces (NFI-4) ou tardifs (NFI-3), leur suppression est donc cohérente avec une hausse de la transcription virale. De même les sites de facteurs de transcription au niveau de la jonction PQ ont été montrés comme des activateurs de la réplication virale (sp1-1 et NFI-2). (108,111,112).

Le deuxième axe de recherche de cette thèse s'est orienté vers la réponse immunitaire anti-BKPyV et son rôle dans le contrôle de la réactivation à BK virus. Le principal objectif était d'observer si une réponse immunitaire cellulaire précoce prévenait la réactivation virale. Pour répondre à cette question, une cohorte de 160 patients a été suivie prospectivement sur un an post-greffe. Les patients ont été classés dans trois groupes différents selon leur réactivation virale au cours du suivi. Des prélèvements de sang, d'urines et de cellules ont été effectués à

---

différents temps post-transplantation (mois 1, 2, 3, 6, 9) avec des points de suivis supplémentaires pour les patients ayant une réactivation.

Le résultat principal de cette partie expérimentale est que l'absence de réponse cellulaire à M3 post-transplantation ne peut pas être utilisée comme test diagnostique en clinique pour déterminer si le BKPyV réactivera. Tout d'abord, parce que les niveaux de réponses cellulaires sont faibles et semblent transitoires ce qui pourrait conduire à une sous-estimation des patients répondeurs. Ensuite parce que le mois 3 après transplantation est déjà trop tardif (la majorité des patients ont déjà réactivé dans les trois premiers mois post-transplantation). Enfin, parce que la valeur prédictive positive d'un tel test serait bien trop faible pour être utile en clinique.

Les comparaisons de nos résultats avec ceux présentés dans la littérature sont difficiles dans le sens où il n'y a pas de protocole standardisé pour mesurer la réponse immunitaire anti-BKPyV. Cependant, des observations concordent, notamment une détection plus importante d'une réponse médiée par les LT-CD4 que par les LT-CD8 (125,129,132). Nos observations concordent également sur la réponse immunitaire humorale. En effet, nous observons une hausse du taux d'anticorps anti-BKPyV dans le temps chez les patients ayant une réactivation virale tandis que ce taux reste stable chez les patients ne présentant pas de réactivation. Cette hausse d'anticorps n'étant pas corrélée à un contrôle de la réplication virale, nos observations rejoignent l'hypothèse proposée par Bohl (119) selon laquelle la réponse humorale ne contribuerait pas à la résolution de l'infection mais servirait de marqueur de la réactivation virale.

D'autres résultats diffèrent des données de la littérature, notamment en ce qui concerne la réponse polyfonctionnelle. La récente publication de Schmidt suggérait que les patients avec une réactivation virale présentaient une réponse polyfonctionnelle moindre par rapport aux patients qui contrôlaient l'infection. Nos résultats ne montrent pas de différence de réponse polyfonctionnelle, en terme d'intensité ou de fréquence entre nos différents groupes. Cependant, la population dans notre groupe 3 (groupe virémique fort) étant restreinte, la robustesse statistique de nos résultats est peut être insuffisante pour trancher cette question.

La cinétique d'évolution de la réponse cellulaire post-transplantation est encore à ce jour peu investiguée. Cependant nos résultats concordent avec ceux de l'étude de Schachtner qui parvient à la conclusion que l'intensité de la réponse immunitaire cellulaire au moment du diagnostic n'était pas prédictive de l'évolution ou non vers une réactivation virale (135).

Des études supplémentaires multicentriques permettraient de valider nos résultats avec une robustesse statistique plus solide. La détection de la réponse immunitaire cellulaire pourrait

---

être améliorée en utilisant des pools de peptides antigéniques comme proposé par Trydzenskaya (130), ce qui devrait améliorer la sensibilité et éviter des faux négatifs.

En conclusion, cette thèse a permis de développer les connaissances sur deux facteurs de risque de la pathogénicité du BKPyV : les réarrangements de la région NCCR et la réponse immunitaire cellulaire anti-BKPyV. Les réarrangements de la région NCCR ont clairement un effet sur la réplication virale *in vitro*. Les sites de fixations aux facteurs de transcriptions délétés ou dupliqués sont de toute évidence la clé du contrôle de la réplication et de la transcription virale. Nos résultats *in vitro* concordent avec les données de la littérature sur les régions les plus fréquemment touchées (délétions, du bloc R et duplication des blocs PQ). Pour aller plus loin, on peut proposer deux principales pistes. La première est de mettre en place des mutations ponctuelles au niveau de chaque site de fixation à un facteur de transcription sur une région wwNCCR incluse dans un vecteur d'expression et d'observer les effets sur la transcription virale. La deuxième serait de monter un protocole sur une cohorte prospective de patients ayant une réactivation virale et de corrélérer leur forme NCCR à l'intensité de leur réactivation virale. Il serait également nécessaire de passer à un séquençage de type *deep-sequencing* pour avoir un aperçu plus complet des sous populations virales présentes. L'étude de la réponse immunitaire post-transplantation sur la cohorte prospective a permis de mettre en évidence que l'absence d'une réponse cellulaire à M3 post-transplantation n'est pas associée à la réactivation du BKPyV. Nos résultats sur la réponse humorale concordent avec les données de la littérature scientifique, cette dernière ne semblant pas être un facteur de résolution de l'infection mais pouvant servir de marqueur de la réactivation virale. Nos résultats à M3 sur la réponse cellulaire sont également en accord avec les données de la littérature, avec une réponse principalement orientée LT-CD4+. Les résultats sur la réponse polyfonctionnelle restent mitigés, surtout à cause d'un effectif faible dans notre groupe de patients virémiques ; une mise en place d'un protocole de suivi multicentrique permettrait de palier à ce problème. Enfin, l'étude de la cinétique de la réponse immunitaire cellulaire semble être une piste intéressante pour approfondir le rôle de cette dernière sur la réactivation virale.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med.* 14 avr 2008;205(4):841-52.
2. Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* juin 1953;83(2):414-21.
3. van Regenmortel MH, Mayo MA, Fauquet CM, Maniloff J. Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch Virol.* 2000;145(10):2227-32.
4. Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, et al. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol.* sept 2011;156(9):1627-34.
5. Polyomaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Calvignac-Spencer S, Feltkamp MCW, Daugherty MD, Moens U, Ramqvist T, et al. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch Virol.* juin 2016;161(6):1739-50.
6. Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe.* 25 juin 2010;7(6):509-15.
7. Gross L. « Spontaneous » leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med.* janv 1951;76(1):27-32.
8. Mishra R, Chen AT, Welsh RM, Szomolanyi-Tsuda E. NK cells and gammadelta T cells mediate resistance to polyomavirus-induced tumors. *PLoS Pathog.* mai 2010;6(5):e1000924.
9. Swanson PA, Lukacher AE, Szomolanyi-Tsuda E. Immunity to polyomavirus infection: the polyomavirus-mouse model. *Semin Cancer Biol.* août 2009;19(4):244-51.
10. Cheng SM, Blume M, Lee SG, Hung PP, Hirsch VM, Johnson PR. Coexpression of biologically active simian immunodeficiency virus (SIV) Rev and Env in an SV40 system: the SIV rev gene regulates env expression. *Virology.* août 1990;177(2):816-9.
11. Sweet BH, Hilleman MR. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med.* nov 1960;105:420-7.

12. Howley PM, Livingston DM. Small DNA tumor viruses: Large contributors to biomedical sciences. *Virology*. févr 2009;384(2):256-9.
13. Cereghini S, Herbomel P, Jouanneau J, Saragosti S, Katinka M, Bourachot B, et al. Structure and function of the promoter-enhancer region of polyoma and SV40. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1983;47 Pt 2:935-44.
14. Aloni Y, Bratosin S, Dhar R, Laub O, Horowitz M, Khoury G. Splicing of SV40 mRNAs: a novel mechanism for the regulation of gene expression in animal cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1978;42 Pt 1:559-70.
15. Banerji J, Olson L, Schaffner W. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell*. juill 1983;33(3):729-40.
16. Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. août 1977;74(8):3171-5.
17. Reich NC, Levine AJ. Specific interaction of the SV40 T antigen-cellular p53 protein complex with SV40 DNA. *Virology*. févr 1982;117(1):286-90.
18. DeCaprio JA, Garcea RL. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol*. avr 2013;11(4):264-76.
19. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*. 19 juin 1971;1(7712):1257-60.
20. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 19 juin 1971;1(7712):1253-7.
21. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 22 févr 2008;319(5866):1096-100.
22. van der Meijden E, Janssens RWA, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MCW. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog*. 2010;6(7):e1001024.
23. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MAA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol*. avr 2007;81(8):4130-6.
24. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*. 4 mai 2007;3(5):e64.
25. Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, et al. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol*. mai 2011;85(9):4586-90.

26. Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, et al. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J Virol.* oct 2012;86(19):10321-6.
27. Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, et al. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology.* 20 févr 2013;436(2):295-303.
28. Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, Moens U, et al. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PloS One.* 2013;8(3):e58021.
29. Mishra N, Pereira M, Rhodes RH, An P, Pipas JM, Jain K, et al. Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. *J Infect Dis.* 15 nov 2014;210(10):1595-9.
30. White MK, Safak M, Khalili K. Regulation of gene expression in primate polyomaviruses. *J Virol.* nov 2009;83(21):10846-56.
31. Takemoto KK, Mullarkey MF. Human papovavirus, BK strain: biological studies including antigenic relationship to simian virus 40. *J Virol.* sept 1973;12(3):625-31.
32. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* oct 2003;3(10):611-23.
33. Luo C, Hirsch HH, Kant J, Randhawa P. VP-1 quasispecies in human infection with polyomavirus BK. *J Med Virol.* janv 2012;84(1):152-61.
34. Nakanishi A, Shum D, Morioka H, Otsuka E, Kasamatsu H. Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *J Virol.* sept 2002;76(18):9368-77.
35. Bennett SM, Broekema NM, Imperiale MJ. BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes Infect.* août 2012;14(9):672-83.
36. Yogo Y, Sugimoto C, Zhong S, Homma Y. Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications. *Rev Med Virol.* juill 2009;19(4):185-99.
37. Neu U, Allen S-AA, Blaum BS, Liu Y, Frank M, Palma AS, et al. A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003688.
38. Eash S, Querbes W, Atwood WJ. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol.* nov 2004;78(21):11583-90.
39. Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A. Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol.* août 2007;81(16):8552-62.



40. Moriyama T, Sorokin A. Intracellular trafficking pathway of BK Virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology*. 20 févr 2008;371(2):336-49.
41. Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol*. févr 2009;83(3):1350-8.
42. Delbue S, Comar M, Ferrante P. Review on the relationship between human polyomaviruses-associated tumors and host immune system. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:542092.
43. Harris KF, Christensen JB, Imperiale MJ. BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *J Virol*. avr 1996;70(4):2378-86.
44. White MK, Khalili K. Interaction of retinoblastoma protein family members with large T-antigen of primate polyomaviruses. *Oncogene*. 28 août 2006;25(38):5286-93.
45. Smith RD, Galla JH, Skahan K, Anderson P, Linnemann CC, Ault GS, et al. Tubulointerstitial nephritis due to a mutant polyomavirus BK virus strain, BKV(Cin), causing end-stage renal disease. *J Clin Microbiol*. juin 1998;36(6):1660-5.
46. Chen Y, Sharp PM, Fowkes M, Kocher O, Joseph JT, Koralnik IJ. Analysis of 15 novel full-length BK virus sequences from three individuals: evidence of a high intra-strain genetic diversity. *J Gen Virol*. sept 2004;85(Pt 9):2651-63.
47. Abend JR, Joseph AE, Das D, Campbell-Cecen DB, Imperiale MJ. A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *J Gen Virol*. mai 2009;90(Pt 5):1238-45.
48. Ali SH, Kasper JS, Arai T, DeCaprio JA. Cul7/p185/p193 Binding to Simian Virus 40 Large T Antigen Has a Role in Cellular Transformation. *J Virol*. mars 2004;78(6):2749-57.
49. Seo GJ, Fink LHL, O'Hara B, Atwood WJ, Sullivan CS. Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J Virol*. oct 2008;82(20):9823-8.
50. Imperiale MJ. Polyomavirus miRNAs: the beginning. *Curr Opin Virol*. août 2014;7:29-32.
51. Broekema NM, Imperiale MJ. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 mai 2013;110(20):8200-5.
52. Fanning E, Zhao K. SV40 DNA replication: from the A gene to a nanomachine. *Virology*. 20 févr 2009;384(2):352-9.
53. Tikhanovich I, Nasheuer HP. Host-specific replication of BK virus DNA in mouse cell extracts is independently controlled by DNA polymerase alpha-primase and inhibitory activities. *J Virol*. juill 2010;84(13):6636-44.

54. Ellis LC, Norton E, Dang X, Korálnik IJ. Agnogene deletion in a novel pathogenic JC virus isolate impairs VP1 expression and virion production. *PloS One*. 2013;8(11):e80840.
55. Johannessen M, Walquist M, Gerits N, Dragset M, Spang A, Moens U. BKV agnoprotein interacts with  $\alpha$ -soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein, and negatively influences transport of VSVG-EGFP. *PloS One*. 2011;6(9):e24489.
56. Gerits N, Moens U. Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology*. 25 oct 2012;432(2):316-26.
57. Okada Y, Suzuki T, Sunden Y, Orba Y, Kose S, Imamoto N, et al. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep*. mai 2005;6(5):452-7.
58. Suzuki T, Semba S, Sunden Y, Orba Y, Kobayashi S, Nagashima K, et al. Role of JC virus agnoprotein in virion formation. *Microbiol Immunol*. sept 2012;56(9):639-46.
59. Jiang M, Zhao L, Gamez M, Imperiale MJ. Roles of ATM and ATR-mediated DNA damage responses during lytic BK polyomavirus infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002898.
60. Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology*. 15 mars 2013;437(2):63-72.
61. Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ. BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. *Semin Cancer Biol*. août 2009;19(4):252-60.
62. Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene*. 11 août 2003;22(33):5192-200.
63. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. avr 2009;10(4):321-2.
64. Zheng H-Y, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, et al. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect*. févr 2007;9(2):204-13.
65. Nishimoto Y, Zheng H-Y, Zhong S, Ikegaya H, Chen Q, Sugimoto C, et al. An Asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis. *J Mol Evol*. juill 2007;65(1):103-11.
66. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog*. mars 2009;5(3):e1000363.
67. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 15 mars 2009;199(6):837-46.

68. Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J. BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: implications for transmission. *Virology*. 25 nov 2009;394(2):183-93.
69. Comar M, Zanotta N, Rossi T, Pelos G, D'Agaro P. Secondary lymphoid tissue as an important site for WU polyomavirus infection in immunocompetent children. *J Med Virol*. août 2011;83(8):1446-50.
70. Comar M, Zanotta N, Bovenzi M, Campello C. JCV/BKV and SV40 viral load in lymphoid tissues of young immunocompetent children from an area of north-east Italy. *J Med Virol*. juill 2010;82(7):1236-40.
71. Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol*. 1982;10(2):91-9.
72. Sundsfjord A, Spein AR, Lucht E, Flaegstad T, Seternes OM, Traavik T. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol*. mai 1994;32(5):1390-4.
73. Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol*. janv 2000;66(1):238-45.
74. McQuaig SM, Scott TM, Lukasik JO, Paul JH, Harwood VJ. Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl Environ Microbiol*. juin 2009;75(11):3379-88.
75. Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, et al. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol*. août 2000;81(Pt 8):1967-73.
76. Pietropaolo V, Di Taranto C, Degener AM, Jin L, Sinibaldi L, Baiocchini A, et al. Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol*. déc 1998;56(4):372-6.
77. Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Cocca N, Zaffaroni M, et al. Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in humans. *J Gen Virol*. mai 2011;92(Pt 5):1044-50.
78. Koskenvuo M, Dumoulin A, Lautenschlager I, Auvinen E, Mannonen L, Anttila V-J, et al. BK polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis among pediatric allogeneic bone marrow transplant recipients: treatment response and evidence for nosocomial transmission. *J Clin Virol*. janv 2013;56(1):77-81.
79. Heritage J, Chesters PM, McCance DJ. The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *J Med Virol*. 1981;8(2):143-50.

80. Azzi A, De Santis R, Ciappi S, Leoncini F, Sterrantino G, Marino N, et al. Human polyomaviruses DNA detection in peripheral blood leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *J Neurovirol.* déc 1996;2(6):411-6.
81. Reploeg MD, Storch GA, Clifford DB. Bk virus: a clinical review. *Clin Infect Dis.* 15 juill 2001;33(2):191-202.
82. Rice SJ, Bishop JA, Apperley J, Gardner SD. BK virus as cause of haemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. *Lancet.* 12 oct 1985;2(8459):844-5.
83. Randhawa PS, Demetris AJ. Nephropathy due to polyomavirus type BK. *N Engl J Med.* 4 mai 2000;342(18):1361-3.
84. Akazawa Y, Terada Y, Yamane T, Tanaka S, Aimoto M, Koh H, et al. Fatal BK virus pneumonia following stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* déc 2012;14(6):E142-146.
85. Galan A, Rauch CA, Otis CN. Fatal BK polyoma viral pneumonia associated with immunosuppression. *Hum Pathol.* sept 2005;36(9):1031-4.
86. Lesprit P, Chaline-Lehmann D, Authier FJ, Ponnelle T, Gray F, Levy Y. BK virus encephalitis in a patient with AIDS and lymphoma. *AIDS.* 15 juin 2001;15(9):1196-9.
87. Jørgensen GEK, Hammarin A-L, Bratt G, Grandien M, Flaegstad T, Johnsen JI. Identification of a unique BK virus variant in the CNS of a patient with AIDS. *J Med Virol.* mai 2003;70(1):14-9.
88. Hedquist BG, Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Nennesmo I, Sundelin B, et al. Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology.* janv 1999;106(1):129-32.
89. Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Hedquist BG, Nennesmo I, Sundelin B, et al. BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis and nephritis in a patient with AIDS. *AIDS.* 18 juin 1999;13(9):1071-5.
90. Bohl DL, Brennan DC. BK virus nephropathy and kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* juill 2007;2 Suppl 1:S36-46.
91. Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E, Fink JC, Wali R, et al. Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *Am J Transplant.* nov 2001;1(4):373-81.
92. Hirsch HH, Randhawa P, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* mars 2013;13 Suppl 4:179-88.
93. Koh MJ, Lim BJ, Noh S, Kim YH, Jeong HJ. Urinary decoy cell grading and its clinical implications. *Korean J Pathol.* juin 2012;46(3):233-6.

- 
94. Andrei G, Snoeck R, Vandeputte M, De Clercq E. Activities of various compounds against murine and primate polyomaviruses. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 1997;41(3):587-93.
  95. Kuypers DRJ, Vandooren A-K, Lerut E, Evenepoel P, Claes K, Snoeck R, et al. Adjuvant low-dose cidofovir therapy for BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* août 2005;5(8):1997-2004.
  96. Wu S-W, Chang H-R, Lian J-D. The effect of low-dose cidofovir on the long-term outcome of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* mars 2009;24(3):1034-8.
  97. Bernhoff E, Tylden GD, Kjerpeseth LJ, Gutteberg TJ, Hirsch HH, Rinaldo CH. Leflunomide inhibition of BK virus replication in renal tubular epithelial cells. *J Virol.* févr 2010;84(4):2150-6.
  98. Josephson MA, Gillen D, Javaid B, Kadambi P, Meehan S, Foster P, et al. Treatment of renal allograft polyoma BK virus infection with leflunomide. *Transplantation.* 15 mars 2006;81(5):704-10.
  99. Sener A, House AA, Jevnikar AM, Boudville N, McAlister VC, Muirhead N, et al. Intravenous immunoglobulin as a treatment for BK virus associated nephropathy: one-year follow-up of renal allograft recipients. *Transplantation.* 15 janv 2006;81(1):117-20.
  100. Mazalrey S, McIlroy D, Bressollette-Bodin C. BK polyomavirus: virus-cell interactions, host immune response, and viral pathogenesis. *Virologie.* 2015;19(5):8-24.
  101. Markowitz RB, Eaton BA, Kubik MF, Latorra D, McGregor JA, Dynan WS. BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions. *J Virol.* août 1991;65(8):4515-9.
  102. Negrini M, Sabbioni S, Arthur RR, Castagnoli A, Barbanti-Brodano G. Prevalence of the archetypal regulatory region and sequence polymorphisms in nonpassed BK virus variants. *J Virol.* sept 1991;65(9):5092-5.
  103. Moens U, Johansen T, Johnsen JI, Seternes OM, Traavik T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes.* 1995;10(3):261-75.
  104. Yogo Y, Zhong S, Xu Y, Zhu M, Chao Y, Sugimoto C, et al. Conserved archetypal configuration of the transcriptional control region during the course of BK polyomavirus evolution. *J Gen Virol.* août 2008;89(Pt 8):1849-56.
  105. Moens U, Van Ghelue M. Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. *Virology.* 20 janv 2005;331(2):209-31.

106. Rubinstein R, Schoonakker BC, Harley EH. Recurring theme of changes in the transcriptional control region of BK virus during adaptation to cell culture. *J Virol.* mars 1991;65(3):1600-4.
107. Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa PS. Polyomavirus BK non-coding control region rearrangements in health and disease. *J Med Virol.* août 2007;79(8):1199-207.
108. Liang B, Tikhonovich I, Nasheuer HP, Folk WR. Stimulation of BK virus DNA replication by NFI family transcription factors. *J Virol.* mars 2012;86(6):3264-75.
109. Kraus RJ, Shadley L, Mertz JE. Nuclear factor 1 family members mediate repression of the BK virus late promoter. *Virology.* 15 août 2001;287(1):89-104.
110. Moens U, Subramaniam N, Johansen B, Johansen T, Traavik T. A steroid hormone response unit in the late leader of the noncoding control region of the human polyomavirus BK confers enhanced host cell permissivity. *J Virol.* avr 1994;68(4):2398-408.
111. Abend JR, Imperiale MJ. Transforming growth factor-beta-mediated regulation of BK virus gene expression. *Virology.* 15 août 2008;378(1):6-12.
112. Bethge T, Hachemi HA, Manzetti J, Gosert R, Schaffner W, Hirsch HH. Sp1 sites in the noncoding control region of BK polyomavirus are key regulators of bidirectional viral early and late gene expression. *J Virol.* mars 2015;89(6):3396-411.
113. Priftakis P, Bogdanovic G, Kalantari M, Dalianis T. Overrepresentation of point mutations in the Sp1 site of the non-coding control region of BK virus in bone marrow transplanted patients with haemorrhagic cystitis. *J Clin Virol.* avr 2001;21(1):1-7.
114. Womer KL, Huang Y, Herren H, Dibadj K, Peng R, Murawski M, et al. Dendritic cell deficiency associated with development of BK viremia and nephropathy in renal transplant recipients. *Transplantation.* 15 janv 2010;89(1):115-23.
115. Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:163-94.
116. Trydzenskaya H, Juerchott K, Lachmann N, Kotsch K, Kunert K, Weist B, et al. The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients. *Kidney Int.* août 2013;84(2):359-65.
117. Bauman Y, Nachmani D, Vitenshtein A, Tsukerman P, Drayman N, Stern-Ginossar N, et al. An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell Host Microbe.* 17 févr 2011;9(2):93-102.
118. Tonnerre P, Gérard N, Gavlovsky P-J, Mazalrey S, Hourmant M, Cheneau M-L, et al. MICA Mutant A5.1 Influences BK Polyomavirus Reactivation and Associated Nephropathy After Kidney Transplantation. *J Infect Dis.* 29 avr 2016;

119. Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA. BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J Clin Virol.* oct 2008;43(2):184-9.
120. Ginevri F, De Santis R, Comoli P, Pastorino N, Rossi C, Botti G, et al. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation.* 27 avr 2003;75(8):1266-70.
121. Smith JM, McDonald RA, Finn LS, Healey PJ, Davis CL, Limaye AP. Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* déc 2004;4(12):2109-17.
122. Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Schnitzler MA, Major EO, et al. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant.* sept 2005;5(9):2213-21.
123. Sood P, Senanayake S, Sujeet K, Medipalli R, Van-Why SK, Cronin DC, et al. Donor and recipient BKV-specific IgG antibody and posttransplantation BKV infection: a prospective single-center study. *Transplantation.* 27 mars 2013;95(6):896-902.
124. Randhawa PS, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Viscidi RP. Immunoglobulin G, A, and M responses to BK virus in renal transplantation. *Clin Vaccine Immunol.* sept 2006;13(9):1057-63.
125. Binggeli S, Egli A, Schaub S, Binet I, Mayr M, Steiger J, et al. Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* mai 2007;7(5):1131-9.
126. Krymskaya L, Sharma MC, Martinez J, Haq W, Huang EC, Limaye AP, et al. Cross-reactivity of T lymphocytes recognizing a human cytotoxic T-lymphocyte epitope within BK and JC virus VP1 polypeptides. *J Virol.* sept 2005;79(17):11170-8.
127. Chen Y, Trofe J, Gordon J, Du Pasquier RA, Roy-Chaudhury P, Kuroda MJ, et al. Interplay of cellular and humoral immune responses against BK virus in kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy. *J Virol.* avr 2006;80(7):3495-505.
128. Li J, Melenhorst J, Hensel N, Rezvani K, Sconocchia G, Kilical Y, et al. T-cell responses to peptide fragments of the BK virus T antigen: implications for cross-reactivity of immune response to JC virus. *J Gen Virol.* oct 2006;87(Pt 10):2951-60.
129. Mueller K, Schachtner T, Sattler A, Meier S, Friedrich P, Trydzenskaya H, et al. BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. *Transplantation.* 15 janv 2011;91(1):100-7.
130. Trydzenskaya H, Sattler A, Müller K, Schachtner T, Dang-Heine C, Friedrich P, et al. Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity. *Transplantation.* 15 déc 2011;92(11):1269-77.

131. van Aalderen MC, Remmerswaal EBM, Heutinck KM, ten Brinke A, Pircher H, van Lier RAW, et al. Phenotypic and functional characterization of circulating polyomavirus BK VP1-specific CD8<sup>+</sup> T cells in healthy adults. *J Virol.* sept 2013;87(18):10263-72.
132. Schmidt T, Adam C, Hirsch HH, Janssen MWW, Wolf M, Dirks J, et al. BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication. *Am J Transplant.* juin 2014;14(6):1334-45.
133. Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, Basso S, Fontana I, Cioni M, et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant* déc 2007;7(12):2727-35.
134. Prosser SE, Orentas RJ, Jurgens L, Cohen EP, Hariharan S. Recovery of BK virus large T-antigen-specific cellular immune response correlates with resolution of bk virus nephritis. *Transplantation.* 27 janv 2008;85(2):185-92.
135. Schachtner T, Müller K, Stein M, Diezemann C, Sefrin A, Babel N, et al. BK virus-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated nephropathy. *Am J Transplant.* nov 2011;11(11):2443-52.
136. Schachtner T, Stein M, Babel N, Reinke P. The Loss of BKV-specific Immunity From Pretransplantation to Posttransplantation Identifies Kidney Transplant Recipients at Increased Risk of BKV Replication. *Am J Transplant.* août 2015;15(8):2159-69.
137. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis.* déc 2012;55(12):1678-89.
138. Han Lee ED, Kemball CC, Wang J, Dong Y, Stapler DC, Hamby KM, et al. A mouse model for polyomavirus-associated nephropathy of kidney transplants. *Am J Transplant.* mai 2006;6(5 Pt 1):913-22.
139. Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Inhibitory effect of gamma interferon on BK virus gene expression and replication. *J Virol.* janv 2007;81(1):272-9.
140. Wilson JJ, Lin E, Pack CD, Frost EL, Hadley A, Swimm AI, et al. Gamma interferon controls mouse polyomavirus infection in vivo. *J Virol.* oct 2011;85(19):10126-34.
141. Albrecht JA, Dong Y, Wang J, Breeden C, Farris AB, Lukacher AE, et al. Adaptive immunity rather than viral cytopathology mediates polyomavirus-associated nephropathy in mice. *Am J Transplant.* juin 2012;12(6):1419-28.
142. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant.* août 2005;5(8):1926-33.
143. Bernhoff E, Gutteberg TJ, Sandvik K, Hirsch HH, Rinaldo CH. Cidofovir inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression. *Am J Transplant* 2008 Jul;8(7):1413-22.



144. Bressollette-Bodin C, Claver A, Boutolleau D, Chevallier P, Guillaume T, Gastinne T, et al. Surgical treatment of a foscavir-resistant atypical Cytomegalovirus pneumonia in an allogeneic stem cell transplant recipient. *Haematologica*. mai 2008;93(5):e39-41.
145. Kraus RJ, Shadley L, Mertz JE. Nuclear factor 1 family members mediate repression of the BK virus late promoter. *Virology*. 15 août 2001;287(1):89-104.
146. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*. 15 août 2002;347(7):488-96.
147. Hirsch HH, Randhawa P, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant mars* 2013;13 Suppl 4:179-88.
148. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant. mars* 2005;5(3):582-94.
149. Alméras C, Foulongne V, Garrigue V, Szwarc I, Vetromile F, Segondy M, et al. Does reduction in immunosuppression in viremic patients prevent BK virus nephropathy in de novo renal transplant recipients? A prospective study. *Transplantation*. 27 avr 2008;85(8):1099-104.
150. Hirsch HH, Vincenti F, Friman S, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, et al. Polyomavirus BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study. *Am J Transplant. janv* 2013;13(1):136-45.
151. Hariharan S, Cohen EP, Vasudev B, Orentas R, Viscidi RP, Kakela J, et al. BK virus-specific antibodies and BKV DNA in renal transplant recipients with BKV nephritis. *Am J Transplant. nov* 2005;5(11):2719-24.

**ANNEXES**



# BK polyomavirus: virus-cell interactions, host immune response, and viral pathogenesis

Simon Mazalrey<sup>1</sup>  
Dorian McLroy<sup>1</sup>  
Céline Bressollette-Bodin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> EA 4271 Immunovirologie  
et polymorphisme génétique,  
Nantes University,  
1, rue Gaston Veil,  
44000 Nantes, France

<sup>2</sup> Virology laboratory, Nantes University  
Hospital, 9, quai Moncoussu,  
44000 Nantes, France  
<celine.bressollette@univ-nantes.fr>

**Abstract.** The BK polyomavirus (BKPyV) is one of the main human polyomaviruses. After primary infection, it establishes a persistent infection, and acts as an opportunistic pathogen, innocuous in immunocompetent hosts, but causing potentially serious pathology in the context of immunosuppression, in particular in kidney and hematopoietic stem cell graft recipients. Much progress has been made in recent years in the description of virus-cell interactions, but many aspects of viral physiopathology remain mysterious, principally due to the asymptomatic nature of infection in immunocompetent individuals and the lack of an animal model. The characteristics of the antiviral immune response are beginning to become more clearly understood, particularly in kidney transplant patients. Work in these areas is important in order to identify patients at high risk of developing a severe infection. Indeed, in the absence of an effective antiviral therapy few therapeutic options are available, and patient management remains based on modulation of immunosuppressive therapy.

**Key words :** BK polyomavirus, immune response, renal transplantation

## Introduction

BK polyomavirus (BKPyV) was, along with the JC polyomavirus (JCPyV), one of the first two human polyomaviruses to be identified. It was isolated in 1970 from the urine of a kidney transplant recipient. The patient's initials were used to name the virus, while the isolate itself was named the Gardner strain, after the lead investigator [1]. BKPyV is a member of the *Polyomaviridae* family, which has recently been expanded to include 12 new human viruses, discovered since 2007 (*table 1*).

BKPyV is a typical example of an opportunistic virus, which provokes overt pathology almost exclusively in the context of immunosuppression. It causes tubulo-interstitial nephropathies referred to as polyomavirus-associated nephropathy (PVAN), particularly in kidney transplant recipients, and is associated with hemorrhagic cystitis in hematopoietic stem cell recipients. As the number of graft recipients continues to expand, aided by the development of new immunosuppressive treatments, BKPyV is set to remain an important source of morbidity in these patient populations, since no specific antiviral treatment is available for BKPyV infection. Work over the last decade has

significantly advanced our understanding of mechanisms by which this virus interacts with its host. However, due to the lack of a suitable animal model, many gaps remain, particularly in relation to pathogenesis at the level of the whole organism.

The aim of the current review is to summarize recent advances in BKPyV research, with particular attention to host cell-virus interactions and the antiviral immune response. Current recommendations concerning the management of BKPyV infections in renal transplantation will also be covered.

## Structure and genome organization

The *Polyomaviridae* are small, non-enveloped viruses with a diameter of 40-45 nm. The viral genome is double-stranded super-coiled circular DNA that, together with the host-cell histone proteins H2A, H2B, H3 and H4, makes up a mini-chromosome. Like all small virus genomes of, it is organized so as to maximize the coding capacity in a minimum of space (5 kB), using alternative splicing and alternative translation start codons to express six distinct viral proteins from two primary RNA transcripts. The genome is divided into three functional regions: the

**Reprints:** C. Bressollette-Bodin

Table 1 Human polyomaviruses.

Name	Abbreviation	Pathology	Biological compartment for virus detection	Reference
<b>BK polyomavirus</b>	BKPyV	Tubulo-interstitial nephropathy, hemorrhagic cystitis, ureteric stenosis	Kidney, urine	[1]
<b>JC polyomavirus</b>	JCPyV	Progressive multifocal leucoencephalopathy (PML)	CSF	[130]
<b>KI polyomavirus</b>	KIPyV	?	Respiratory secretions	[131]
<b>WU polyomavirus</b>	WUPyV	?	Respiratory secretions	[132]
<b>Merkel Cell polyomavirus</b>	MCPyV	Merkel cell carcinoma	Skin	[133]
<b>Human polyomavirus 6</b>	HPyV6	?	Skin	[134]
<b>Human polyomavirus 7</b>	HPyV7	?	Skin	
<b>Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus</b>	TSPyV	Trichodysplasia spinulosa	Skin	[135]
<b>Human polyomavirus 9</b>	HPyV9	?	Urine	[136]
<b>Malawi polyomavirus</b>	MWPyV	?	Faeces	[137]
<b>Saint-Louis polyomavirus</b>	STLPyV	?	Faeces	[138]
<b>Human polyomavirus 12</b>	HPyV12		Digestive tract	[139]
<b>New Jersey PyV</b>	NJPyV	Myositis	Endothelial cells (muscle biopsy)	[140]

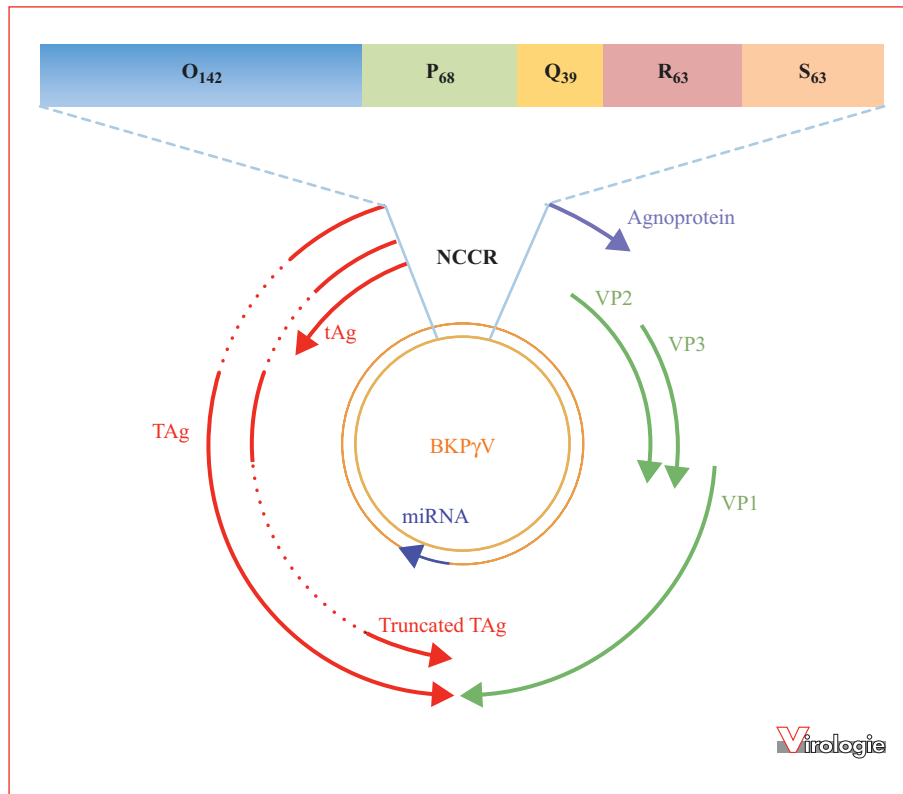
non-coding control region (NCCR), and two protein coding regions known as the early (coding for the T-antigens), and late regions (coding for the agnoprotein, VP1, VP2 and VP3). The early and late regions are transcribed in opposing directions from the NCCR (*figure 1*).

#### *The non-coding control region (NCCR)*

The NCCR is defined as the sequence between the initiation codon of the large T antigen (TA<sub>g</sub>) of the early region, and the initiation codon of the agnoprotein in the late region. It is one of the principal determinants of host specificity in the *Polyomaviridae*. In the case of BKPyV, the NCCR is divided into five sequence blocks: O (142 bp), P (68 pb), Q (39 pb), R (63 pb) et S (63 pb) [2]. The O sequence contains the virus genome's origin of replication and the transcription initiation site for the early genes, symmetrical sequences which are specifically recognized by the TA<sub>g</sub>, and an NF-κB binding site. This part of the NCCR is highly conserved. The P-Q-R blocks constitute an enhancer region, and carry consensus motifs for the binding of host-cell transcription factors. Many putative transcription factor-binding sites have been identified by bioinformatics analysis, not all of which have been confirmed experimentally. In particular, the P-block contains a cAMP responsive element (CRE); the P-Q junction carries a GC-rich region and Sp1 binding sites; while several binding sites for the NF1 and Ets1

transcription factors are found throughout the P, Q, and R blocks. Sp1 and Ets-1 could play key role in the regulation of viral gene transcription [3]. Finally, the distal region of the NCCR, the S-block contains an estrogen response element, and the initiation site of late gene transcription.

The NCCR can accumulate insertion-deletion mutations that distinguish wild-type, or "archetype" BKPyV strains (NCCR<sub>ww</sub>) from rearranged strains (NCCR<sub>rr</sub>). The archetype NCCR<sub>ww</sub> is found in the urine of both healthy individuals and patients with active BKPyV replication, and is generally considered to be the form that is transmitted between hosts. In patients with prolonged viremia, characteristic of an uncontrolled infection, the frequency at which NCCR<sub>rr</sub> sequences are detected increases over time, and can eventually dominate the viral quasi-species [4]. NCCR<sub>rr</sub> sequences have been found in kidney biopsies, urine and blood cells [5-7]. Different NCCR<sub>rr</sub> strains have been detected in urine or biopsies from kidney transplant recipients, and different forms can coexist in the same patient [8]. *In vitro*, repeated passage of archetype strains isolated from urine samples resulted in the emergence of NCCR<sub>rr</sub> variants [9], indicating that NCCR<sub>rr</sub> viruses have an increased replicative capacity in cell culture. According to Gosert *et al.*, NCCR<sub>rr</sub> viruses are also associated with higher plasma viral loads and more severe histological lesions than archetype viruses [4]. The same group



**Figure 1. Schematic representation of the BK polyomavirus (BKPyV) genome.**

The circular double-stranded DNA genome is organized in three regions: the early region (TAg, tAg, truncTAg), the late region (agnoprotein, VP1, VP2, VP3), and the non-coding control region (NCCR). Transcription of early and late genes proceeds in opposing directions. Solid arrows represent exons, dashed lines represent introns. The viral miRNA is transcribed from the late transcript.

The archetype form of the NCCR is represented as a series of sequence blocks (OPQRS) with the number of base-pairs in each block shown in subscript.

developed an experimental model to determine the relative levels of early and late transcription from a given NCCR sequence, leading them to conclude that different NCCRrr sequences have different phenotypes: certain NCCRrr are associated with stronger early transcription, and weaker late transcription, others direct moderate levels of both early and late transcription, while a third group of NCCRrr sequences are characterized by weak early transcription and moderate late transcription [3]. The absence of host control of infection in immunosuppressed patients could therefore favour the emergence of NCCRrr forms which replicate more rapidly, thus leading to a positive-feedback loop that amplifies viral pathogenicity.

### The early region

The early region codes for the Large T- and small t-antigens (respectively, TAg and tAg), as well as a truncated T-antigen (truncTAg). They are produced by alternative splicing of the early transcript, and share the same 81 N-terminal amino acids. The T-antigens, particularly TAg, are multifunctional

proteins that play a major role in the viral replication cycle. They are involved in major replication of the viral genome, late gene transcription, and interact with many cellular factors that regulate the cell cycle and apoptosis. Their roles will be explained more precisely in the following paragraphs.

### The late region

The late region codes for the capsid proteins VP1, VP2 and VP3, which are also products of alternative splicing of the same primary transcript. VP1 is the major capsid protein, which constitutes the external face of the BKPyV capsid, while the minor capsid proteins VP2 and VP3 are situated on the internal face of the capsid. VP1 forms pentamers, and one copy of either VP2 or VP3 associates with a VP1 pentamer to form a capsomere, 72 of which form the T = 7 icosahedral BKPyV capsid.

Polymorphism in the *VP1* gene is used to classify BKPyV into genotypes (I-IV) and, for certain genotypes, into sub-groups. The hypervariable sequence is situated in the N-terminal region of the protein, between amino acids

61-82 that correspond to the BC-loop on the exterior of the capsid that is directly involved in interactions with BKPyV's ganglioside receptor. The four genotypes also correspond to distinct neutralizing serotypes. Genotypes I and IV are the most frequent in the population, although their relative frequencies vary with their geographical distribution [10, 11]. The robustness of phylogenetic analysis of BKPyV strains can be improved by considering both TAG and VP1 sequences [10].

The late region also codes for the non-structural agnoprotein, large quantities of which are produced during the later stages of the replication cycle (reviewed in [12]). The agnoprotein is a phosphoprotein found in three PyV: SV40, BKPyV and JCPyV, but it is absent from the more recently identified human *Polyomaviridae*. In infected cells, it is localised in the cytoplasm with a perinuclear distribution, and is also associated with the endoplasmic reticulum (ER). It can also be found on the internal face of the plasma membrane. The agnoprotein is phosphorylated on serine-11, and viruses carrying mutations at this position show reduced propagation in cell culture, as do mutant viruses that do not express the agnoprotein [13].

### Viral miRNA

Like other polyomaviruses, BKPyV codes for a viral miRNA in the 3' region of the late transcript which is complementary to the mRNAs coding for TAg and tAg [14]. Since the miRNA sequence is exactly complementary to its targets, its production leads to degradation of the early mRNAs. Because the miRNA sequence is identical in JCPyV and BKPyV, this implies that these two viruses would be able to regulate each other's expression, in the case of co-infection. Both the 3p and 5p miRNAs derived from the pre-miRNA hairpin appear to have specific functions [15]. Recent work has shown that the expression of BKPyV miRNAs is under the control of the sequences in the NCCR, and is correlated with the level of expression of the viral late genes. The same study found that BKPyV miRNAs regulate expression of the early genes before the initiation of genome replication, and therefore act as a brake on viral replication. Interestingly, the reduction of viral replication was only observed in viruses with archetypal, not those with rearranged NCCR. Since the archetypal forms are those that are transmitted in the population, the authors suggest that miRNAs may have a role in viral persistence [16].

## Replication cycle of BK polyomavirus

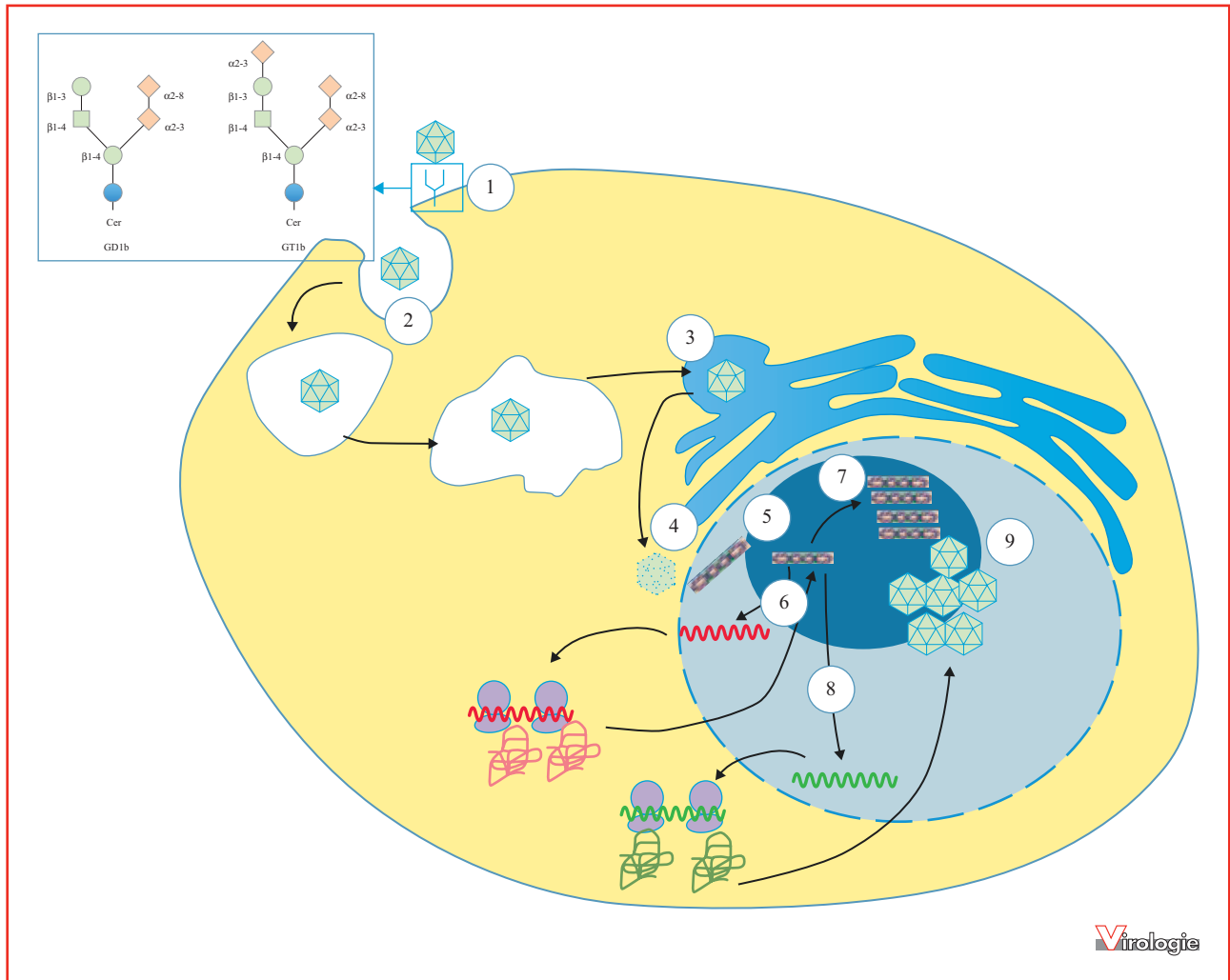
The principal steps in the replication cycle of BKPyV are shown in *figure 2*.

### Host cell receptors, entry and decapsidation

The gangliosides GD1b and GT1b are required for the attachment and entry of BKPyV into human renal proximal tubular epithelial cells (hRPTECs) and expression of these gangliosides renders cells susceptible to infection [17]. More recently, supplementation of Vero cells with the GD2 and GD3 gangliosides was shown to increase the efficacy with which these cells can be infected with BKPyV. The common structural feature shared by the GD1b, GT1b, GD2 and GD3 gangliosides is an  $\alpha$  2-8 di-sialic acid motif. Crystallographic analysis of VP1 pentamers complexed with GD3 confirmed that the interaction between VP1 and the GD3 ganglioside directly involved the  $\alpha$  2-8 sialic acid dimer [18].

Unlike JCPyV, which is internalised by clathrin-mediated endocytosis, BKPyV enters into Vero cells and hRPTECs *via* caveosomes [19, 20]. This pathway involves cholesterol-rich membrane microdomains and the formation of endocytic vesicles by the action of caveolin proteins, notably caveolin-1. Electron microscopic analysis of PVAN biopsies showed the presence of virus particles inside vesicles with a morphology consistent with that of caveosomes, indicating that this pathway is also involved in infections *in vivo*.

After internalisation, BKPyV particles are transported along the microtubule network to the ER [21-23]. Transit *via* the ER is specific to polyomaviruses – no other nuclear replicating DNA virus uses this route to the nucleus. The interactions between ER proteins and polyomavirus capsids have been studied most extensively in SV40 and murine PyV (MPyV), and it is assumed that similar mechanisms are involved during BKPyV entry. Polyomavirus decapsidation is initiated in the ER, notably by the action of protein disulphide-isomerase, which unlinks the disulphide bridges that form covalent bonds between VP1 pentamers in the capsid [24, 25]. Chaperone proteins (ERp29, BiP, BAP31, DNAJ) allow the minor capsid proteins VP2 and VP3 to become accessible, and this is important for subsequent steps in virus entry. Polyomavirus capsids are then transported from the ER to the cytosol *via* the ER-associated degradation (ERAD) pathway, involving transmembrane ER proteins of the Derlin family [23, 24]. The ERAD pathway is linked to the degradation of misfolded proteins by the proteasome, and proteasome activity is also required for BKPyV entry. The end result of the interaction between polyomaviruses and the ERAD-proteasome machinery is the retrograde transport of a partially uncoated virus particle into the cytosol. Nuclear localisation signals in VP2/VP3 [26-28] then guide the particle to the nucleus. Further disassembly of the particle may accompany transport through nuclear entry pores [29].



**Figure 2. BK polyomavirus (BKPyV) replication cycle.**

1. Attachment to host-cell ganglioside receptors. 2. Internalisation by caveolin-mediated endocytosis. 3. Transport of caveosomes to the endoplasmic reticulum. 4. Partial decapsidation and retrograde transport from ER to cytoplasm. 5. Nuclear import of virus genomes through nuclear pores. In the nucleus, replication occurs in structures associating viral genomes and elements of the host cell (PML bodies, DDR). 6. First wave of transcription: early genes. TAg and tAg return to the nucleus, associate with the viral genome and cellular factors involved in viral DNA replication. 7. Viral DNA replication. 8. Second wave of transcription: late genes. 9. Capsid assembly around newly synthesized copies of the viral genome.

### Early gene expression

Viral gene expression is controlled by the early and late promoters situated in the NCCR. These promoters are oriented in opposite directions, so that transcription of the early and late regions progresses outwards from the NCCR, using opposite strands of the virus genome as a template.

The early region is transcribed in the hours following the entry of the viral genome into the nucleus. The most abundant early protein, TAg, is a multifunctional protein that interacts both with the viral genome to initiate replica-

tion, and with numerous cellular proteins. The structure and function of TAg have been extensively described in the SV40 model, which is highly relevant to BKPyV, since SV40 TAg shares 76% homology with BKPyV TAg. The TAg of all *Polyomaviridae* contain four conserved regions: the J region, an origin binding domain (OBD), a zinc binding domain, and an ATPase domain. The OBD region recognizes the sequence GAGGC, which is repeated four times in the O region of the NCCR. After TAg binding, the O region also binds replication protein A (RPA). The zinc binding domain and the ATPase domain both contribute



to the helicase activity of TAg: the zinc binding domain is required for the formation of TAg hexamers, while the ATPase domain provides the energy necessary for the helicase activity [30].

#### *Modulation of the cell cycle and activation of DNA repair mechanisms*

TAg forces cells to advance into the S phase of the cell cycle, and activates the DNA damage response (DDR) in order to enhance viral genome replication. The J-domain cooperates with a fifth region of TAg, the LXCXE domain, to bind pRB/p130/p107 and disrupt interactions between pRB and the E2F transcription factors. Release of E2F from pRB permits the formation of E2F-E2F dimers, which can then drive the expression of genes required for progress into the S-phase [30].

Viral genome replication co-localizes with nuclear PML bodies, which are involved in the DDR and gene transcription [31, 32]. BKPyV infection of renal epithelial cells activates protein kinases essential for the DDR: the ataxia telangiectasia, mutated (ATM) kinase, and to a lesser extent, the ATM and Rad-3 related (ATR) kinase. In cells deficient for ATM and ATR, BKPyV provokes major alterations in cellular DNA [33, 34]. Cellular DNA repair mechanisms therefore appear to be important for the replication of viral DNA, and for the integrity of the host genome during infection. Although ATR seems to be responsible for phosphorylation of the SV40 TAg, the precise mechanisms by which BKPyV proteins interact with DDR proteins are not currently known.

The specific functions of tAg include the inactivation of the PP2A protein, which leads to activation of the D1 and A cyclins, and hence to progression into the G1 and S phases of the cell cycle. In contrast, the precise role of the truncated TAg is not known.

#### *Viral DNA replication*

Since polyomaviruses do not code for a viral DNA polymerase, TAg orchestrates viral DNA replication by recruiting the multiple cellular proteins that are required for viral DNA replication. After binding to the origin of replication, TAg monomers assemble into two hexamers. After this first step, DNA strand separation is initiated by the helicase activity of TAg then completed by the cellular RPA protein. Next, the cellular DNA polymerase  $\alpha$  primase complex synthesizes an RNA primer that is used by DNA polymerase  $\lambda$ . Topoisomerase I is also required in order to maintain a relaxed conformation of viral DNA during its replication (for review, see [30, 35]).

#### *Late gene expression, encapsidation, and release*

It is generally considered that late gene expression begins after initiation of genome replication. However, the precise relationship between early gene expression, genome replication and late gene expression in BKPyV appears to be influenced by viral miRNA expression and the nature of the NCCR. Capsid proteins expressed from late mRNAs contain nuclear localisation sequences, and are therefore imported into the nucleus, where they assemble infectious particles. The mechanisms by which BKPyV virions are released from infected cells have not been described in detail, but may involve the viroporin activity of the agnoprotein.

## **Natural history of BK polyomavirus infection**

#### *Transmission*

The most frequent mode of transmission of BKPyV is likely to be *via* the oropharyngeal route. This is supported by the young age at seroconversion (65 to 90% seropositivity before age 10) and the detection of viral DNA in the saliva and oropharyngeal lymphoid tissues [36-38]. The presence of the virus in urine and in the environment is also compatible with oral contamination from these sources [39]. The detection of BKPyV DNA in mononuclear cells indicates that blood transmission is also a possibility. Finally, isolated cases of nosocomial transmission during hematopoietic stem cell (HSC) transplant in a pediatric patient [40] and vertical transplacental transmission [41] have also been reported.

#### *Primary infection, persistence, and reactivation*

Primary infection is asymptomatic, or may be associated with signs of non-specific respiratory infection. The virus is assumed to reach its target organs after dissemination *via* the bloodstream, but there are very few data available during the early stages of infection, due to the rather non-specific nature, or indeed absence, of clinical symptoms. In adults, virus reactivation from sites of persistent infection in the renal-urinary tract is clearly indicated by the detection of BKPyV in the urine both in immunosuppressed patients and, albeit at lower viral loads, in healthy individuals [42, 43]. However, the mechanisms of viral persistence are not clearly understood: does BKPyV exhibit “true” latency, without replication or expression of viral genes, or is a low level of chronic virus replication always present?

### Cellular tropism

*In vitro*, BKPyV can productively infect a number of different cell types including human and simian renal epithelial cells, human fibroblasts, fetal neuronal cell lines, endothelial cells, and epithelial cells from sub-mandibular and parotid salivary glands [36]. *In vivo*, BKPyV genomic DNA has been detected in many different tissues (renal epithelia, the urothelium, prostate gland, salivary glands, brain. . .) although renal epithelial cells appear to constitute the main reservoir of persistently infected cells. Viral DNA has also been found in lymphocyte populations in healthy subjects and patients with active BKPyV replication [44, 45], and this is consistent with earlier experiments indicating the presence of BKPyV receptors on the surface of lymphocytes by the formation of rosettes [46]. The role of lymphocytes in the natural history of BKPyV infection has not been clearly described. In the case of JCPyV, the virus can enter B-lymphocytes, and although it does not actively replicate in these cells, virus can then be transmitted to glial cells. This suggests a model in which B-lymphocytes transport the virus across the blood-brain barrier [47]. A similar mechanism in BKPyV primary infection could explain viral dissemination from the initial site of infection to distant target tissues such as the urothelium and the renal epithelia. However, the lymphocyte sub-population carrying viral DNA have not been identified, and there is currently no convincing data to show that BKPyV can replicate actively in lymphocytes, nor has cell-to-cell transmission involving lymphocytes been demonstrated.

### Pathogenicity

#### Hemorrhagic cystitis

BKPyV is one of the infectious agents associated with hemorrhagic cystitis (HC), particularly in the context of HSC graft. HC is characterized by the association of dysuria, pain, and varying degrees of hematuria. In the most severe cases, hematuria can lead to clotting and obstruction of the urinary vessels, hemorrhage, and kidney failure. HC associated with BKPyV is observed in 5-15% of patients within two months after HSC graft [48]. It should be distinguished from other causes of HC in this patient population: drug toxicity in the case of chemotherapy, or other viral infection (human cytomegalovirus HCMV, adenovirus). The pathogenesis of BKPyV associated HC has not been completely elucidated. It appears to be the result of several contributing factors: lesions in the urothelial mucosa secondary to induction therapies; viral reactivation favoured by immunosuppression during aplasia, and contributing to urothelial lesions; and finally, an inflammatory reaction caused by a lymphocytic infiltrate and destruction of infected cells by

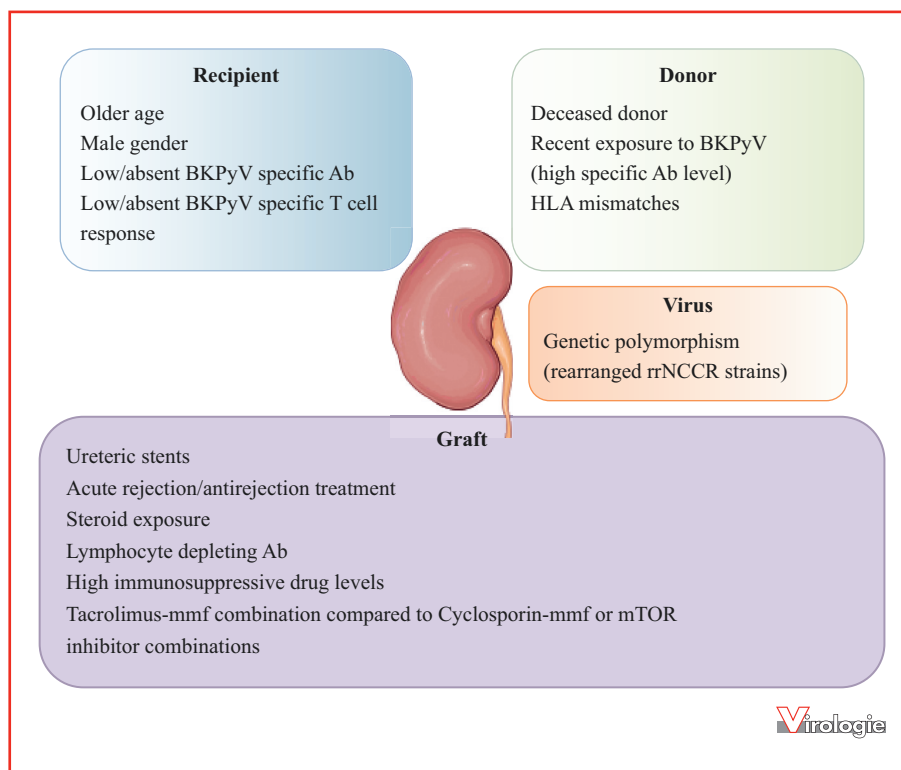
cytotoxic T-lymphocytes (CTL) during engraftment [49]. Diagnosis of BKPyV associated HC in the context of HSC graft is based on the detection of BKPyV in the urine. Patients with a high urine viral load, or with viremia are at higher risk for development of HC [50, 51]. Newer graft protocols (cord blood graft, and the use of haploidentical HSC) seem to be associated with higher levels of BKPyV reactivation [52].

#### BK polyomavirus associated tubulo-interstitial nephropathy

PVAN is a tubulo-interstitial nephropathy that usually occurs within 12-24 months following a kidney transplant. The first stage of this disease is characterized by prolonged and intense viral replication in epithelial cells of the kidney and urinary tract. As viral replication continues unchecked, it induces a marked cytopathic effect involving lysis of epithelial cells and release of virus into the blood due to lesions in the basal membrane. Secondly, inflammatory cells migrate into the interstitium, and this leads to tubular atrophy and interstitial fibrosis [53]. This is accompanied by progressive graft dysfunction, which can be irreversible in later stages of the disease. Urothelial cells are also the site of intense viral replication and are the principal source of virus found in the urine [54].

Although small amounts of BKPyV can be found in circulating lymphocytes, in the majority of patients, viremia is a reflection of intense viral replication in the renal/urinary tissue. The absence of viremia is a strong predictor that PVAN will not occur, and the risk that BKPyV replication will evolve into PVAN seems to increase with higher and more prolonged viremia. A level of  $10^4$  copies BKPyV DNA copies per mL is an internationally recognized threshold, above which immunosuppression should be reduced [55].

As with many post-transplant viral pathologies, the risk factors for PVAN include factors related to the donor, the receiver, the graft, and the virus itself (*figure 3*). In the case of BKPyV, therapeutic immunosuppression, which disrupts the equilibrium between virus replication and the host immune response, is the principal factor favouring viral pathogenesis. The rise in frequency of PVAN after kidney transplant coincided with the introduction of more effective immunosuppressive regimens at the end of the 1990s (corticotherapy + antiproliferative agent + calcineurin inhibitor), which highlighted the importance of cellular immunity in the control of BKPyV replication [56, 57]. However, the tissue environment is certainly an important co-factor in BKPyV reactivation, since PVAN is observed almost exclusively in the context of kidney transplantation, and only very rarely in patients receiving other solid organ transplants, or HSC grafts [58]. The specific therapies that have been frequently associated with post-graft viremia



**Figure 3.** Risk factors for polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) in the setting of renal transplantation.

are: prolonged exposure to corticoids; conditioning involving lymphocyte depletion therapies; the association of tacrolimus-mycophenolate mofetil rather than ciclosporin-mycophenolate mofetil or mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Other risk factors that have been reported – though not always observed in all patient cohorts – are those related to the donor (number of HLA mismatches, deceased donor, seropositive donor with high anti-BKPyV antibody titre); the receiver (greater age, male sex, seronegative or low anti-BKPyV antibody titre), and the graft itself (ureteral stent, viral co-infection) [55].

#### *Ureteric stenosis*

BKPyV was initially isolated from a renal transplant patient suffering from a ureteric stenosis, and the virus has been repeatedly implicated in this pathology. It occurs in adult and pediatric kidney recipients and has also been reported following HSC graft.

#### *Other pathologies associated with BK polyomavirus*

Isolated clinical cases associating BKPyV with a variety of pathologies have been described in strongly immunosuppressed patients. These include pneumopathies,

meningo-encephalitis, and disseminated infections with vascular involvement [59-61].

Recently, BKPyV has been implicated in a salivary gland pathology in human immunodeficiency virus (HIV) seropositive patients characterized by inflammation with lymphocytic infiltration and fibrosis of the salivary glands. The arguments in favour of BKPyV involvement are the detection of higher viral loads in the saliva of patients with this pathology compared to either healthy controls or other HIV-positive individuals, and the capacity of BKPyV to replicate in salivary gland epithelial cells [62, 63].

#### *Oncogenicity*

The well-characterized interactions between polyomavirus early proteins and tumor suppressor genes, such as pRB, suggest that BKPyV could potentially be oncogenic. Consequently, several studies have analyzed cancer tissues for the presence of BKPyV, either by PCR or by in situ hybridization. Although the virus genome has been found in tumors, the results remain controversial [64]. For example, BKPyV has been reproducibly detected in prostate tissue, and at a higher frequency in prostate tumors compared to healthy tissue. This observation has led some authors to propose that BKPyV, through the action of TAg and tAg, could be

a factor in the early stages of prostate cancer (for review see [65]). The transforming potential of the viral early proteins has been demonstrated *in vitro* in non-permissive cells in which an abortive infection occurs, stopping at the early phase of the virus replication cycle. In addition, infection of rodents with BKPyV induces various types of tumor [66]. On the other hand, the arguments in favour of an oncogenic role of BKPyV in its natural host are circumstantial in nature, and there is no formal proof that BKPyV causes cancer in humans. Taking all the existing data into account, the International Agency for Research on Cancer has classified BKPyV and JCPyV as “possibly carcinogenic to humans” (group 2B, [67]).

### Antiviral immune response

#### *Innate immunity*

Among the innate effector cells of the immune system, natural killer (NK) cells play an important role in the early control of viral infections [68]. Their functions are controlled by a complex balance between signals transmitted by activating and inhibitory receptors on the NK cell surface. The highly polymorphic *Killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR receptors), which bind to HLA class I molecules are one such group of NK cell receptors. One recent retrospective study of kidney transplant recipients found a higher number of KIR activating alleles, in particular the activating receptor KIR3DS1, in control patients compared to those who developed PVAN [69]. However, in a previous study of transplant recipients, a protective role for KIR3DS1 was shown for HCMV, but not for BKPyV infection [70]. These results therefore need to be confirmed in a larger patient cohort. Furthermore, results from our group show that polymorphism in the gene coding for the *MHC class I polypeptide-related sequence A* (MICA) protein, which is a ligand of the activating receptor *natural-killer group 2, member D* (NKG2D), are associated with susceptibility to BKPyV infection. The underlying mechanism behind this association could involve changes in the level of expression of MICA on the surface of infected cells, and hence to different levels of NK activation according to the MICA genotype [71]. Very few data exist concerning the type I interferon response to BKPyV, either *in vitro* or *in vivo*. Some recent results suggest that the inflammation seen in PVAN lesions could be related to activation of intracellular innate immune receptors, such as *Toll-like receptor 3* (TLR3) or *Retinoic acid-inducible gene-1* (RIG-1) [72]. However, the mechanism by which these molecules, that are known to specifically recognize RNA, become activated during PyV infection remains to be clarified. In addition, very few studies have addressed the role of dendritic cells in

BKPyV infection. One publication found that the number of circulating myeloid dendritic cells in kidney transplant recipients before graft was lower in patients who developed BKPyV viremia than in those who did not [73].

#### *Humoral response*

Following the discovery of BKPyV, epidemiological studies employing a variety of serological techniques (inhibition of hemagglutination, neutralization, complement fixation and indirect immunofluorescence) found very high seroprevalence rates for BKPyV infection on every country studied. Indeed, one study of sera from diverse ethnic groups found that BKPyV had a worldwide distribution, with only a few isolated populations living in the Amazon rain forest with seroprevalence rates < 20% [74]. Studies from the 1970s using inhibition of hemagglutination to detect BKPyV-specific antibodies found that seroconversion occurs in developed countries during early childhood, with seroprevalence rates from 35-55% in children 1-5 years old, which rise after school entry. Peak seroprevalence was found in adolescents and young adults, followed by a progressive reduction with age. Similar results have also been found in studies using *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) or *radioimmunoassay* (RIA) techniques [42].

More recently, Buck's group has developed pseudotype viruses composed of BKPyV capsids carrying a reporter gene in place of the viral genome. These biological tools were used to study the neutralizing response against different BKPyV genotypes [75, 76]. In a cohort of healthy adults from North America, more than 80% of sera had neutralizing activity against BKPyV genotype I capsids, while fewer than 50% of sera had detectable neutralizing activity against genotypes III or IV. Different BKPyV genotypes therefore constitute different neutralizing serotypes. Furthermore, the sera of certain individuals neutralized subtype Ib1 capsids, but not the closely related subtype Ib2. Using pseudotype viruses with chimeric Ib1/Ib2 VP1 proteins, it was possible to show that differences in the BC-loop were responsible for the extreme specificity of this neutralizing antibody response. As previously noted, sequence differences between BKPyV genotypes are concentrated in the BC-loop, and this explains why the neutralizing antibody response is genotype-specific.

In the case of HSC grafts, the principal source of virus is the reactivation of latent infection in the receiver, which of course occurs predominantly in seropositive recipients. In one study, the titre of BKPyV-specific antibodies in the receiver was positively correlated with viruria [77], suggesting firstly, that the antibody titre may be an indication of some degree of “occult” virus replication, and secondly, that the presence of antibodies does not prevent reactivation. On



the other hand, a second study of pediatric patients found an inverse correlation between anti-BKPyV titre before HSC graft, and BKPyV viremia after graft [78], which indicates a protective effect of the adaptive antiviral immune response. These two conclusions are not necessarily contradictory, however, since viremia was not correlated with viruria in the study published by Wong *et al.*

In kidney transplant, the situation is more complex, since the virus may be present in both the graft and the receiver. BKPyV infections post-transplant may therefore represent either primary infections (seropositive donor to seronegative receiver), reactivations (seronegative donor to seropositive receiver), or superinfections and/or reactivations (donor and receiver both seropositive). Each of these situations implies a distinct immunological context, and this perhaps explains why the role of the humoral response has not yet been clearly established, despite research on this topic stretching over more than 30 years.

The first study addressing this question, conducted by Andrews *et al.*, found that the combination of seropositive donor to seronegative recipient carried the highest risk of BKPyV infection after kidney transplant [79]. In these first studies, BKPyV replication was not directly detected, but inferred by an increase in the titre of BKPyV-specific antibodies following transplant. In more recent studies, seronegativity of the receiver has been confirmed as a risk factor for the occurrence of viruria, viremia, or PVAN in the context of pediatric kidney transplant [80, 81]. In adult kidney recipients, however, the data are more equivocal. In one study of donor-receiver pairs the serostatus of the donor, but not that of the receiver was associated with post-transplant BKPyV viruria [82]. On the other hand, a more recent study of 192 donor-receiver pairs found the same association between the seropositive donor/seronegative receiver pairing and increased risk of BKPyV infection – in this case defined as post-graft viremia – as that reported by Andrews *et al.* thirty years previously [83]. Furthermore, in adult kidney transplant recipients seropositive for BKPyV, two studies found an inverse correlation between the titre of anti-BKPyV antibodies at the time of transplant, and post-transplant virus replication [84, 85]. The majority of case-control studies are therefore consistent with the idea that pre-existing immunity to the virus has a protective role against BKPyV reactivation and superinfection in the context of adult and pediatric kidney transplant.

Another way to assess the impact of the humoral response on viral replication *in vivo* is to follow its evolution longitudinally following kidney transplant, in parallel with viremia or viruria. For some authors, the increase in anti-BKPyV titres that accompany the resolution of PVAN suggest that the humoral response contributes to resolution of the infec-

tion [86], whereas others consider that increases in antibody titres should be considered simply as markers of viral replication [84]. Furthermore, investigators who studied both the T-lymphocyte and antibody responses to BKPyV antigens concluded that the T-cell response, and not the humoral response, was associated with resolution of the infection [87, 88].

#### *CD4+ and CD8+ T-lymphocyte responses*

Although the *Polyomaviridae* express at least five immunogenic proteins (TAg, tAg, VP1, VP2 and VP3), the study of the T-cell response has generally been restricted to TAg and VP1. The BKPyV and JCPyV genomes share 70% sequence identity, and there is significant antigenic cross-reactivity between the two viruses with respect to both VP1 and TAg [89, 90]. The minor capsid proteins, in particular VP3 [91], can also be targeted by the T-cell response. Stimulating PBMC with pools of peptides from five BKPyV proteins (tAg, TAg VP1, VP2 and VP3), rather than only VP1 and TAg, significantly increases the probability of detecting a positive response [92].

Overall, the frequency of circulating BKPyV-specific T-cells appears to be lower than the frequency of T-cells specific for other persistent viruses that cause opportunistic infection, such as HCMV or EBV. The low level of the BKPyV-specific response may be explained by the restriction of viral reactivation to the urinary tract, with – unlike HCMV or EBV – little or no dissemination into the bloodstream. In a study of 25 healthy subjects, a positive CD8<sup>+</sup> T-cell response was only detected in 60% of cases, despite *in vitro* expansion of specific T-cells by stimulation with VP1 or TAg peptides and IL-2. VP1-specific T-cells were more frequently detected than TAg-specific T-cells. These CD8<sup>+</sup> T-cells were found to have an effector-memory (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) phenotype and were capable of secreting several cytokines after stimulation [93]. More recently, the relationship between the CD4<sup>+</sup> T-cell response against BKPyV and age was studied cross-sectionally in a cohort of 122 healthy subjects. Overall, 34.5% of the study population had a detectable CD4<sup>+</sup> T-cell response, with the highest frequency of positive responses (68.4%) observed in young adults 20-30 years old. This age group also showed the highest titres of BKPyV-specific IgG [94].

#### *Role of BK polyomavirus-specific T-lymphocytes in kidney transplantation*

Over the first months after kidney transplant, in the absence of viral replication, the BKPyV-specific T-cell response remains stable at a low level [95]. However, if BKPyV infection occurs, case-control studies have shown that the BKPyV-specific T-cell response is significantly increased in

patients in the control phase of the infection (that is, when viremia is decreasing), compared to patients with prolonged viremia or histological signs of PVAN [96, 97]. The T-cell response therefore seems to mirror viremia, with decreasing viremia coinciding with an increase in the frequency of circulating virus-specific T-cells [98]. As is the case in other viral infections, polyfunctional T-cells appear to play an important role in the control of viral replication: in a study from Berlin, polyfunctional (IL-2<sup>+</sup>/TNF $\alpha$ <sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> or IL-2<sup>+</sup>/TNF $\gamma$ <sup>+</sup>) T-cells were more frequently detected in patients who rapidly controlled viral replication, compared to those who experienced prolonged viral infection [92].

The level of T-cell responses before transplant does not appear to predict the subsequent course of BKPyV infection. For example, in a cohort of 151 kidney transplant patients, BKPyV-specific IFN $\gamma$  Elispot responses before transplant did not differ between the 24 patients who experienced subsequent BKPyV viremia, and the 127 patients who did not. However, there was a significant reduction in the frequency of BKPyV-specific T-cells after transplant in patients who subsequently became viremic, which was not observed in the non-viremic group. Therefore, the critical factor seems not to be the level of the T-cell response before transplant, but whether this response is maintained during the early time points following kidney transplant [99]. Similarly, in a prospective study of 148 kidney transplant recipients, our group did not find a significant difference in the frequency of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-cells specific for VP1 or TAg between viremic and non-viremic patients, although the absolute number of CD8<sup>+</sup> T-cells was lower at three months post-transplant in the viremic group.

### *Mechanisms of immune escape*

In the SV40 model, viral miRNA appears to constitute a mechanism of escape from the antiviral cytotoxic T-cell response, by down-regulating the expression of TAg [100]. In addition, inhibition of the expression of host-cell ULBP3 by the JCPyV and BKPyV miRNA constitutes an escape mechanism from NK-cell lysis [101]. Therefore, the viral riposte to the host cellular immune response seems to be through the viral miRNA, rather than by the expression of viral proteins that interfere with epitope generation or presentation.

## **Diagnostic markers of BK polyomavirus infection**

### *Serology*

Currently, no commercial reagents exist for the detection of circulating BKPyV-specific antibodies. In practice, BKPyV

serostatus is not determined before transplant, since greater than 80% of the adult population is seropositive for the virus.

### *Detection and quantification of the virus genome by molecular biology*

BKPyV infection is diagnosed by the detection of virus DNA in urine and blood. BKPyV. The performance of real-time quantitative PCR for BKPyV DNA is generally excellent, both for commercial and “in-house” techniques, but it is difficult to directly compare results from different techniques. This implies that patient follow-up should always be assured by the same centre [102].

The quantification of viral RNA by real-time PCR is an alternative to the quantification of viral DNA. However, despite being technically more demanding, this technique has not been shown to improve the diagnosis or follow-up of BKPyV infection [103].

### *Detection of urinary PyV aggregates (“polyomavirus-haufen” test)*

Aggregates of BKPyV particles form in the renal tubules, through lysis of infected cells and release of virions into the tubular lumen. Haufen is a German word meaning “aggregate”, and a positive “polyomavirus-haufen” test on a urine sample correlates with the presence of PVAN. The non-invasive nature of the test makes it a useful diagnostic tool for tissue involvement [104, 105].

### *Detection of urinary decoy cells*

Decoy cells are dystrophic BKPyV-infected urothelial cells that can be observed after Papanicolaou staining. They are large basophilic cells containing large homogeneous nuclei that have a ground glass appearance with a central inclusion body that appears to occupy the whole nucleus. Their presence indicates viral reactivation and replication, and it is associated with high viral loads [106]. Decoy cells should not be confused with other pathological cell types which may have a similar appearance, such as carcinoma cells or cells infected by other viruses, like HCMV. Testing for decoy cells in urine can be used to screen for BKPyV reactivation, but is difficult to apply in large cohorts.

### *Immunohistochemistry on renal biopsies*

PVAN is classified into three histological grades: A, B and C. Stage A is characterized by the presence of moderate cytopathic effects associated with minimal (< 10%) inflammatory lesions, tubular atrophy, and fibrosis. Renal

function is generally conserved at this early stage. Stage B is characterized by more extensive (10-50%) cytopathic effects and inflammatory lesions, associated with tubular atrophy and progressive fibrosis. Stage C is characterized by fibrotic lesions and severe, irreversible tubular atrophy (> 50%), associated with severe graft dysfunction [107]. Confirmatory diagnosis involves the detection of viral antigens by immunohistochemistry. The most frequently used antibodies are specific for SV40 TAG, but cross-react with BKPyV and JCPyV TAG. There are currently no commercial antibodies that are exclusively specific for BKPyV.

## Therapeutic strategies

### *Pre-emptive and curative therapy of polyomavirus-associated nephropathy by modulation of immunosuppression*

In the absence of a specific antiviral therapy with demonstrated efficacy and no harmful side-effects, and knowing that the degree of immunosuppression is the main risk factor for development of PVAN, the management of BKPyV infection is currently based on reduction of pharmacological immunosuppression (figure 4). This strategy can be

Copyright © 2016 John Libbey Eurotext. Téléchargé par UNIVERSITE DE NANTES SECTION SANTE le 26/08/2016.

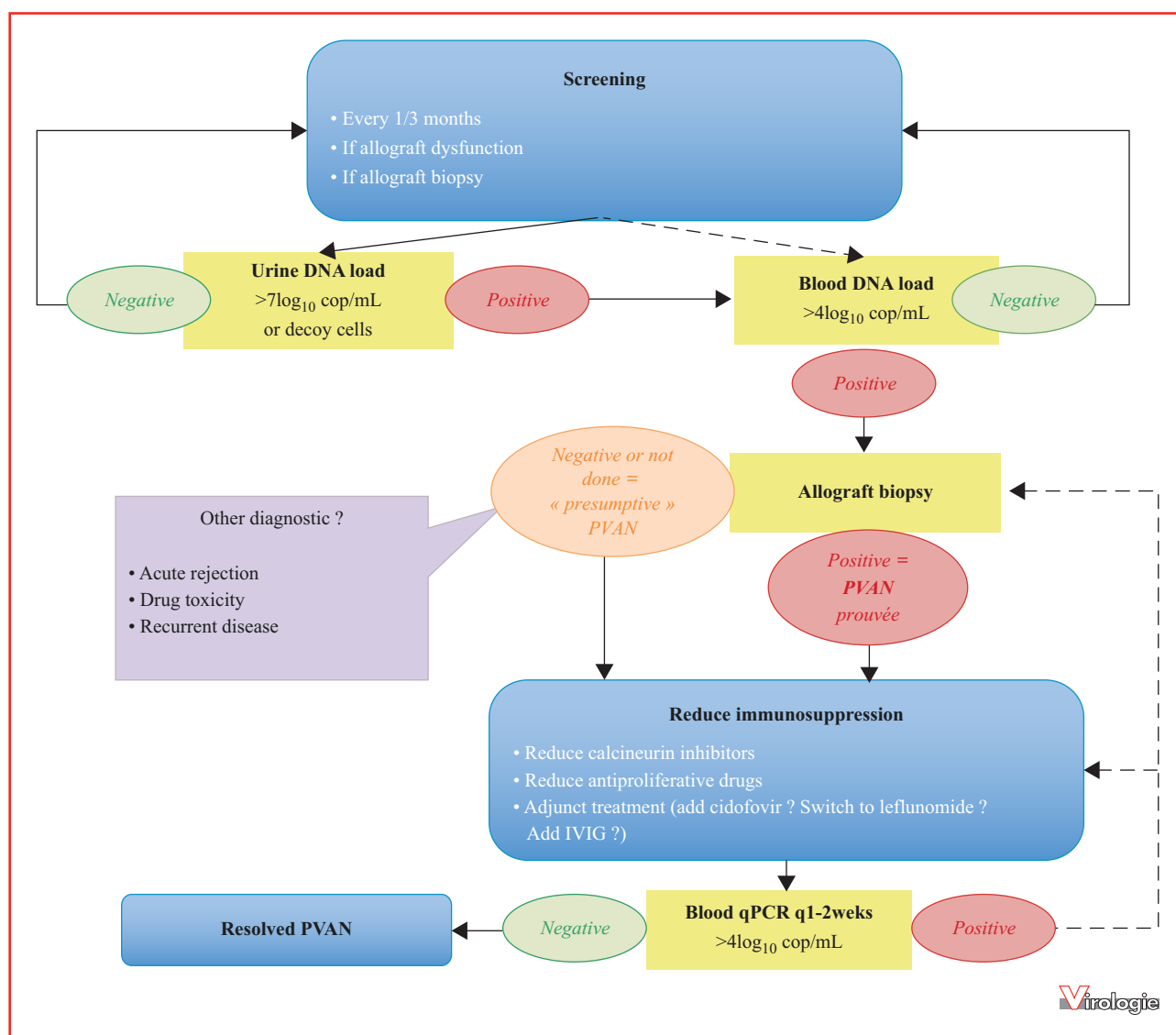


Figure 4. Flow diagram for screening and management of BK polyomavirus (BKPyV) infections in kidney transplantation (from [55]).

applied in the case of histologically confirmed PVAN (curative treatment), as well as cases of probable nephropathy based on positive plasma viremia (pre-emptive treatment). The threshold for therapeutic intervention in the case of pre-emptive treatment is fixed at  $10^4$  DNA copies/mL plasma [55].

The reduction or disappearance of plasma viremia, in addition to the regression of histological PVAN lesions after modification of the immunosuppressive regimen has been reported in many patient cohorts [97, 108-110]. Somewhat surprisingly, the efficacy of this intervention has not been evaluated in prospective randomized trials, nor have the different modes of treatment reduction been rigorously compared.

Immunosuppression following kidney transplant typically involves induction treatment followed by an association of corticosteroids, a calcineurine inhibitor (cyclosporine A or tacrolimus), and an inhibitor of lymphocyte proliferation (mycophenolate mofetil). Different strategies of immunosuppressor modulation have been proposed [55]: in all cases corticotherapy is reduced or discontinued and one of the other two immunosuppressive agents is reduced by 50%. If this is not successful, the dose of the other immunosuppressor is reduced, or one of the two is discontinued. More radical reductions can be envisaged in advanced cases, and other strategies include the replacement of tacrolimus with low-dose cyclosporine or sirolimus, or replacement of mycophenolate mofetil by sirolimus or leflunomide.

### Retransplantation

If patients lose the graft because of PVAN, retransplantation can be envisaged, and a three-year graft survival rate of 93% has been observed in a series of 118 retransplantations [111]. Although successful retransplantation has been reported despite the persistence of BKPyV viremia, it is generally admitted that intense immunosuppression and retransplantation should be avoided during active BKPyV replication [55].

### Antiviral therapies

Antiviral activity has been demonstrated for several molecules *in vitro*. Their use as adjuvant therapies alongside reduction in immunosuppression has generally been investigated in case series or small single centre studies. However, their efficacy *in vivo* appears modest, and difficult to evaluate in the absence of prospective randomized trials.

### Cidofovir and CMX001

Cidofovir (CDV) is an acyclic analog of deoxycytidine monophosphate. Its antiviral activity *in vitro* was first

described for HCMV, and was then confirmed for other *Herpesviridae* (HSV1, HSV2, VZV, EBV, HHV6), and other DNA viruses (papilloma-, adeno-, polyoma-, hepadna-, and poxviruses). *In vitro*, it inhibits BKPyV replication, but has significant cytotoxicity [112]. *In vivo*, the use of CDV is limited by its nephrotoxicity and the data concerning its antiviral efficacy in the context of kidney transplant are somewhat contradictory [113, 114]. In the context of BKPyV-associated HC after HSC graft several investigators have reported reductions in BKPyV viral load and a positive clinical responses following CDV treatment in both adults and pediatric patients [115, 116].

CMX001 (hexadecyloxypropyl-cidofovir, Brincidofovir) is a lipid-conjugated form of CDV with increased oral bioavailability. Cells internalize CMX001 in a manner similar to lysophosphatidylcholine uptake, then CDV is liberated by a phospholipase and becomes active after intracellular phosphorylation. *In vitro*, CMX001 has greater antiviral activity than CDV in HRPTEC and urothelial cells [117, 118]. At the present time, these encouraging *in vitro* results have not yet been validated in clinical studies.

### Leflunomide

Leflunomide is an immunosuppressor used in the treatment of rheumatoid arthritis. More recently, it has been used as an immunosuppressive agent after kidney transplant in order to reduce the administration of nephrotoxic drugs, to prevent chronic rejection, and to protect against viral infections, including HCMV, HSV and BKPyV. It appears to act firstly, by inhibiting the mitochondrial enzyme responsible for the synthesis of orotate, which is an intermediate in the *de novo* synthesis of pyrimidine nucleotides, and secondly, by inhibiting certain tyrosine kinases involved in T- and B-lymphocyte activation. *In vitro*, leflunomide inhibits BKPyV replication [119]. *In vivo*, the encouraging results reported by some investigators [120] have not been confirmed by others [121], and the only randomized study of leflunomide as treatment for PVAN found no beneficial effect on graft survival [122].

### Fluoroquinolones

Fluoroquinolones are antibiotics that target bacterial topoisomerases and also inhibit the replication of BKPyV in HRPTECs [123]. The antiviral effect may be due to interference with the helicase activity of TAG, which interacts with cellular topoisomerase. The replication of SV40 in monkey kidney cells is also inhibited by several different fluoroquinolones [124]. Initial studies reported encouraging reductions in viral load in PVAN patients [120]. However, two recent double-blind randomized studies did not find levofloxacin to be effective as either curative [125] or pre-emptive [126] PVAN therapy.



## Inhibiteurs de mTOR

mTOR inhibitors, such as sirolimus, reduce protein synthesis and limit progression through the cell cycle. In a retrospective study of 15 kidney transplant recipients use of mTOR inhibitors alone, or in combination with other antivirals was associated with favourable evolution of BKPyV infection [127]. These observations have not been replicated in subsequent patient series, and therefore require confirmation in larger patient cohorts.

## Intravenous immunoglobulins

Intravenous immunoglobulins (IVIg) have been repeatedly tested as an adjuvant therapy for PVAN. IVIg contain neutralizing antibodies against all BKPyV genotypes, as shown by their ability to block BKPyV replication in HRPTEC [128, 129]. However, the elevated levels of BKPyV-specific antibodies already present in PVAN patients suggest that antibodies are not sufficient to control viral replication. *In vivo*, the efficacy of IVIg has not been formally demonstrated, particularly since they are generally used in association with reduction of immunosuppression. Some authors have reported favourable evolution of BKPyV infection following IVIg administration, while others have not found any beneficial effects, and serious adverse events, although rare, have also been reported. Once again, well-designed clinical trials will be required in order to determine real therapeutic efficacy of IVIg in the management of BKPyV.

## Conclusion

More than 40 years after the discovery of BKPyV, several aspects of the host-virus interaction are still only partially understood. Outstanding questions include the following: what exactly is the mode of transmission? What is the mechanism of viral persistence? What events at the molecular and cellular level lead to virus reactivation? What elements of the innate and adaptive immune response participate in control of the infection? Are there some BKPyV-associated pathologies – particularly cancers – that remain to be identified? Answering these questions will allow us to improve the management of patients at risk for BKPyV infection and help us identify new therapeutic strategies.

## References

- Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1971; 1: 1253-7.
- White MK, Safak M, Khalili K. Regulation of gene expression in primate polyomaviruses. *J Virol* 2009; 83: 10846-56.

- Bethge T, Hachemi HA, Manzetti J, *et al.* Sp1 sites in the noncoding control region of BK polyomavirus are key regulators of bidirectional viral early and late gene expression. *J Virol* 2015; 89: 3396-411.
- Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, *et al.* Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge *in vivo* in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med* 2008; 205: 841-52.
- Boldorini R, Veggiani C, Turello E, Barco D, Monga G. Are sequence variations in the BK virus control region essential for the development of polyomavirus nephropathy? *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 303-12.
- Randhawa P, Zygmunt D, Shapiro R, *et al.* Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64: 743-7.
- Chatterjee M, Weyandt TB, Frisque RJ. Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *J Med Virol* 2000; 60: 353-62.
- Olsen GH, Hirsch HH, Rinaldo CH. Functional analysis of polyomavirus BK non-coding control region quasispecies from kidney transplant recipients. *J Med Virol* 2009; 81: 1959-67.
- Rubinstein R, Schoonakker BC, Harley EH. Recurring theme of changes in the transcriptional control region of BK virus during adaptation to cell culture. *J Virol* 1991; 65: 1600-4.
- Luo C, Bueno M, Kant J, Martinson J, Randhawa P. Genotyping schemes for polyomavirus BK, using gene-specific phylogenetic trees and single nucleotide polymorphism analysis. *J Virol* 2009; 83: 2285-97.
- Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, *et al.* 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* 2009; 90: 144-52.
- Gerits N, Moens U. Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology* 2012; 432: 316-26.
- Johannessen M, Myhre MR, Dragset M, Tummeler C, Moens U. Phosphorylation of human polyomavirus BK agnoprotein at Ser-11 is mediated by PKC and has an important regulative function. *Virology* 2008; 379: 97-109.
- Seo GJ, Fink LH, O'Hara B, Atwood WJ, Sullivan CS. Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J Virol* 2008; 82: 9823-8.
- Imperiale MJ. Polyomavirus miRNAs: the beginning. *Curr Opin Virol* 2014; 7: 29-32.
- Broekema NM, Imperiale MJ. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 8200-5.
- Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol* 2006; 80: 1361-6.
- Neu U, Allen SA, Blaum BS, *et al.* A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003688.
- Eash S, Querbes W, Atwood WJ. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol* 2004; 78: 11583-90.
- Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A. Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol* 2007; 81: 8552-62.
- Moriyama T, Sorokin A. Intracellular trafficking pathway of BK Virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology* 2008; 371: 336-49.
- Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol* 2009; 83: 1350-8.
- Eash S, Atwood WJ. Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol* 2005; 79: 11734-41.
- Schelhaas M, Malmstrom J, Pelkmans L, *et al.* Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 2007; 131: 516-29.

25. Walczak CP, Tsai B. A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection. *J Virol* 2011 ; 85 : 2386-96.
26. Geiger R, Andrichschke D, Friebe S, *et al.* BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nat Cell Biol* 2011 ; 13 : 1305-14.
27. Goodwin EC, Lipovsky A, Inoue T, *et al.* BiP and multiple DNAJ molecular chaperones in the endoplasmic reticulum are required for efficient simian virus 40 infection. *mBio* 2011 ; 2 : e00101-111.
28. Kuksin D, Norkin LC. Disassembly of simian virus 40 during passage through the endoplasmic reticulum and in the cytoplasm. *J Virol* 2012 ; 86 : 1555-62.
29. Nakanishi A, Shum D, Morioka H, Otsuka E, Kasamatsu H. Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *J Virol* 2002 ; 76 : 9368-77.
30. An P, Saenz Robles MT, Pipas JM. Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Annu Rev Microbiol* 2012 ; 66 : 213-36.
31. Jul-Larsen A, Visted T, Karlsen BO, *et al.* PML-nuclear bodies accumulate DNA in response to polyomavirus BK and simian virus 40 replication. *Exp Cell Res* 2004 ; 298 : 58-73.
32. Jiang M, Entezami P, Gamez M, Stamminger T, Imperiale MJ. Functional reorganization of promyelocytic leukemia nuclear bodies during BK virus infection. *mBio* 2011 ; 2 : e00281-310.
33. Jiang M, Zhao L, Gamez M, Imperiale MJ. Roles of ATM and ATR-mediated DNA damage responses during lytic BK polyomavirus infection. *PLoS Pathog* 2012 ; 8 : e1002898.
34. Verhalen B, Justice JL, Imperiale MJ, Jiang M. Viral DNA Replication-Dependent DNA Damage Response Activation during BK Polyomavirus Infection. *J Virol* 2015 ; 89 : 5032-9.
35. DeCaprio JA, Garcea RL. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2013 ; 11 : 264-76.
36. Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J. BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: implications for transmission. *Virology* 2009 ; 394 : 183-93.
37. Comar M, Zanoita N, Bovenzi M, Campello C. JC/BK and SV40 viral load in lymphoid tissues of young immunocompetent children from an area of north-east Italy. *J Med Virol* 2010 ; 82 : 1236-40.
38. Comar M, Bonifacio D, Zanconati F, *et al.* High prevalence of BK polyomavirus sequences in human papillomavirus-16-positive precancerous cervical lesions. *J Med Virol* 2011 ; 83 : 1770-6.
39. Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol* 2000 ; 66 : 238-45.
40. Koskenvuo M, Dumoulin A, Lautenschlager I, *et al.* BK polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis among pediatric allogeneic bone marrow transplant recipients: treatment response and evidence for nosocomial transmission. *J Clin Virol* 2013 ; 56 : 77-81.
41. Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, *et al.* Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in humans. *J Gen Virol* 2011 ; 92(Pt 5) : 1044-50.
42. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, *et al.* Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 2009 ; 199 : 837-46.
43. Polo C, Perez JL, Mielnichuck A, *et al.* Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. *Clin Microbiol Infect* 2004 ; 10 : 640-4.
44. Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, *et al.* Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol* 2000 ; 81 : 1967-73.
45. Azzi A, De Santis R, Ciappi S, *et al.* Human polyomaviruses DNA detection in peripheral blood leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *J Neurovirol* 1996 ; 2 : 411-6.
46. Possati L, Rubini C, Portolani M, *et al.* Receptors for the human papovavirus BK on human lymphocytes. *Arch Virol* 1983 ; 75 : 131-6.
47. Chapagain ML, Nerurkar VR. Human polyomavirus JC (JCV) infection of human B lymphocytes: a possible mechanism for JCV transmigration across the blood-brain barrier. *J Infect Dis* 2010 ; 202 : 184-91.
48. Dropulic LK, Jones RJ. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2008 ; 41 : 11-8.
49. Leung AY, Yuen KY, Kwong YL. Polyoma BK virus and hemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant* 2005 ; 36 : 929-37.
50. Erard V, Kim HW, Corey L, *et al.* BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2005 ; 106 : 1130-2.
51. Corneille J, Boutolleau D. Infections à virus BK après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. *Virologie* 2011 ; 15 : 115-25.
52. Gilis L, Morisset S, Billaud G, *et al.* High burden of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2014 ; 49 : 664-70.
53. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, *et al.* Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999 ; 67 : 103-9.
54. Funk GA, Gosert R, Comoli P, Ginevri F, Hirsch HH. Polyomavirus BK replication dynamics in vivo and in silico to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants. *Am J Transplant* 2008 ; 8 : 2368-77.
55. Hirsch HH, Randhawa P. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013 ; 13(Suppl 4) : 179-88.
56. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, *et al.* Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2002 ; 347 : 488-96.
57. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005 ; 5 : 1926-33.
58. Limaye AP, Smith KD, Cook L, *et al.* Polyomavirus nephropathy in native kidneys of non-renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005 ; 5 : 614-20.
59. Sandler ES, Aquino VM, Goss-Shohet E, Hinrichs S, Krisher K. BK papova virus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997 ; 20 : 163-5.
60. Petrogiannis-Halioitis T, Sakoulas G, Kirby J, *et al.* BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient. *N Engl J Med* 2001 ; 345 : 1250-5.
61. Medeiros PV, Abage KT, Carvalho VO, Bonfim CM, Raboni SM. Polyomavirus BK: possibly associated skin eruption in a patient with hemorrhagic cystitis. *Pediatr Dermatol* 2011 ; 28 : 76-7.
62. Jeffers L, Webster-Cyriaque JY. Viruses and salivary gland disease (SGD): lessons from HIV SGD. *Adv Dent Res* 2011 ; 23 : 79-83.
63. Burger-Calderon R, Madden V, Hallett RA, Gingerich AD, Nickelait V, Webster-Cyriaque J. Replication of oral BK virus in human salivary gland cells. *J Virol* 2014 ; 88 : 559-73.
64. Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology* 2013 ; 437 : 63-72.
65. Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ. BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. *Semin Cancer Biol* 2009 ; 19 : 252-60.
66. Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene* 2003 ; 22 : 5192-200.
67. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, *et al.* Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *The Lancet Oncology* 2012 ; 13 : 339-40.

68. Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 163-94.
69. Trydzenskaya H, Juerchott K, Lachmann N, et al. The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients. *Kidney Int* 2013; 84: 359-65.
70. Stern M, Elsasser H, Honger G, Steiger J, Schaub S, Hess C. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2008; 8: 1312-7.
71. Tonnerre P, Gerard N, Gavlotsky PJ, Mazalrey S, Hourmant M, Chesneau ML et al. MICA variant influences the immune control of BK polyomavirus reactivation after kidney transplantation. Submitted for publication.
72. Ribeiro A, Wornle M, Motamedi N, et al. Activation of innate immune defense mechanisms contributes to polyomavirus BK-associated nephropathy. *Kidney Int* 2012; 81: 100-11.
73. Womer KL, Huang Y, Herren H, et al. Dendritic cell deficiency associated with development of BK viremia and nephropathy in renal transplant recipients. *Transplantation* 2010; 89: 115-23.
74. Brown P, Tsai T, Gajdusek DC. Seroepidemiology of human papovaviruses. Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. *Am J Epidemiol* 1975; 102: 331-40.
75. Pastrana DV, Brennan DC, Cuburu N, et al. Neutralization serotyping of BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002650.
76. Pastrana DV, Ray U, Magaldi TG, Schowalter RM, Cuburu N, Buck CB. BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. *J Virol* 2013; 87: 10105-13.
77. Wong AS, Chan KH, Cheng VC, Yuen KY, Kwong YL, Leung AY. Relationship of pretransplantation polyoma BK virus serologic findings and BK viral reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 830-7.
78. Laskin BL, Sullivan KE, Hester J, Goebel J, Davies SM, Jodele S. Antibodies to BK virus in children prior to allogeneic hematopoietic cell transplant. *Pediatr Blood Cancer* 2015.
79. Andrews C, Shah KV, Rubin R, Hirsch M. BK papovavirus infections in renal transplant recipients: contribution of donor kidneys. *J Infect Dis* 1982; 145: 276.
80. Ginevri F, De Santis R, Comoli P, et al. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation* 2003; 75: 1266-70.
81. Smith JM, McDonald RA, Finn LS, Healey PJ, Davis CL, Limaye AP. Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4: 2109-17.
82. Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, et al. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant* 2005; 5: 2213-21.
83. Sood P, Senanayake S, Sujeet K, et al. Donor and recipient BKV-specific IgG antibody and posttransplantation BKV infection: a prospective single-center study. *Transplantation* 2013; 95: 896-902.
84. Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA. BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J Clin Virol* 2008; 43: 184-9.
85. Randhawa PS, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Viscidi RP. Immunoglobulin G, A, and M responses to BK virus in renal transplantation. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 1057-63.
86. Hariharan S, Cohen EP, Vasudev B, et al. BK virus-specific antibodies and BKV DNA in renal transplant recipients with BKV nephritis. *Am J Transplant* 2005; 5: 2719-24.
87. Chen Y, Trofe J, Gordon J, et al. Interplay of cellular and humoral immune responses against BK virus in kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy. *J Virol* 2006; 80: 3495-505.
88. Schachtner T, Muller K, Stein M, et al. BK virus-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated nephropathy. *Am J Transplant* 2011; 11: 2443-52.
89. Krymskaya L, Sharma MC, Martinez J, et al. Cross-reactivity of T lymphocytes recognizing a human cytotoxic T-lymphocyte epitope within BK and JC virus VP1 polypeptides. *J Virol* 2005; 79: 11170-8.
90. Li J, Melenhorst J, Hensel N, et al. T-cell responses to peptide fragments of the BK virus T antigen: implications for cross-reactivity of immune response to JC virus. *J Gen Virol* 2006; 87: 2951-60.
91. Mueller K, Schachtner T, Sattler A, et al. BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. *Transplantation* 2011; 91: 100-7.
92. Trydzenskaya H, Sattler A, Muller K, et al. Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity. *Transplantation* 2011; 92: 1269-77.
93. van Aalderen MC, Remmerswaal EB, Heutinck KM, et al. Phenotypic and functional characterization of circulating polyomavirus BK VP1-specific CD8+ T cells in healthy adults. *J Virol* 2013; 87: 10263-72.
94. Schmidt T, Adam C, Hirsch HH, et al. BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication. *Am J Transplant* 2014; 14: 1334-45.
95. Schachtner T, Stein M, Sefrin A, Babel N, Reinke P. Inflammatory activation and recovering BKV-specific immunity correlate with self-limited BKV replication after renal transplantation. *Transpl Int* 2014; 27: 290-301.
96. Binggeli S, Egli A, Schaub S, et al. Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 1131-9.
97. Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 2727-35.
98. Comoli P, Hirsch HH, Ginevri F. Cellular immune responses to BK virus. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 569-74.
99. Schachtner T, Stein M, Babel N, Reinke P. The Loss of BKV-specific Immunity From Pretransplantation to Posttransplantation Identifies Kidney Transplant Recipients at Increased Risk of BKV Replication. *Am J Transplant* 2015; 15: 2159-69.
100. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 2005; 435: 682-6.
101. Bauman Y, Nachmani D, Vitsenshtein A, et al. An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell Host Microbe* 2011; 9: 93-102.
102. Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, Limaye AP, Jerome KR. Marked variability of BK virus load measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2671-80.
103. Astegiano S, Bergallo M, Terlizzi ME, et al. Combined measurement of serum DNA and urine VP1 messenger RNA in monitoring BK virus replication in kidney graft recipients. *Transplant Proc* 2011; 43: 1052-4.
104. Singh HK, Andreoni KA, Madden V, et al. Presence of urinary Haufen accurately predicts polyomavirus nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 416-27.
105. Singh HK, Reisner H, Derebail VK, Kozlowski T, Nicleleit V. Polyomavirus nephropathy: quantitative urinary polyomavirus-Haufen testing accurately predicts the degree of intrarenal viral disease. *Transplantation* 2015; 99: 609-15.
106. Hirsch HH, Randhawa P. BK virus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9(Suppl 4): S136-46.
107. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant* 2004; 4: 2082-92.
108. Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, et al. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive



polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant* 2010; 10: 2615-23.

**109.** Hardinger KL, Koch MJ, Bohl DJ, Storch GA, Brennan DC. BK virus and the impact of pre-emptive immunosuppression reduction: 5-year results. *Am J Transplant* 2010; 10: 407-15.

**110.** Brennan DC, Agha I, Bohl DL, *et al.* Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 2005; 5: 582-94.

**111.** Dharnidharka VR, Cherkh WS, Neff R, Cheng Y, Abbott KC. Retransplantation after BK virus nephropathy in prior kidney transplant: an OPTN database analysis. *Am J Transplant* 2010; 10: 1312-5.

**112.** Bernhoff E, Gutteberg TJ, Sandvik K, Hirsch HH, Rinaldo CH. Cidofovir inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression. *Am J Transplant* 2008; 8: 1413-22.

**113.** Kuypers DR, Bammens B, Claes K, *et al.* A single-centre study of adjuvant cidofovir therapy for BK virus interstitial nephritis (BKVIN) in renal allograft recipients. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 417-9.

**114.** Kuypers DR, Vandooren AK, Lerut E, *et al.* Adjuvant low-dose cidofovir therapy for BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 1997-2004.

**115.** Cesaro S, Hirsch HH, Faraci M, *et al.* Cidofovir for BK virus-associated hemorrhagic cystitis: a retrospective study. *CID* 2009; 49: 233-40.

**116.** Gaziev J, Paba P, Miano R, *et al.* Late-onset hemorrhagic cystitis in children after hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia and sickle cell anemia: a prospective evaluation of polyoma (BK) virus infection and treatment with cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 662-71.

**117.** Rinaldo CH, Gosert R, Bernhoff E, Finstad S, Hirsch HH. 1-O-hexadecyloxypropyl cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4714-22.

**118.** Tylden GD, Hirsch HH, Rinaldo CH. Brincidofovir (CMX001) Inhibits BK Polyomavirus Replication in Primary Human Urothelial Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 3306-16.

**119.** Bernhoff E, Tylden GD, Kjerpeseth LJ, *et al.* Leflunomide inhibition of BK virus replication in renal tubular epithelial cells. *J Virol* 2010; 84: 2150-6.

**120.** Williams JW, Javaid B, Kadambi PV, *et al.* Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. *N Engl J Med* 2005; 352: 1157-8.

**121.** Faguer S, Hirsch HH, Kamar N, *et al.* Leflunomide treatment for polyomavirus BK-associated nephropathy after kidney transplantation. *Transpl Int* 2007; 20: 962-9.

**122.** Guasch A, Roy-Chaudhury P, Woodle ES, *et al.* Assessment of efficacy and safety of FK778 in comparison with standard care in renal transplant recipients with untreated BK nephropathy. *Transplantation* 2010; 90: 891-7.

**123.** Sharma BN, Li R, Bernhoff E, Gutteberg TJ, Rinaldo CH. Fluoroquinolones inhibit human polyomavirus BK (BKV) replication in primary human kidney cells. *Antiviral Res* 2011; 92: 115-23.

**124.** Josephson MA, Gillen D, Javaid B, *et al.* Treatment of renal allograft polyoma BK virus infection with leflunomide. *Transplantation* 2006; 81: 704-10.

**125.** Knoll GA, Humar A, Fergusson D, *et al.* Levofloxacin for BK virus prophylaxis following kidney transplantation: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014; 312: 2106-14.

**126.** Lee BT, Gabardi S, Grafals M, *et al.* Efficacy of levofloxacin in the treatment of BK viremia: a multicenter, double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9: 583-9.

**127.** Sanchez Fructoso AI, Calvo N, Perez-Flores I, *et al.* Mammalian target of rapamycin signal inhibitors could play a role in the treatment of BK polyomavirus nephritis in renal allograft recipients. *Transpl Infect Dis* 2011; 13: 584-91.

**128.** Randhawa PS, Schonder K, Shapiro R, Farasati N, Huang Y. Polyomavirus BK neutralizing activity in human immunoglobulin preparations. *Transplantation* 2010; 89: 1462-5.

**129.** Randhawa P, Pastrana DV, Zeng G, *et al.* Commercially available immunoglobulins contain virus neutralizing antibodies against all major genotypes of polyomavirus BK. *Am J Transplant* 2015; 15: 1014-20.

**130.** Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1971; 1: 1257-60.

**131.** Allander T, Andreasson K, Gupta S, *et al.* Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 2007; 81: 4130-6.

**132.** Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, *et al.* Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 2007; 3: e64.

**133.** Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008; 319: 1096-100.

**134.** Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 2010; 7: 509-15.

**135.** van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, *et al.* Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromised patient. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001024.

**136.** Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, *et al.* A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol* 2011; 85: 4586-90.

**137.** Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, *et al.* Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J Virol* 2012; 86: 10321-6.

**138.** Lim ES, Reyes A, Antonio M, *et al.* Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology* 2013; 436: 295-303.

**139.** Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, *et al.* Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PLoS ONE* 2013; 8: e58021.

**140.** Mishra N, Pereira M, Rhodes RH, *et al.* Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. *J Infect Dis* 2014; 210: 1595-9.

1 **T cell and humoral immune responses against BKPyV in the first months**  
2 **following renal transplantation**

3

4 *List of authors:*

5 Mazalrey S<sup>1,3</sup>, Braudeau C<sup>2,4</sup>, Mc Ilroy D<sup>1,3</sup>, Touze A<sup>7</sup>, Hourmant M<sup>2,6</sup>, Rodallec A<sup>1,5</sup>,  
6 Rimbert M<sup>2,4</sup>, Le Thuaut A<sup>8</sup>, Imbert-Marcille B.M<sup>1,2,3,5</sup>, Josien R<sup>2,3,4</sup>, Bressollette-Bodin  
7 C<sup>1,2,3,5</sup>

8

9 <sup>1</sup> Université de Nantes, EA4271 Immunovirologie et polymorphisme génétique, Nantes, F-  
10 44000 France

11 <sup>2</sup> INSERM, Center for Research in Transplantation and Immunology (CRTI) UMR1064,  
12 Nantes, F-44000 France

13 <sup>3</sup> Université de Nantes, UMR1064, Nantes, F-44000 France

14 <sup>4</sup> CHU Nantes, CIMNA, Nantes, F-44000 France

15 <sup>5</sup> CHU Nantes, Service de Virologie, Nantes, F-44000 France

16 <sup>6</sup> CHU Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), Nantes, F-44000  
17 France

18 <sup>7</sup> UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, Equipe Biologie des Infections à Polyomavirus,  
19 Tours, F- France

20 <sup>8</sup> CHU Nantes, DRCI, Nantes, F-44000 France

21

22

23

24 **Abstract**

25 Background: BK Polyomavirus (BKPyV) infection is asymptomatic in the general population  
26 but may cause nephropathy (PVAN) and loss of graft in renal transplant patients. The BPyV  
27 reactivation is known to be a multi-factorial phenomenon but immunological mechanisms are  
28 yet to be clear.

29 Objectives: Our main objective was to correlate the cellular specific response against BKPyV  
30 at an early time post-transplantation (M3) with the occurrence of viral reactivation. Secondary  
31 objectives were to associate the humoral specific response with the viral reactivation and  
32 describe the kinetics of the T cell specific response in patients with high reactivation.

33 Study Design: 160 patients were prospectively included in this study and were classified  
34 according to the level of viral replication: 120 were included in the “no reactivation” group,  
35 24 patients were included in “moderate replication” group and 16 patients were included in  
36 “high replication” group

37 Results: The frequency of CD4<sup>+</sup> response against VP1 was increased in “high replication”  
38 patients compared with those without infection (p=0.047). Moreover, the humoral response  
39 was correlated with the viral reactivation measured at M6 (p=0.034) and M12 (p<0.001) post-  
40 transplantation. Finally, in the “high replication” group, the clearance of viremia was  
41 associated with a diversified response.

42 Conclusion: A specific T cell response is more frequently associated with high reactivation  
43 patient at an early time post-transplantation. Although, the predictive positive value of this  
44 assay was far too low for using it as a clinical test for early detection of patients with risk of  
45 BKPyV infection. monitoring the kinetics of T cell specific response could indicate the  
46 resolution of BKPyV infection in patients with high reactivation. Finally, the increasing of the  
47 humoral response during one year of follow-up is associated with BK reactivation.

48

## 49 INTRODUCTION

50 The BK polyomavirus (BKPyV) remains one of the most frequent viral infections after renal  
51 transplantation. This non-enveloped DNA virus from the *Polyomaviridae* family infects more  
52 than 80% of the adult population (1). Following infection, BKPyV remains latent in the reno-  
53 urinary epithelium. Viral reactivations are frequent after kidney transplantation, as BKPyV  
54 viruria and viremia may be detected respectively in 50 and 10-30% of patients (2,3). BKPyV  
55 infection leads to polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) in about 2 to 5% of the  
56 kidney recipients. There is currently no specific drug to prevent or treat BKPyV infections.  
57 Guidelines recommend early post-transplant screening to detect high level viruria and viremia  
58 before the development of histological damage, so that immunosuppression therapy can be  
59 reduced pre-emptively when viral load exceeds the recommended threshold (4).

60 As severe BKPyV infections are closely related to the degree of immunosuppression,  
61 measuring specific anti-BKPyV immunity seems to be a complementary approach for a better  
62 management of BKPyV infected patients. The humoral response has been shown to increase  
63 with viral reactivation in kidney-transplanted patients but conflicting results have been  
64 published about its protective effect against viral reactivation, especially in adults (5)(6).

65 In the setting of kidney allograft, clearance of viremia and/or resolution of PVAN has been  
66 shown to be associated with an increase frequency of BKPyV-specific T cells (7,8). Some  
67 studies suggested that the control of BKPyV reactivation correlated with the reconstitution of  
68 a specific T cell response, when an undetectable T cell response was associated with BKPyV  
69 replication (9,10). The complexity of the cellular response has yet to be investigated, but the  
70 first results published in cross-sectional studies show that the CD4+ response against VP1 is  
71 more frequently detected in patients with viral reactivation compared to patients who control  
72 the infection (11,12). On the other hand, the lymphocytes of patients with viral reactivation  
73 have a weaker polyfunctional response (12).

74 Most of these data resulted from the study of the anti-BKPyV specific response after the  
75 occurrence of viral reactivation. To complete our knowledge of the specific immune response  
76 against BKPyV occurring early after kidney transplantation, we conducted a prospective  
77 study in a cohort of adult patients. Our main objective was to correlate the level of the  
78 lymphocyte-mediated response against BKPyV after three months post-transplantation with  
79 the occurrence of a moderate or severe viral reactivation during the first year. We also studied  
80 the kinetics of humoral response against BKPyV in the all cohort, and described further the

81 kinetics of the specific responses in the group with severe infection. Results of this  
82 prospective study combining virological and immunological follow up are presented.

## 83 **METHODS**

### 84 **Subjects**

85 One hundred and sixty patients aged 18-80 years were prospectively included in this  
86 monocentric study. All of them were transplanted at Nantes University Hospital, France,  
87 between october 2010 and august 2013. All participants gave informed consent, the study was  
88 approved by the local ethics committee and declared to the french Commission Nationale de  
89 l'Informatique et des Libertés (CNIL, n°1600141).

### 90 **Monitoring of BKPyV infections**

91 Screening for BKPyV infection was based on qPCR in EDTA whole blood and urine samples  
92 systematically collected at months 1, 2, 3, 6, 9, 12 and 24 post-transplantation. BKPyV qPCR  
93 was also performed in case of unexplained increase in serum creatinine and acute rejection.  
94 Moreover, a monthly monitoring was added in case of viruria  $>10^7$  cop/ml or positive viremia.  
95 DNA extraction from whole blood was performed on the Qiasymphony instrument, using the  
96 Qiasymphony DSP DNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Urine samples were boiled,  
97 centrifuged and diluted at 1:10 with Phosphate Buffer Saline. Purified DNA was stored at -  
98 20°C. Viral DNA detection and quantification were performed using an in-house quantitative  
99 real-time PCR, as previously described (3). Lower diagnosis limit of detection for BKPyV  
100 viral loads was  $10^4$  copies/ml in urine (cop/ml UR), and 500 cop/ml in whole blood (WB).

### 101 **Immunosuppressive therapy**

102 Induction therapy consisted of either IL-2R antagonist (basiliximab, Simulect®, Novartis  
103 Pharma AG) or lymphocyte-depleting agent (anti-thymocyte globulin, Thymoglobulin®,  
104 SangStat). During maintenance therapy, all patients received mycophenolic acid (MPA) in the  
105 form of mycophenolate mofetil (MMF, Cellcept®, Roche Pharmaceuticals, Basel,  
106 Switzerland) or enteric-coated mycophenolate sodium (EC-MPS, myfortic®, Novartis  
107 Pharma AG) and tacrolimus (Prograf®, Astellas Pharma, Tokyo, Japan). Steroids were part of  
108 the treatment for immunized, retransplanted patients and recipients of an ABO-incompatible  
109 living donor transplant only. Patients receiving cyclosporine were excluded from the study.  
110 A suspected PVAN was defined by a persistent BKPyV viremia (more than two consecutive  
111 viremia upper than  $10^4$  cop/ml) and confirmed by a positive immunostaining on renal biopsy



112 (AC anti-SV40 LT) (13). In case of suspected PVAN MMF and/or calcineurin inhibitors were  
113 progressively decreased or interrupted according to the response to the first reduction in  
114 immunosuppression and the presence of PVAN. In case of confirmed PVAN, a minimal  
115 immunosuppression was maintained with low dose of tacrolimus or switch to low dose  
116 cyclosporine A (13). A transplant biopsy was systematically performed at month 12, for some  
117 of the patients at month 3, and in case of unexplained increase of serum creatinine or  
118 suspected PVAN.

### 119 **Definition of the patient groups**

120 Patients groups were defined according to the results of BKPyV DNA monitoring in urine and  
121 blood, as followed:

- 122 - **Group 1 (G1)**, absence of active BKPyV infection: negative BKPyV PCR in urine and  
123 blood over the first 12 months post transplantation or low level viremia (<500 cop/ml  
124 WB) without viruria.
- 125 - **Group 2 (G2)**, moderate BKPyV replication: positive viruria (> 4000 cop/ml UR) and  
126 viremia < 10<sup>3</sup> cop/ml WB.
- 127 - **Group 3 (G3)**, high BKPyV replication: positive viruria, positive viremia (>10<sup>3</sup> cop/ml  
128 WB).

### 129 **Immunophenotyping of peripheral mononuclear cells**

130 Absolute counts and percentages of CD3+, CD4+ and CD8+ T, CD19+ B lymphocytes and  
131 NK cells were determined from erythrocyte-lysed whole blood using BD Multitest™  
132 CD3/CD8/CD45/CD4 or BD Multitest™ CD3/CD19/CD16+56/CD4 with BD Trucount™  
133 Tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Flow cytometry analysis was performed on a  
134 BD FACS Canto II.

### 135 **Flow cytometry assay for detection of BKPyV specific CD4+ and CD8+ T cells**

136 Peripheral mononuclear cells were isolated from heparinized whole blood in a standard Ficoll  
137 Hypaque density gradient. Cells were stored in DMSO and kept frozen in liquid nitrogen until  
138 analysis. Functional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were measured for all patients at month 3 post-  
139 transplantation and results were compared between the different groups. In addition, detection  
140 of BKPyV specific lymphocytes was also performed at month 6 and 9 for the G3 (viremic)  
141 patients.

142 Thawed PBMCs were rested overnight at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI complete medium  
143 (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin). PBMC were then stimulated by two different pools

144 of viral peptides, derived from the LT and VP1 BKPyV proteins, made of 15-mer peptides  
145 with an overlap of 11 amino-acid (Swiss-Prot ID P14999, 170 peptides and Swiss-Prot ID  
146 14996, 88 peptides, respectively; JPT, Berlin, Germany; equal concentration of each peptide)  
147 and reconstituted according to the manufacturer's recommendations (1 µg/ml peptide per test  
148 in final concentration).

149 As a positive control, PBMC were stimulated by 2.5 mg/mL *Staphylococcus aureus*  
150 *enterotoxin B* (SEB; Sigma, Saint Louis, USA). Negative controls were PBMC in the same  
151 experimental conditions without the peptide pools.

152 Stimulations were carried out for 5 h in the presence of 1 mg/mL anti-CD28 and anti-CD49d  
153 (BD, Biosciences). Golgi Plug and Golgi Stop (BD, Biosciences) were added 90 minutes after  
154 the initiation of the stimulation to inhibit the cytokine secretion out of the cells.

155 Stimulated cells were treated with 2mM EDTA for 10 min and and labeled with a viability  
156 marker (LIVE/DEAD®, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Cells were  
157 then stained with anti-CD3 and anti-CD8 membrane antibodies (BD Biosciences), fixed,  
158 permeabilized with the Cytotfix/Cytoperm™ solution (BD Biosciences) and stained with anti-  
159 interferon-γ (IFNγ), anti-IL-2 and anti-tumor necrosis factor-α (TNF-α) antibodies (all from  
160 BD Biosciences, using the concentrations recommended by the manufacturer). Cells were  
161 analyzed on a BD FACS Canto II using FACS-Diva-software V6.1.3 (BD Biosciences).

162 Frequencies of cytokine-secreting CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells from the non-stimulated negative  
163 controls were subtracted. The response was considered significant when the anti-BKPyV  
164 response (VP1 or LT) was at least two times the negative control with a minimum of 20  
165 positive events (**figure 1**).

## 166 **BKPyV serology**

167 BKPyV VP1 viral like particules were expressed in insect cells, purified and enzyme-linked  
168 immunosorbent assays (ELISAs) were performed as previously described (14,15). Microtiter  
169 plates were coated with 200 ng of BKPyV VLPs per well. Sera were diluted by serial 2-fold  
170 dilution from 1:100 and peroxidase-conjugated anti-human IgG (Southern Biotech) diluted  
171 1:20,000 was used to detect the binding of human IgG. Endpoint antibody titers were  
172 determined as the last of serial 2-fold dilutions that yielded an OD value greater than or equal  
173 to 0.2. Neutralizing antibody titers were determined as described by Pastrana et al (16).  
174 Pseudotype virions comprising VP1 (g1b2), VP2 and VP3 proteins encapsidating the pEGFP-  
175 N1 plasmid were produced in HEK-293TT cells, purified on a 39/33/27% Optiprep gradient,  
176 then used to transduce HEK-293TT cells in the presence or absence of 5-fold serial dilutions

177 of test sera. After 72hr, the percentage of GFP+ cells at each serum dilution was quantified  
178 using a Cellomics Arrayscan VTI HCS Reader (Thermo-Fisher). Percentages of positive cells  
179 were normalized with respect to control wells incubated in the absence of serum, and  
180 neutralization titers were calculated using Prism 5 software.

## 181 **Statistical analysis**

182 Data were summarized as mean  $\pm$  standard deviations ( $\pm$  SD) or as median [Q1-Q3 (25-75<sup>th</sup>  
183 percentiles)] as appropriate. Univariate analysis was performed to analyze risk factor  
184 associated with the virological status of the patient. The three groups were compared using the  
185 Pearson Chi-square test or Fisher exact test for qualitative variables and ANOVA or  
186 nonparametric Kruskal-Wallis tests for quantitative variables. The Kaplan and Meier  
187 estimator was used to estimate the cumulative incidence of viremia. Kruskal-Wallis test  
188 followed by Dun's post hoc test was to compare IgG titers inter-group, and Wilcoxon signed  
189 rank test to analyze IgG titers intra-group evolution between M0 and M12. Two-sided p-  
190 values  $< 0.05$  were considered as statistically significant. The statistical analysis was done  
191 using Stata statistical software (Stata, release 13.0; College Station, TX, USA) or PRISM-6  
192 Software.

## 193 **RESULTS**

### 194 **BKPyv reactivation prevalence and characteristics**

195 The median number of samples analysed per patient was six urine (mean 6, min 4-max 13)  
196 and six EDTA blood samples (mean 6, min 4-max 13).

197 After one year post-transplantation, 120 patients remained BKPyV negative, 40 had been  
198 tested positive at least once in urine and 29 had been tested positive at least once in blood.

199 Among the BKPyV positive patients, 24 had a positive viremia with negative or low viremia  
200 ( $<10^3$  cop/ml WB) and were classified in G2 (moderate replication), 16 had at least one viremia  
201  $>10^3$  cop/ml WB and were classified in G3 (high replication) (**Figure 2**). Eight patients had a  
202 transient viremia  $<5 \times 10^2$  cop/ml WB with negative viremia, considered as detection of  
203 persistent virus without active replication and patients were classified in G1.

204 The highest rates of positive viremia and viremia were observed respectively at 12 and 9  
205 months post-transplantation and (**figure 3A**). The median time point for the first detection of  
206 BKPyV viremia was 2 months post-RT in G2 [Q1-Q3:1-6] and G3 [Q1-Q3:1-4.5] (**figure 3B**).  
207 Maximal viral loads were observed in urine and blood at early times post-transplantation (M1

208 to M3) in G3, later in G2 (**figure 3C**). High-level viremia  $>10^7$ cop/ml UR was associated to a  
209 higher risk of positive viremia (n=56/83; OR=4.4 (2.4-7.9)), and to higher viral loads in blood  
210 (median  $5.3 \times 10^3$ , vs median  $9 \times 10^2$  cop/ml WB, p=0.0009). Four patients from G3 had a  
211 PVAN histologically confirmed within the first year post transplantation.

212 We did not find any association between BKPyV infection (viruria and/or viremia) and a  
213 large panel of risk factors related to the donor, the recipient, or the graft (**supplementary**  
214 **table 1 and 2**).

### 215 **Post-transplantation lymphopenia is constant and do not differ according to** 216 **BKPyV infection**

217 Absolute numbers of lymphocyte subsets were compared between the three groups before the  
218 graft, and at 3, 6 and 12 months post-transplantation for CD3, CD4 and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.  
219 The B lymphocyte and NK cell subsets were compared only at month 3, 6 and 12 as there was  
220 not enough data before the graft. All of the patients had a significant loss of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>  
221 T lymphocytes after the graft. Even if there was a tendency toward lower counts of CD3<sup>+</sup> and  
222 CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in group 3 at months 3 and 6, the difference were not significant (**figure**  
223 **4**).

### 224 **The detection of a functional response against BKPyV at month 3 is not** 225 **associated with a protection toward infection**

226 Given our criteria for a positive response, BKPyV-specific CD4<sup>+</sup> T cells were identified in  
227 43.2% and CD8<sup>+</sup> T cells in 29% of the samples (n=148 patients). A CD4<sup>+</sup> mediated response  
228 was more frequently detected than the CD8<sup>+</sup> T cell response (p=0.0052). This difference was  
229 observed whatever the pool of peptide studied: VP1-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were  
230 detected for 50 patients vs 33 with functional CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (p=0.02), LT-specific  
231 CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were detected for 48 patients vs 24 with functional CD8<sup>+</sup> T  
232 lymphocytes (p=0.0017).

233 The number of patients with a CD4<sup>+</sup> mediated response against VP1 was higher in G3 than in  
234 G1 (p=0.047), with an intermediate frequency in G2. This was significant for IL-2 (p=0.035)  
235 and TNF $\alpha$  (p=0.012) but not IFN $\gamma$  (p=0.059) (**figure 5A**). However, there was no significant  
236 difference in terms of percentages of functional T-lymphocytes, whatever the cytokine studied  
237 (**figure 5B**). Frequencies of CD107 positive lymphocytes were not different between the three  
238 groups (data not shown).

239 A response was considered as polyfunctional when the same cell produced at least two  
240 cytokines among  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  or IL-2. When comparing the distribution of these different  
241 cytokine combinations, we did not find any significant difference between the patient groups  
242 (**figure 6**).

### 243 **The anti-VP1 IgG levels increase over time for patients with BKPyV** 244 **reactivation**

245 In order to investigate the BKPyV-specific humoral immunity over time post-transplantation,  
246 levels of BKPyV specific anti-VP1 IgG were analyzed in the three groups before the  
247 transplantation and at months 6 and 12 post-transplantation (**figure 7A**).

248 Before transplantation, the percentage of IgG positive patients was 84.7% (n=122/144 tested):  
249 16/107 patients were IgG negative in G1, 5/23 in G2 and 1/14 in G3. There was no significant  
250 difference in the IgG titers between the three groups before transplantation.

251 After six months post-transplantation, the median titres of anti-BKPyV IgG increased in G3:  
252 400 (Q1-Q3: 100-1600) in G1, 800 (Q1-Q3: 175-2000) in G2 and 4000 in G3 (Q1-Q3: 1300-  
253 25600) (p=0.034). Only two patients in G3 did not have any increase of their antibody titre at  
254 6 months post- transplantation: the first one was highly immunosuppressed at that time and  
255 later died because of disseminated mycotic infections and the second one had a late BKPyV  
256 infection, beginning at 9 months post-transplantation.

257 This difference was even more pronounced at month 12 post-transplantation, as both groups  
258 with viral reactivation had higher anti-BKPyV IgG levels than the negative group (p<0.001  
259 for G1 vs G2 and G1 vs G3). Moreover, patients with a confirmed PVAN or a strong  
260 suspicion of PVAN (n=4) had the highest IgG levels among G3 patients (median 25600, Q1-  
261 Q3: 19200-64000).

262 All the patients who were seronegative before the transplantation in G2 and G3 had  
263 seroconverted at month 12 with low IgG titres when compared to the median of their  
264 respective groups, except for one of them (mean IgG: G2=500, G3=6400). In G1, 7/16  
265 seronegative patients had seroconverted at month 12, with an IgG titre at the limit of detection  
266 (median=100, Q1-Q3 100-275).

267 In a subset of patients, neutralizing antibody titers were also analyzed (**figure 7B-E**). Before  
268 transplantation, neutralizing titers were significantly lower in G2 (median=2.56) compared to  
269 G1 (median=3.0) (p<0.01), and a similar tendency was seen in G3 (median=2.7). Neutralizing  
270 titers in G1 diminished slightly at 6 months post-transplantation, then stabilized, whereas in

271 both G2 and G3, neutralizing titers were significantly ( $p<0.01$ ) increased by 12 months post-  
272 transplant. Although some patients in G2 and G3 clearly had increased neutralizing titers by 6  
273 months post-transplant, intra-group heterogeneity was such that it was not possible to assert  
274 that neutralizing titers had increased in the groups as a whole at this time.

### 275 **Clearance of viremia is associated with a multifunctional T-lymphocyte** 276 **response in the high BKPyV replication group**

277 In viremic patients, we completed the follow-up at the moment of the first viremia, and when  
278 possible at least at month 6 and 9 post transplantation. Virological and immunological  
279 monitoring is shown in supplementary data 3 (S3). The decrease of immunosuppression was  
280 usually associated with the decrease of BKPyV viral loads in blood and urines. As described  
281 before, the BKPyV infection was always associated with an increase of the IgG titers, and  
282 there was no correlation between IgG titers and viral loads in blood or urines.

283 Maximal responses were observed within the month following the first positive viremia, and  
284 decreased or were undetectable when viremia became negative. These responses were usually  
285 transient and did not persist after the clearance of viremia. Strong responses, with more than  
286 1% of specific functional lymphocytes, were only rarely detected (patients n°2, 4, 15).  
287 Interestingly, the only patients who had a persistent viremia  $>10^3$ cop/ml at the end of the first  
288 year were the only ones for which no CD4+-VP1 response was detected.

## 289 **DISCUSSION**

290 This prospective, monocentric study provides systematic data specific immunity against  
291 BKPyV in a cohort of renal transplanted patients. The principal aim of this work was to  
292 measure BKPyV-specific immunity at three months post-transplantation, and to compare the  
293 level of this response between patients according to the occurrence of BKPyV viruria or  
294 viremia during the first year post-transplantation.

295 First of all, our cohort is characterized by a low frequency of BKPyV infection. The  
296 percentage of patients detected positive at least once in urine and/or blood were respectively  
297 25.6 and 21.2%. The prevalence of positive viruria was lower than reported in other  
298 prospective studies, including one published by our team ten years ago (3,4) (17). It can be  
299 partly explained by the method we use for the detection of BKPyV in urine, with a lower limit  
300 of quantification at  $10^4$  BKPyV DNA copies/ml of urine. However, even if we missed low-  
301 level viruria, this limit of quantification was compatible with the clinical setting, as low viral

302 loads in urine do not modify the viral monitoring or the immunosuppressive therapy.  
303 Moreover, the frequency of high-level viruria ( $>10^7$  cop/ml, 15.6% of patients) was also in the  
304 low range compared to other cohorts (13). Viremia higher than  $10^3$  cop/ml WB was detected in  
305 10% of the patients, high-level viremia  $>10^4$  cop/ml was detected in only 8 patients (5%).  
306 These results are in line with some prospective studies (18), but lower than others even if we  
307 included only patients receiving mycophenolate mofetil and tacrolimus as a maintenance  
308 therapy. Indeed, the risk of BKPyV reactivation is higher in patients receiving tacrolimus  
309 compared with to cyclosporine (3,4). Four patients were diagnosed with PVAN at stage A or  
310 B within the first year post-transplantation (2.5% of the cohort). Again, this is in line with  
311 recent results reported in other cohorts. We analysed a number of putative risk factors for  
312 BKPyV infection, including pre-transplantation factors related to recipient or donors, and  
313 post-transplantation ones. None of them was significantly associated to an increased risk of  
314 viruria or viremia.

315 Regarding the global immunological characteristics of the cohort, there was no significant  
316 difference in the absolute counts of CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ and NK cells between the  
317 different groups. Recently, Schatchner et al had found lower CD4+ and CD8+ counts in KTRs  
318 developing early onset BKPyV replication, compared to a control group (19). This remains to  
319 be confirmed in larger series, but underlines the interest to study lymphocyte subpopulations  
320 during the post-transplantation monitoring, in order to identify patients at high risk of  
321 opportunistic viral infections.

322 Our systematic analysis of the humoral and cell mediated responses against BKPyV provides  
323 a good overview of the anti-BKPyV specific immunity in a large cohort of kidney  
324 transplanted patients.

325 First of all, there was no significant difference in the anti-VP1 IgG titres between the patient  
326 groups before transplantation. We did not have the donor's serostatus, so we could not  
327 confirm that there is an association between the seropositive donor/seronegative recipient  
328 pairing and increased risk of BKPyV infection, as suggested previously (ref). However, some  
329 of the patients of our cohort were seronegative before the transplantation and seroconverted  
330 during the first year, but did not develop high-level viremia or PVAN. Moreover, when  
331 studying the humoral response longitudinally, we observed a strong increase in the anti-  
332 BKPyV titres for the patients who reactivated, whereas there was no significant change for the  
333 BKPyV negative patients. For some authors, the increase in anti-BKPyV titres that  
334 accompany the resolution of PVAN suggest that the humoral response contributes to  
335 resolution of the infection (6), whereas others consider that increases in antibody titers should

336 be considered simply as markers of viral replication (20). In our study, the higher IgG titers  
337 were observed in the viremia group, and were not always associated with viral clearance,  
338 which tends to be in accordance with the second hypothesis. When looking at the neutralizing  
339 antibody titers in a subset of patients, we observed that the pre-graft titers were lower in the  
340 patients from G2 and G3 than patients from G1. The neutralizing antibodies level could thus  
341 be a better predictive marker than the measurement of the total antibodies titers.

342 We measured the specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes mediated responses against two  
343 different pools of viral peptides, TAg and VP1. The T lymphocyte-mediated response was  
344 measured three months after renal transplantation in all patients, as it corresponds to the time  
345 when immunosuppressive therapy is lowered and the beginning of the maximal frequency of  
346 BKPyV reactivation. Overall, the CD4+ mediated response was more frequently detected than  
347 the CD8+ response. The dominance of the CD4 response had already been shown in other  
348 studies (7,21) and the absence of detection of specific CD8 response *ex vivo* using a very  
349 similar method had been reported recently (12). One hypothesis to explain this difference may  
350 be an incomplete presentation of the 15-mer by the MHC I molecules causing a limited  
351 activation. However, in other viral infections (CMV / EBV), using 15-mer for the activation  
352 of LTCD8 was effective (22,23), so this cannot be the only explanation for the low  
353 frequencies found in BKPyV infection. Different protocols to monitor BKPyV-specific T  
354 cells have been published. The variety of methods used in the different studies makes difficult  
355 the comparison of the results (24). We choose to use a method based on intracellular cytokine  
356 staining after incubation with only one peptide pool per tube, independently from HLA type,  
357 and without *in vitro* expansion. By doing so, we were perhaps unable to detect very low levels  
358 of specific responses. Moreover, we considered as positive only samples in which the  
359 percentage of functional lymphocytes was at least twice higher than the unstimulated  
360 condition. This can explain the low percentage of positive patients, as compared with other  
361 series. Moreover, given the recent publications on this topic, the level of circulating specific  
362 anti-BKPyV T cells is much lower than for other persistent viruses, such as human  
363 cytomegalovirus or Epstein Barr virus.

364 The CD4+ response against VP1 antigen was more frequently detected in patients with high  
365 viral load compared to patients with no or moderate infection. These results are also  
366 consistent with those described by Schmidt and al. There was no difference in the frequency  
367 of polyfunctional lymphocytes, when recent works showed that patients with uncontrolled  
368 viral reactivation had a lower polyfunctional response (12,25). However, in our cohort the  
369 number of patients with a detectable response in the viremic group was low.



370 We then completed our analysis with longitudinal data in the viremic group: patients  
371 controlling the viral reactivation had a higher diversity of cellular responses (CD8 and CD4),  
372 directed against both viral antigens (LT and VP1), when patients who did not control the  
373 infection had a poorer response. The specific lymphocyte response was usually observed at  
374 the time of first positive viremia and then decrease or became undetectable when viremia was  
375 under 1000 DNA copies/mL of blood.

376 To sum-up, the absence of cellular response at M3 post-transplantation is not associated with  
377 the BKPyV reactivation and cannot be considered as a useful diagnostic test to predict the  
378 occurrence of BKPyV infection. The anti-BKPyV cell response therefore seems transiently  
379 detected in peripheral blood and this can explain the low percentages of functional  
380 lymphocytes measured in our cohort. Nevertheless, the monitoring of the LyT specific  
381 response kinetics in patient with viral reactivation could help to determine the patient who  
382 will control their BKPyV reactivation as they seems to have a more diversified and persistent  
383 LyT specific response. Finally, a strong humoral response is found in patients with BKPyV  
384 viremia but not correlated with viral clearance, and the neutralizing response seems to be a  
385 better marker of protection.

386

388 **REFERENCES**

- 389 1. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses.  
390 PLoS Pathog. 2009 Mar;5(3):e1000363.
- 391 2. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, et al.  
392 Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-  
393 transplant recipients. *N Engl J Med*. 2002 Aug 15;347(7):488–96.
- 394 3. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-  
395 Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal  
396 transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*.  
397 2005 Aug;5(8):1926–33.
- 398 4. Hirsch HH, Vincenti F, Friman S, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, et al. Polyomavirus  
399 BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or  
400 cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study. *Am J Transplant Off J Am  
401 Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2013 Jan;13(1):136–45.
- 402 5. Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA.  
403 BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J Clin  
404 Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2008 Oct;43(2):184–9.
- 405 6. Hariharan S, Cohen EP, Vasudev B, Orentas R, Viscidi RP, Kakela J, et al. BK virus-  
406 specific antibodies and BKV DNA in renal transplant recipients with BKV nephritis. *Am  
407 J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2005 Nov;5(11):2719–24.
- 408 7. Binggeli S, Egli A, Schaub S, Binet I, Mayr M, Steiger J, et al. Polyomavirus BK-  
409 specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant  
410 recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2007  
411 May;7(5):1131–9.
- 412 8. Randhawa PS, Popescu I, Macedo C, Zeevi A, Shapiro R, Vats AN, et al. Detection of  
413 CD8+ T cells sensitized to BK virus large T antigen in healthy volunteers and kidney  
414 transplant recipients. *Hum Immunol*. 2006 May;67(4–5):298–302.
- 415 9. Comoli P, Binggeli S, Ginevri F, Hirsch HH. Polyomavirus-associated nephropathy:  
416 update on BK virus-specific immunity. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. 2006  
417 Jun;8(2):86–94.
- 418 10. Schachtner T, Müller K, Stein M, Diezemann C, Sefrin A, Babel N, et al. BK virus-  
419 specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated  
420 nephropathy. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2011  
421 Nov;11(11):2443–52.
- 422 11. Trydzenskaya H, Sattler A, Müller K, Schachtner T, Dang-Heine C, Friedrich P, et al.  
423 Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of  
424 BKV-specific T-cell immunity. *Transplantation*. 2011 Dec 15;92(11):1269–77.

- 425 12. Schmidt T, Adam C, Hirsch HH, Janssen MWW, Wolf M, Dirks J, et al. BK  
426 polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly  
427 correlate with phases of virus replication. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am*  
428 *Soc Transpl Surg*. 2014 Jun;14(6):1334–45.
- 429 13. Hirsch HH, Randhawa P, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK  
430 polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant*  
431 *Am Soc Transpl Surg*. 2013 Mar;13 Suppl 4:179–88.
- 432 14. Touzé A, Bousarghin L, Ster C, Combata AL, Roingeard P, Coursaget P. Gene transfer  
433 using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells. *J Gen Virol*.  
434 2001 Dec;82(Pt 12):3005–9.
- 435 15. Touzé A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury MJ, Combelas N, et al. Generation of  
436 Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of  
437 MCV antibodies. *J Clin Microbiol*. 2010 May;48(5):1767–70.
- 438 16. Pastrana DV, Brennan DC, Cuburu N, Storch GA, Viscidi RP, Randhawa PS, et al.  
439 Neutralization serotyping of BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients.  
440 *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002650.
- 441 17. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, et al.  
442 Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive  
443 immunosuppression reduction. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc*  
444 *Transpl Surg*. 2005 Mar;5(3):582–94.
- 445 18. Alméras C, Vetromile F, Garrigue V, Szwarc I, Foulongne V, Mourad G. Monthly  
446 screening for BK viremia is an effective strategy to prevent BK virus nephropathy in  
447 renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. 2011 Apr;13(2):101–  
448 8.
- 449 19. Schachtner T, Stein M, Babel N, Reinke P. The Loss of BKV-specific Immunity From  
450 Pretransplantation to Posttransplantation Identifies Kidney Transplant Recipients at  
451 Increased Risk of BKV Replication. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc*  
452 *Transpl Surg*. 2015 Aug;15(8):2159–69.
- 453 20. Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA.  
454 BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J Clin*  
455 *Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2008 Oct;43(2):184–9.
- 456 21. Mueller K, Schachtner T, Sattler A, Meier S, Friedrich P, Trydzenskaya H, et al. BK-  
457 VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. *Transplantation*. 2011  
458 Jan 15;91(1):100–7.
- 459 22. Kirchner A, Hoffmeister B, Cherepnev-G G, Fuhrmann S, Streitz M, Lachmann R, et al.  
460 Dissection of the CMV specific T-cell response is required for optimized cardiac  
461 transplant monitoring. *J Med Virol*. 2008 Sep;80(9):1604–14.
- 462 23. Scherrenburg J, Piriou ERW a. N, Nanlohy NM, van Baarle D. Detailed analysis of  
463 Epstein-Barr virus-specific CD4+ and CD8+ T cell responses during infectious  
464 mononucleosis. *Clin Exp Immunol*. 2008 Aug;153(2):231–9.

465 24. Sester M, Leboeuf C, Schmidt T, Hirsch HH. The “ABC” of Virus-Specific T Cell  
466 Immunity in Solid Organ Transplantation. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant  
467 Am Soc Transpl Surg. 2016 Jun;16(6):1697–706.

468 25. Schaenman JM, Korin Y, Sidwell T, Kandarian F, Harre N, Gjertson D, et al. Increased  
469 Frequency of BK Virus-Specific Polyfunctional CD8+ T Cells Predict Successful  
470 Control of BK Viremia After Kidney Transplantation. Transplantation. 2016 Jul 7;

471

## 472 **GRANTS**

473 Appel d’Offre Interne CHU Nantes

474 AO Recherche et Greffe Agence de Biomedecine

475 University of Nantes

## 476 **ACKNOWLEDGEMENTS**

477

478

479 **Figure 1: Example of flow cytometry analysis: VP1-CD8+ specific response after**  
480 **stimulation by VP1 peptide pool. A:** Representation of the 6 combinations available of our 4  
481 cytokines of interest (IFN/TNF/IL2/CD107). **B, C, D:** Plots gating respectively on  
482 CD107/IL2/CD107+IFN positive cells to measure the polyfunctional combinations.

483 **Figure 2: Study design**

484 **Figure 3: Virological data. (A)** BKPyV follow-up during the first year post-transplantation  
485 **(B)** Cumulative new onset of BKPyV DNA detection in urines during the first 12 months  
486 following renal transplantation. **(C)** Left panel: Median and interquartile range of BKPyV  
487 DNA loads in urines from group 2 (light grey) and group 3 (dark grey) patients. Right Panel:  
488 Median and interquartile range of BKPyV loads in EDTA blood samples from group 3  
489 patients.

490 **Figure 4: Immunophenotyping of circulating lymphocytes. Median and interquartile**  
491 **range of CD3+, CD4+, CD8+ before the**

492 **Figure 5: BKPyV specific cellular response at month 3 post renal transplantation. (A)**  
493 **Percentages of patients** with a specific CD4 or CD8 lymphocyte mediated response against  
494 BKPyV. A patient was considered positive when secretion of at least one cytokine (IFN $\gamma$ ,  
495 TNF $\alpha$ , IL2) was detected after stimulation by one of the viral peptide pools (VP1 or LT).  
496 Results are presented separately for T CD4 and T CD8 lymphocytes and each cytokine.  
497 Statistical significance was assessed by (*Chi2 analysis*). **(B) Frequency of functional T CD4**  
498 **or CD8 lymphocytes.** Each point represent the frequency of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  or IL2 positive CD4  
499 or CD8 lymphocytes after stimulation by VP1 or LT peptide pools on PBMCs collected at  
500 month 3 post transplantation. The data represent both monofunctional and polyfunctional  
501 lymphocytes with median and interquartile range for each function.

502 **Figure 6: Frequency of polyfunctional CD4+ or CD8+ lymphocytes.** Bars represent  
503 subpopulations (mean and standard deviation) of single, double or triple cytokine producing  
504 cells among all BKPyV positive cells for each condition (VP1 or LT) in LTCD4 (A) and LT  
505 CD8 (B)

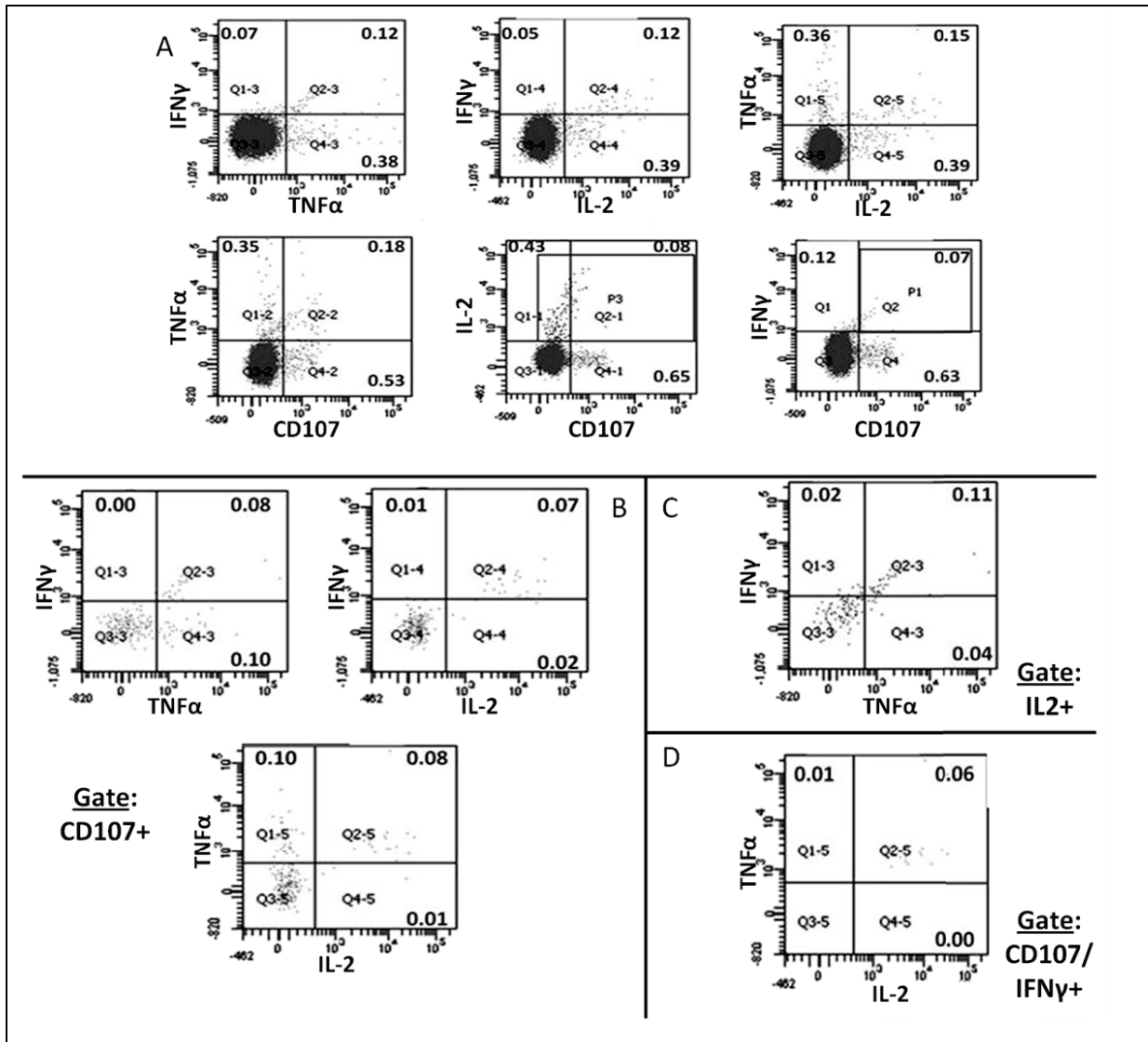
506 **Figure 7: BKPyV specific humoral immunity kinetics during the first 12 months post**  
507 **renal transplantation. (A)** IgG levels were measured using an in house ELISA on the pre-

508 graft serum sample and at month 6 and 12 post-transplantation. They were compared between  
509 group 1 (no BKPyV replication), group 2 (moderate replication, viremia<103 cop/ml) and  
510 group 3 (high replication, viremia > 103 cop/ml). Black diamonds close to group 3 box  
511 represent patients with confirmed PVAN. **(B)** Pre-graft neutralising titres in groups 1-3.  
512 Seronegative samples are shown with a notional neutralising titre of 1/10. **(C-E)** Evolution of  
513 neutralising titres in patients from group 1, n=11 **(C)**; group 2, n=7 **(D)** and group 3, n=7 **(E)**.  
514 Within each group, titres were compared at different time points using the Friedman test,  
515 followed by Dunn's post-hoc test. Significant differences compared to pre-graft titres are  
516 indicated.\* - p<0.05; \*\*p<0.01

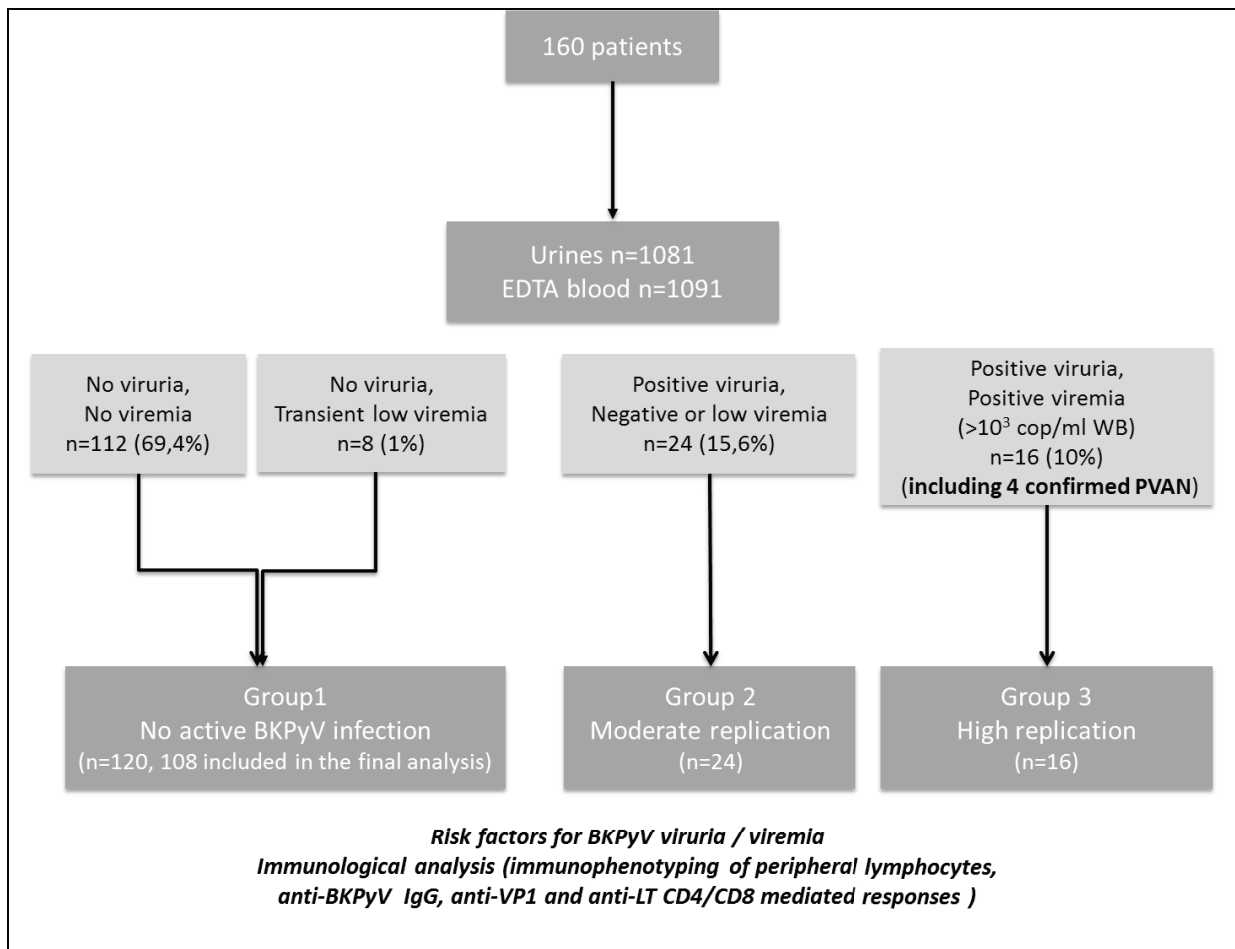
517

518

519



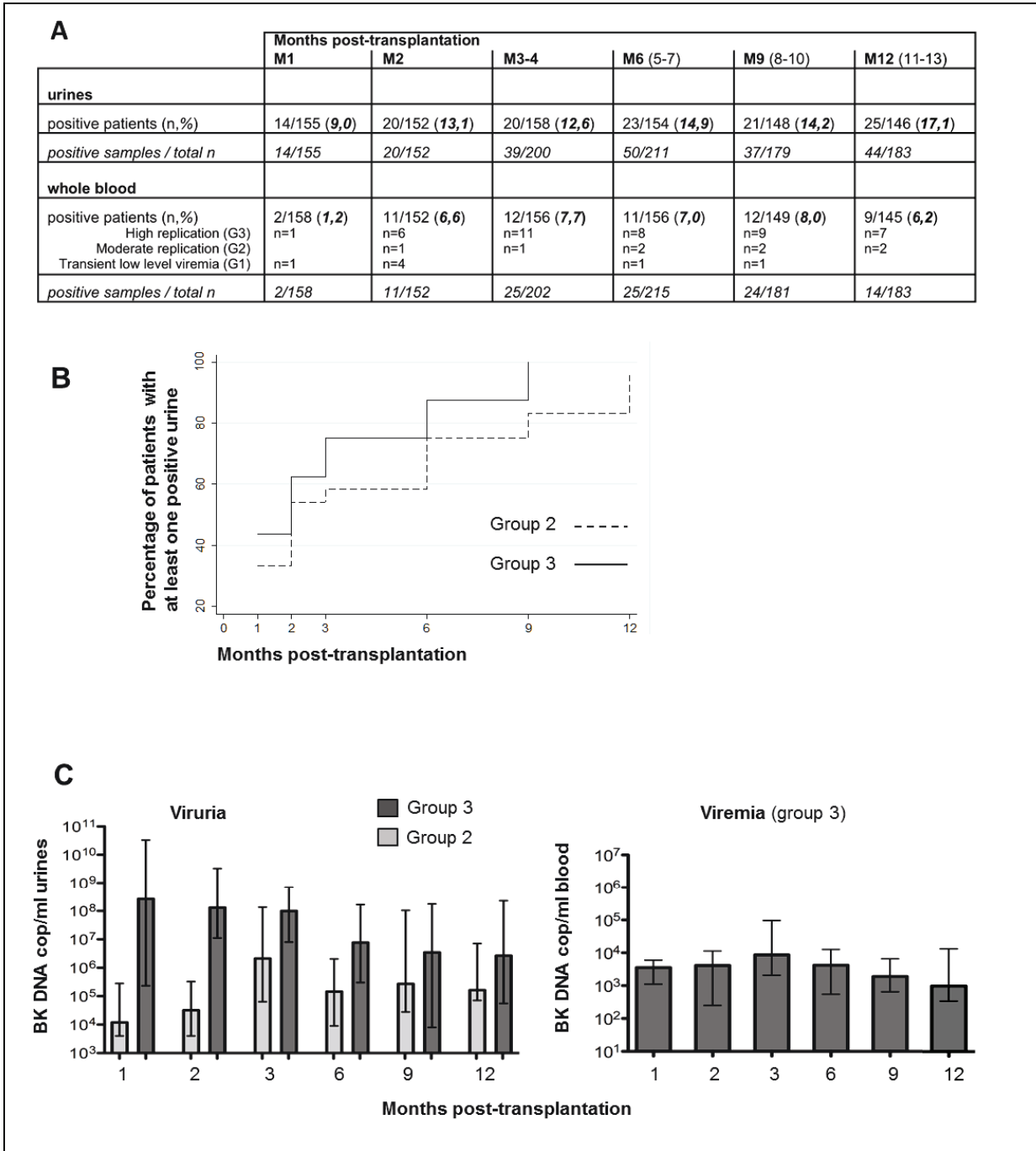
520 Figure 1



521 **Figure 2**

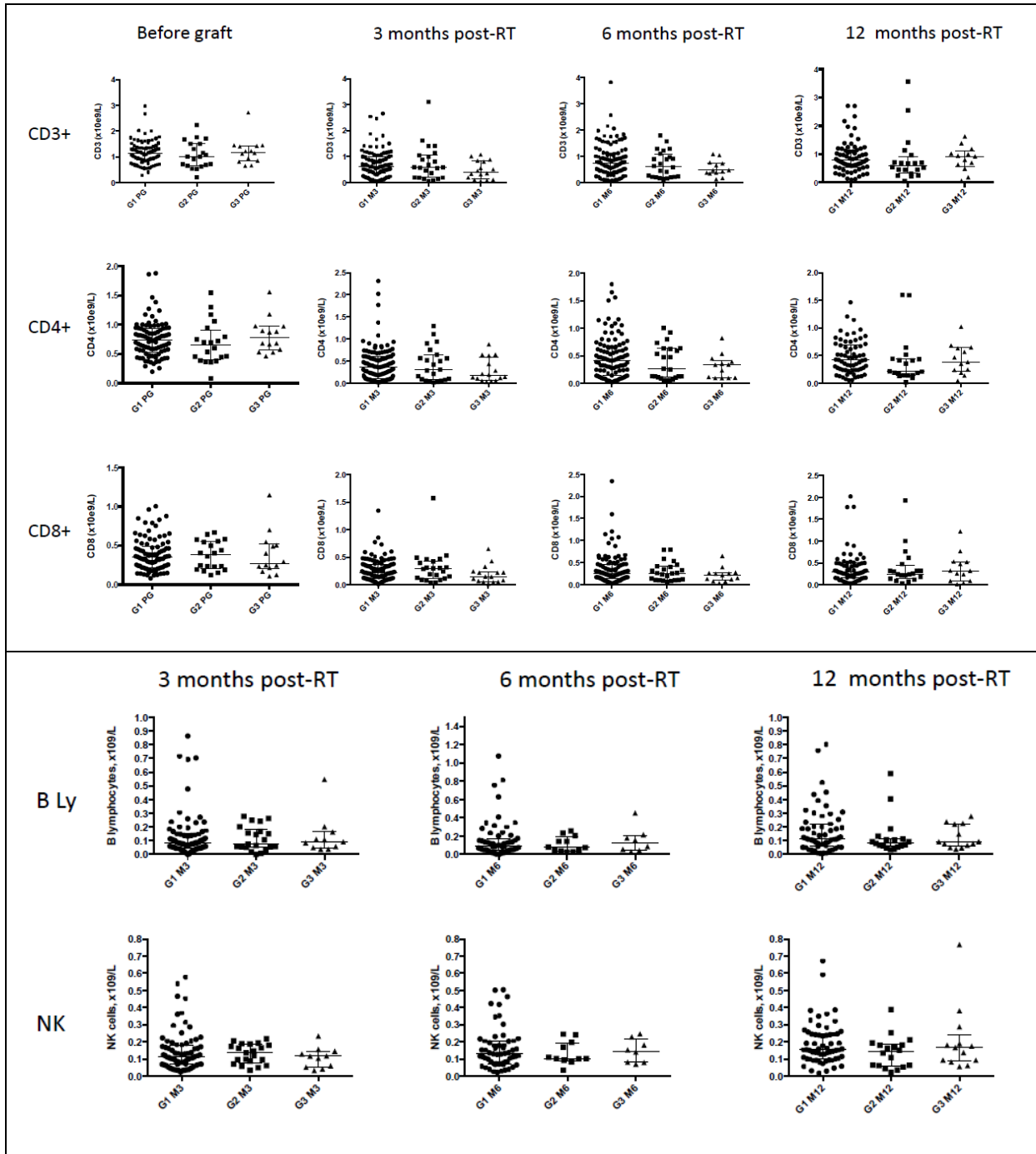
522





523 **Figure 3**

524



526 **Figure 4**

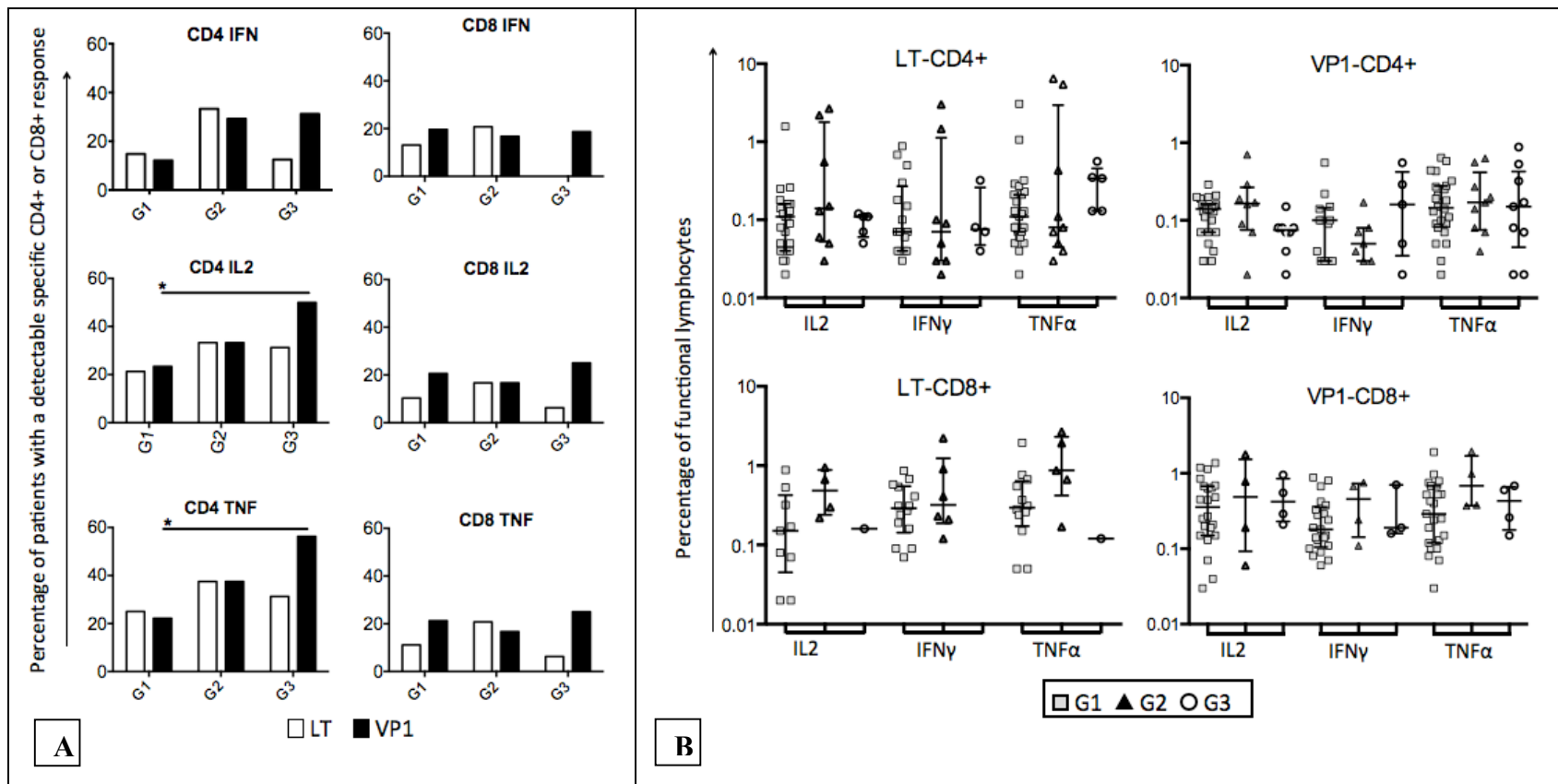
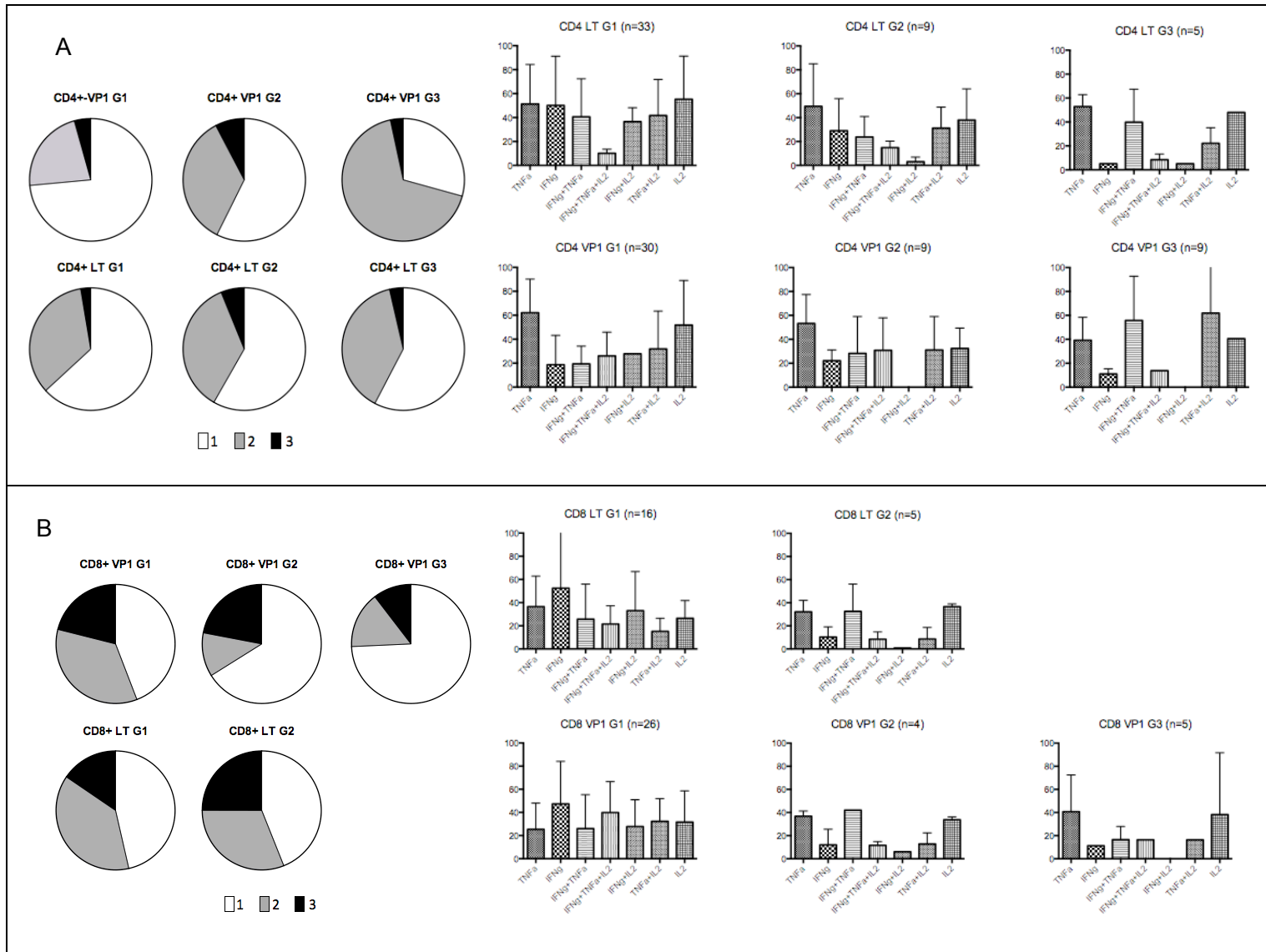


Figure 5



**Figure 6**

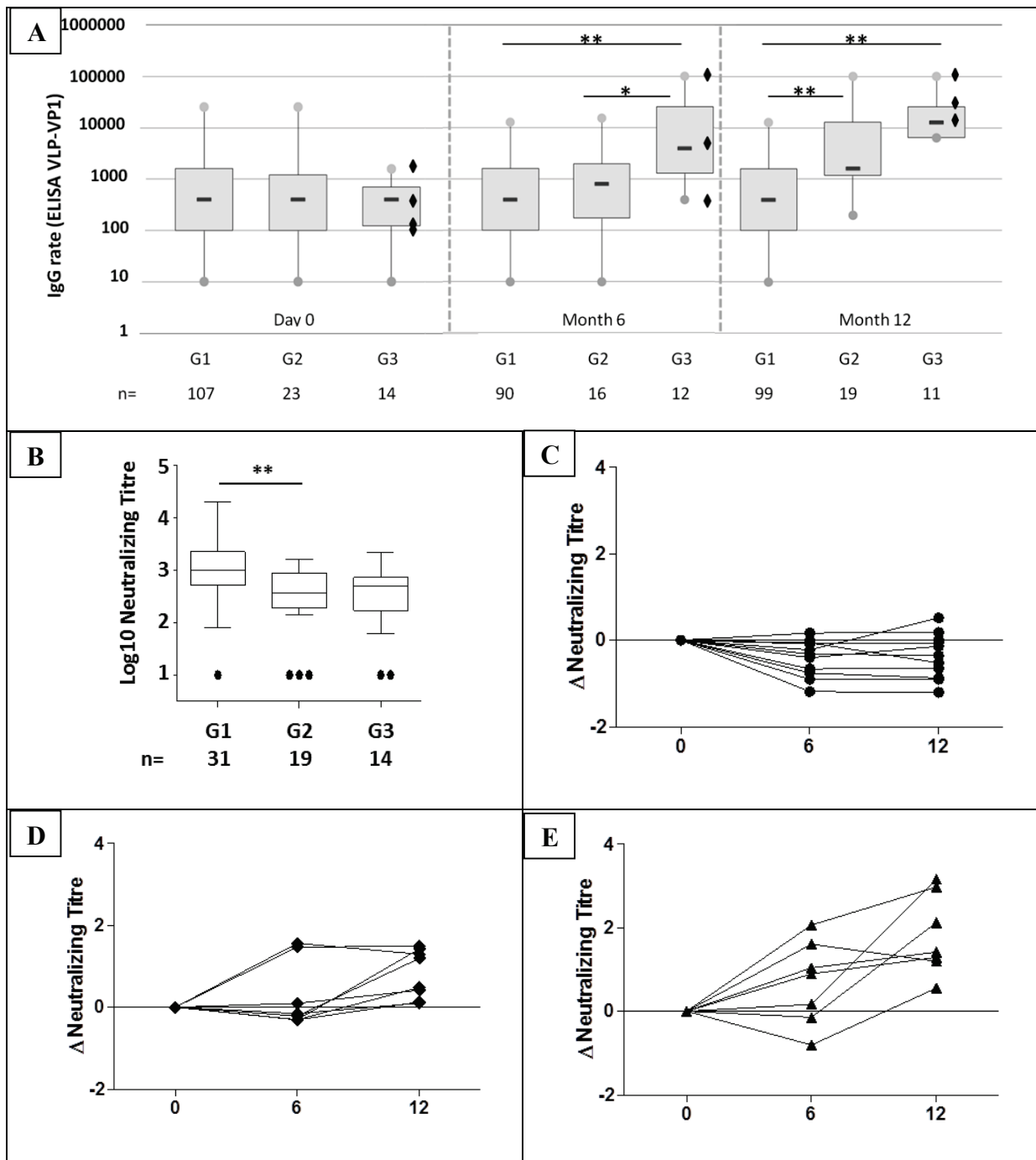


Figure 7

**Supplementary data 1 : Baseline and demographic determinants of 148 renal transplanted patients from the cohort.**

	Total n=148	G1 (negative viruria, negative viremia) n=107	G2 (positive viruria, negative viremia) n=25	G3 (positive viruria, positive viremia>1000 cop/ml) n=16	p 1vs2vs3	p (1+2) vs 3	p1 vs (2+3)
Kind of graft							
<i>kidney</i>	142 (95.9)	103 (96.3)	24 (96)	15 (93.8)	0.80	0.50	0.67
<i>kidney pancreas</i>	6 (4.1)	4 (3.7)	1 (4)	1 (6.3)			
Graft rank							
1st	112 (75.7)	79 (73.8)	23 (92)	10 (62.5)	0.17	0.28	0.64
2d	32 (21.6)	24 (22.4)	2 (8)	6 (37.5)			
3d	4 (2.7)	4 (3.7)	0 (0)	0 (0)			
Recipient age, mean (standard deviation)	51.7 (13.3)	52.5 (12.8)	47.6 (14.4)	52.6 (14.4)	0.24	0.77	0.22
Donor age, mean (standard deviation)	53.2 (14.9)	54.5 (13.1)	46.6 (18.7)	54.9 (17.9)	0.05	0.63	0.09
Recipient sex							
<i>female</i>	53 (35.8)	38 (35.5)	11 (44)	4 (25)	0.50	0.42	1.00
<i>male</i>	95 (64.2)	69 (64.5)	14 (56)	12 (75)			
Donor sex							
<i>female</i>	69 (46.6)	49 (45.8)	13 (52)	7 (43.8)	0.86	0.81	0.85
<i>male</i>	79 (53.4)	58 (54.2)	12 (48)	9 (56.3)			
Recipient BMI, mean (standard deviation)	24.6 (4.4)	24.9 (4.4)	23.2 (4)	24.6 (5.1)	0.16	0.99	0.16
Donor status							
<i>living</i>	19 (12.8)	16 (15)	3 (12)	0 (0)	0.32	0.22	0.28
<i>deceased</i>	129 (87.2)	91 (85)	22 (88)	16 (100)			
HLA A mismatches on locus A, B, DR							
0	6 (4.1)	5 (4.7)	0 (0)	1 (6.3)	0.70	0.50	0.77
1	11 (7.4)	7 (6.5)	3 (12)	1 (6.3)			
2	19 (12.8)	13 (12.1)	4 (16)	2 (12.5)			
3	50 (33.8)	36 (33.6)	7 (28)	7 (43.8)			
4	35 (23.6)	28 (26.2)	6 (24)	1 (6.3)			
5	21 (14.2)	13 (12.1)	5 (20)	3 (18.8)			
6	6 (4.1)	5 (4.7)	0 (0)	1 (6.3)			
Anti-HLA immunization before the graft							
<i>anti-HLA class I</i>	72 (50.3)	49 (46.7)	14 (56)	9 (69.2)	0.26	0.24	0.18
<i>anti HLA class II</i>	54 (38)	39 (37.1)	8 (33.3)	7 (53.8)	0.46	0.24	0.84
Donor creatininemia at the time of graft	78 [60.5-102]	74 [60-96]	85 [62-111]	99.5 [71-125]	0.13	0.08	0.07
Cold ischemia time, hours, mean (standard deviation)	15.7 (8.2)	15.6 (8.4)	15.7 (8.9)	16.4 (5.9)	0.84	0.72	0.87
<b>Induction therapy</b>							
<i>depleting (anti-thymocyte globulin)</i>	62 (41.9)	43 (40.2)	9 (36)	10 (62.5)	0.21	0.11	0.58
<i>non depleting (anti-IL2R, Simulect®)</i>	85 (57.4)	63 (58.9)	16 (64)	6 (37.5)	0.20	0.11	0.58
<b>maintenance therapy</b>							
calcineurin inhibitor							
<i>tacrolimus</i>	148 (100)	108 (100)	24 (100)	16 (100)	1.00	1.00	1.00
proliferation inhibitor:							
<i>mycophenolate mofetil (MMF, Cellcept®)</i>	148 (100)	108 (100)	24 (100)	16 (100)	1.00	1.00	1.00
<i>mycophenolic acid (MPA, Myfortic®)</i>	0	0	0	0			
<i>azathioprine</i>	0	0	0	0			
<i>none</i>	0	0	0	0			
corticoid therapy							
No	48 (32.4)	35 (32.4)	9 (37.5)	4 (25)	0.71	0.5	0.99
Yes	100 (67.6)	73 (67.6)	15 (62.5)	12 (75)			
IVIG therapy	24 (16.2)	19 (17.8)	2 (8)	3 (18.8)	0.48	0.72	0.47
EBV serology (recipient)							
Négative	4 (2.7)	2 (1.9)	2 (8)	0 (0)	0.19	0.99	0.31
Positive	142 (97.3)	103 (98.1)	23 (92)	16 (100)			
EBV serology (donor)							
Négative	4 (2.7)	1 (0.9)	1 (4)	2 (12.5)	0.04	0.06	0.06
Positive	144 (97.3)	106 (99.1)	24 (96)	14 (87.5)			
CMV donor/recipient serology							
<i>negative/negative</i>	51 (34.9)	33 (31.1)	10 (41.7)	8 (50)	0.78	0.65	0.47
<i>negative/positive</i>	35 (24.1)	26 (24.5)	6 (25)	3 (18.7)			
<i>positive/negative</i>	30 (20.5)	23 (21.7)	5 (20.8)	2 (12.5)			
<i>positive/positive</i>	30 (20.5)	24 (22.6)	3 (12.5)	3 (18.7)			
CMV prophylactic therapy	98 (66.2)	75 (70.1)	15 (60)	8 (50)	0.20	0.17	0.12

**Supplementary data 2: Follow-up determinants during the first year post renal transplantation.**

	Total n=148	G1 (negative viruria, negative viremia) n=107	G2 (positive viruria, negative viremia) n=25	G3 (positive viruria, positive viremia>1000 cop/ml) n=16	p 1vs2vs3	p (1+2) vs 3	p1 vs (2+3)
at least one rejection episode during the first 12 months	22 (14.8)	14 (13.0)	6 (25)	2 (12.5)	0.31	0.78	0.28
Return to dialysis	7 (4.7)	2 (1.9)	1 (4)	4 (25)	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>0.018</b>
<i>chronic graft dysfunction</i>	2 (1.4)	1 (0.9)	0 (0)	1 (6.3)			
<i>PVAN</i>	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)			
<i>thrombotic microangiopathy</i>	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)			
<i>vascular disease</i>	1 (0.7)	0 (0)	1 (4)	0 (0)			
<i>mixte acute and chronic rejection</i>	1 (0.7)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)			
<i>recurrence of the initial disease</i>	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)			
CMV infection during the first 12 months	17 (11.5)	13 (12.1)	3 (12)	1 (6.3)	0.92	0.69	0.78
urinary infection	58 (39.2)	47 (43.9)	7 (28)	4 (25)	0.18	0.28	0.06
HSV infection	5 (3.4)	3 (2.8)	1 (4)	1 (6.3)	0.42	0.44	0.62
VZV infection	7 (4.7)	6 (5.6)	0 (0)	1 (6.3)	0.55	0.56	0.67
neoplasia	22 (14.8)	16 (14.8)	5 (20.8)	1 (6.25)	0.45	0.3	0.98
urological complication on the graft	25 (16.9)	21 (19.6)	3 (12)	1 (6.3)	0.40	0.31	0.22
vascular complication on the graft	4 (2.7)	4 (3.7)	0 (0)	0 (0)	1.00	1.00	0.58
Death	3 (2)	1 (0.9)	1 (4)	1 (6.3)	0.19	0.29	0.19
<i>cerebral strokes</i>	1 (0.7)	0 (0)	1 (4)	0 (0)			
<i>unknown cause</i>	1 (0.7)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)			
<i>surgical complication</i>	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)			
<i>opportunistic infection</i>	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)			
<b>Month 3</b>							
BMI, mean (SD)	24.5 (3.9)	24.7 (3.8)	23.4 (3.6)	24.8 (5.2)	0.32	0.75	0.28
creatininemia, median [25-75]	138 [109-170]	138 [109-169]	138 [121-168]	137 [106-186]	0.97	0.92	0.91
proteinuria, median [25-75]	22 [0.12-0.42]	0.2 [0.11-0.35]	0.21 [0.14-0.45]	0.335 [0.15-0.875]	0.11	0.04	0.10
MDRD clearance, mean (SD)	47.6 (17.5)	47.3 (16.9)	47.5 (19.8)	49.7 (19.1)	0.89	0.80	0.75
<b>immunosuppressive therapy:</b>							
calcineurin inhibitor							
<i>tacrolimus</i>	146 (98.6)	107 (99.1)	23 (95.8)	16 (100)	0.23	0.88	0.21
<i>ciclosporin A</i>	1 (6.8)	0	1 (4.2)	0			
<i>none</i>	1 (6.8)	1 (0.9)	0	0			
tacrolimus dose mg/day; median [25-75]	7 [4.5-11]	6.5 [4.5-9.75]	6.5 [4.5-10]	6 [5-10]	0.10	0.29	0.34
proliferation inhibitor:							
<i>mycophenolate mofetil (MMF, Cellcept®)</i>							
<i>mycophenolic acid (MPA, Myfortic®)</i>	132 (89.2)	99 (91.7)	19 (79.2)	14 (87.5)	0.38	0.79	0.17
<i>azathioprine</i>	5 (3.4)	2 (1.8)	2 (8.3)	1 (6.25)			
<i>none</i>	11 (7.4)	7 (6.5)	3 (12.5)	1 (6.25)			
corticoid therapy							
No	79 (53.4)	61 (56.5)	11 (45.8)	7 (43.8)	0.46	0.67	0.21
Yes	69 (46.6)	47 (43.5)	13 (54.2)	9 (56.2)			
<b>Month 6</b>							
BMI, mean (SD)	24.9 (4.4)	25.2 (4.2)	23.4 (4.2)	25.3 (5.6)	0.2	0.95	0.21
creatininemia, median [25-75]	134 [108-177]	134 [110-176]	133 [106-177]	138 [105-180]	0.90	0.77	0.90
proteinuria, median [25-75]	18 [0.11-0.33]	0.18 [0.09-0.33]	0.19 [0.11-0.26]	0.25 [0.13-0.47]	0.57	0.30	0.71
MDRD clearance, mean (SD)	48 (18.0)	47.4 (17.4)	50.2 (19.7)	48.5 (20.8)	0.8	0.84	0.54
<b>immunosuppressive therapy:</b>							
calcineurin inhibitor							
<i>tacrolimus</i>	143 (97.3)	105 (97.2)	23 (95.8)	15 (100)	0.18	0.79	0.14
<i>ciclosporin A</i>	1 (6.8)	0	1 (4.2)	0			
<i>none</i>	3 (2.0)	3 (2.8)	0	0			
FK-506 dose mg/day; median [25-75ème percentile]	7 [4.5-10]	6.5 [4.5-10]	10 [4.5-13]	6 [5-10]	0.13	0.73	0.18
proliferation inhibitor:							
<i>mycophenolate mofetil (MMF, Cellcept®)</i>							
<i>mycophenolic acid (MPA, Myfortic®)</i>	125 (85)	93 (86.1)	19 (79.2)	13 (86.7)	0.42	0.71	0.55
<i>azathioprine</i>	4 (2.7)	2 (1.8)	2 (8.3)	0			
<i>none</i>	14 (29.8)	10 (9.3)	2 (8.3)	2 (8)			
corticoid therapy							
No	76 (51.7)	57 (52.8)	12 (50)	7 (46.7)	0.89	0.68	0.66
Yes	71 (48.3)	51 (47.2)	12 (50)	8 (53.3)			
<b>Month 12</b>							
BMI, mean (SD)	25.1 (4.4)	25.4 (4.2)	23.1 (3.8)	26.5 (5.9)	0.05	0.45	0.24
creatininemia, median [25-75]	137 [111-172]	137 [111.5-170.5]	127 [99-171]	144 [125-199]	0.31	0.16	0.83
proteinuria, median [25-75]	23 [0.11-0.53]	0.23 [0.12-0.46]	0.15 [0.12-0.36]	0.50 [0.10-0.88]	0.46	0.25	0.82
MDRD clearance, mean (SD)	48.0 (17.5)	47.8 (16.9)	52.6 (19.6)	41.3 (17.8)	0.2	0.28	0.86
<b>immunosuppressive therapy:</b>							
calcineurin inhibitor							
<i>tacrolimus</i>	132	97	23	12	0.16	0.09	0.12
<i>ciclosporin A</i>	6	3	1	2			
<i>none</i>	7	7	0	0			
FK-506 dose mg/day; median [25-75ème percentile]		6 [4-10]	8.5 [5.25-14]	6.25 [5.3-9]	0.04	0.63	0.06
proliferation inhibitor:							
<i>mycophenolate mofetil (MMF, Cellcept®)</i>							
<i>mycophenolic acid (MPA, Myfortic®)</i>	118	87	20	11	0.33	0.2	0.42
<i>azathioprine</i>	3	2	1	0			
<i>none</i>	12	7	1	3			
<i>mTOR inhibitor (everolimus)</i>	5	6	0	0			
corticoid therapy							
No	83	64	11	8	0.46	1.0	0.29
Yes	62	43	13	6			

**Supplementary data 3: Group 3 patients, virological and immunological monitoring.** Patients have been grouped according to the kinetics of viremia during the first 12 months post-transplantation. Viral loads are given in copDNA BKPyV/ml of urines (VL<sub>UR</sub>) or whole blood (VL<sub>WB</sub>). Lymphocyte-mediated responses (CD4 or CD8, against VP1 or LT peptide pools) are given in cumulative percentage of functional lymphocytes per point. IgG levels are expressed in IgG titers. The principal time points are presented for all patients (1, 2, 3, 6, 9, 21 months), and for some of them some interesting intermediate time points are shown. Confirmed NBKPyV are notified by a \*, and the histological stage at the time of diagnosis is given.

	CD4-VP1	CD4-LT	CD8-VP1	CD8-LT	IGG	VL <sub>UR</sub>	VL <sub>WB</sub>	mmf	Tacrolimus
<b>Patient n°1</b> controller									
Pre-graft					1400				
M1						neg	neg		12
M2	neg	neg	neg	neg		1.60E+08	1.31E+04	≥50%	13.5
M3	0.64	neg	neg	neg		6.45E+06	1.24E+04	stop	14.5
M4						3.76 <sup>+</sup> +05	1.3 <sup>+</sup> +03		
M6	0.54	0.26	0.57	0.24		4.0 <sup>+</sup> +03	neg		15.5
M7						neg	neg		
M9	0.68	0.21	0.1	0.23		neg	neg		16.5
M12					16400	neg	neg		16.5
<b>Patient n°2</b> non controller									
Pre-graft					1600				19.5
M1						neg	neg		10
M2						1.24E+08	2.00E+02		19
M3	0.37	0.25	0.36	0.27		9.97E+07	neg		18
4						9.97 <sup>+</sup> +07	3.5 <sup>+</sup> +03		
5						6.69 <sup>+</sup> +08	3.5 <sup>+</sup> +04		
M6 (st A NBKPyV)	neg	2.97	0.28	neg		2.28E+09	3.10E+05	stop	15
M9	0.64	neg	neg	neg		8.27E+06	4.70E+03		Switch CsA
M12					25600	5.60E+04	neg		
<b>Patient n°3</b> non controller									
Pre-graft					200				
M3						1.26E+09	1.21E+05	≥50%	14.5
M4 (st B NBKPyV)	0.58	0.59	neg	neg		1.06E+08	1.25E+05	stop	14.5
M6	0.32	0.10	0.12	neg	102400	1.84E+05	4.00E+03		13.5
M9						5.03E+03	2.00E+02		13.5
M12	0.02	neg	neg	neg	102400	6.26E+03	5.00E+02		13.5
<b>Patient n°4</b> controller									
Pre-graft					1600				
M1						4.00E+03	neg		16.5
M2	neg	8.22	neg	14.58		9.62E+07	5.30E+03		17
M3	0.02	0.19	neg	neg		1.95E+07	1.05E+04	≥50%	14
M6	neg	0.21	neg	neg		1.60E+04	1.00E+02		16
M9	0.02	0.08	neg	neg			neg		16
M12					25600	6.00E+04	7.00E+02		15.5
<b>Patient n°5</b> controller									
Pre-graft					100				
M1						neg	neg		13
M2						neg	neg	≥50%	12
M3	0.07	0.13	neg	neg		neg	neg		11
M6	0.21	0.18	neg	neg	1600	7.72E+06	neg		11
M9	0.10	0.17	neg	neg		1.14E+06	neg		10
M10						8.73E+06	6.40E+03		10
M11	0.17	neg	neg	neg		1.18E+06	1.30E+03		Switch CsA
M12					16400	3.20E+04	1.00E+02		
<b>Patient n°12</b> controller									
Pre-graft					400				
Month 1						6.15E+10	neg		
Month 2						4.05E+09	4.00E+02		
Month 3	0.15	0.34	neg	neg		3.54E+09	2.00E+03		
Month 6	0.11	0.04	neg	neg	25600	4.63E+06	9.00E+02		
Month 9	neg	neg	neg	neg		4.40E+04	neg		
Month 12						neg	neg		



	CD4-VP1	CD4-LT	CD8-VP1	CD8-LT	IGG	VL <sub>HBV</sub>	VL <sub>HBe</sub>	mmf	Tacrolimus
<b>Patient n°13 controller</b>									
Pre-graft					100				
Month 1						1.08E+06	neg		6
Month 2	neg	neg	neg	neg		1.38E+07	2.00E+02		8
Month 3	0.02	neg	neg	neg		2.59E+07	1.50E+03	≥50%	8.5
Month 6	neg	neg	neg	neg	1600	2.40E+04	neg	750%	8
Month 9	neg	neg	neg	neg		neg	neg		8
Month 12						neg	neg		9
<b>Patient n°14 controller</b>									
Pre-graft					1600				
Month 1						1.00E+05	neg		10.5
Month 2						8.00E+04	neg		9.5
Month 3						8.80E+04	neg		10
Month 4	neg	neg	0.68	neg		2.34E+06	2.60E+03		10
Month 6	neg	neg	neg	neg	25600	2.08E+05	neg		10
Month 9	neg	neg	neg	neg		4.00E+03	neg		6.5
Month 12					12800	—	—		
<b>Patient n°15 controller</b>									
Pre-graft					400				
Month 1									7
Month 2						3.13E+06	neg		2
Month 3	neg	neg	3.26	neg		3.59E+08	4.00E+03		1.5
Month 6	neg	neg	neg	neg		1.42E+08	1.00E+02		5
Month 9	neg	0.77	neg	neg		6.58E+08	neg		
Month 12					6400	6.88E+05	neg		7
<b>Patient n°16 controller</b>									
Pre-graft									
Month 1									7
Month 2									7
Month 3	0.08	neg	neg	neg		8000	neg		6
Month 4						4.34E+08	7.30E+03		6
Month 6	neg	neg	neg	neg	6400	5.89E+06	neg		5
Month 9						1.54E+04	neg		6
Month 12	neg	neg	neg	neg	25800	neg	neg		6
<b>Patient n°9 controller</b>									
Pre-graft					0				
M1						neg	neg		12
M2						neg	neg	≥50%	10
M3	neg	neg	neg	neg		neg	neg		10
M6	neg	neg	neg	neg	400	1.37E+09	1.00E+03		8
M9	0.14	neg	neg	neg		5.53E+08	7.00E+02		6
M12					6400	5.29E+08	3.00E+02		5.5
M24						3.4E+07	neg		5.5

	CD4-VPI	CD4-LT	CD8-VPI	CD8-LT	IGG	VL <sub>CR</sub>	VL <sub>WB</sub>	mmf	Tacrolimus
<b>Patient n°7</b>									
Pre-graft					800				
M1						neg	neg		9
M2						neg	neg		8
M3	neg	neg	neg	neg		neg	neg		8
M6	neg	0.08	neg	neg	1600	neg	neg		11
M9	neg	0.40	neg	neg		7.83E+08	1.74E+05		11
M12					102400	6.39E+08	1.94E+04	50%	10.5
M24						2.4 <sup>+</sup> E+8	7.9 <sup>+</sup> E+03	50%	8.5
<b>Patient n°8</b>									
Pre-graft					ND				
M1						6.36E+05	neg		10
M2	neg	neg	neg	neg		1.39E+08	2.94E+03	50%	7
M3	neg	neg	0.61	neg		1.03E+07	7.50E+03		5
M6	neg	neg	0.06	neg	102400	1.66E+07	1.40E+04	25%	4
M9	neg	neg	neg	neg		3.67E+06	3.40E+03	25%	3.5
M12					ND	3.51E+06	2.40E+03		3
<b>Patient n°10 non controller</b>									
Pre-graft					100				
M1	neg	neg	neg	neg		4.38E+10	6.00E+03		11
M2						3.58E+10	6.10E+03	50%	9
M3*(st B NBKPyV)						2.89E+09	2.28E+04		6
M4						1.43E+09	3.36E+05		6
M5						1.85E+09	4.63E+05	50%	7
M6	neg	neg	neg	neg	6400	9.62E+06	5.30E+03	50%	7
M9						9.07E+08	6.70E+03	stop	7
M12	neg	neg	neg	neg	12800	7.44E+07	3.30E+03		7
M24						3.5 <sup>+</sup> E+08	7.8 <sup>+</sup> E+03		7
<b>Patient n°11</b>									
Pre-graft					1600				
M1						neg	neg		16
M2						neg	neg		12
M3	neg	neg	neg	neg		neg	neg		14
M6	neg	neg	neg	neg	6400	neg	neg		16
M9	0.09	neg	neg	neg		8.66E+07	4.20E+03	50%	12
<b>Patient n°6 non controller</b>									
Pre-graft					400				
M1						5.33E+08	1.10E+03		
M2	neg	neg	neg	neg		3.00E+09	1.92E+04		
M3 (st A NBKPyV)	neg	neg	neg	neg		1.10E+09	2.11E+06		
M9 (transplantectomy)					400		neg		

# MICA Mutant A5.1 Influences BK Polyomavirus Reactivation and Associated Nephropathy After Kidney Transplantation

Pierre Tonnerre,<sup>1,2,3,a</sup> Nathalie Gérard,<sup>1,2,3</sup> Pierre-Jean Gavlovsky,<sup>1,2,3</sup> Simon Mazalrey,<sup>4</sup> Maryvonne Hourmant,<sup>2,3</sup> Mary-Luce Cheneau,<sup>5</sup> Anne Cesbron-Gautier,<sup>5</sup> Karine Renaudin,<sup>6</sup> Céline Bressollette-Bodin,<sup>4,7,b</sup> and Béatrice Charreau<sup>1,2,3,b</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR1064, LabEx Transplantex, LabEx IGO and IHU-CESTI, <sup>2</sup>CHU Nantes, Institut de Transplantation–Urologie–Néphrologie, ITUN, <sup>3</sup>LUNAM, Université de Nantes, Faculté de Médecine, <sup>4</sup>EA4271, Université de Nantes, UFR Pharmacie, <sup>5</sup>Laboratoire HLA, Etablissement Français du sang, LabEx Transplantex, <sup>6</sup>Laboratoire d'Anatomopathologie, CHU de Nantes, Université de Nantes, Faculté de Médecine, and <sup>7</sup>Laboratoire de Virologie, CHU de Nantes, France

**Background.** BK polyomavirus (BKPyV) frequently reactivates in kidney transplant recipients during immunosuppressive therapy and triggers BKPyV-associated nephropathy and graft rejection. Determining effective risk factors for BKPyV reactivation is required to achieve efficient prevention.

**Methods.** This study investigated the role of major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A (MICA) in BKPyV reactivation in a cohort of 144 transplant donor/recipient pairs, including recipients with no reactivation (controllers) and those with mild (virurics) or severe (viremics) BKPyV reactivation after graft receipt.

**Results.** We show that, in the kidney, MICA is predominantly expressed in tubule epithelial cells, the natural targets of BKPyV, questioning a role for MICA in the immune control of BKPyV infection. Focusing on *MICA* genotype, we found a lower incidence of BKPyV reactivation in recipients of a renal graft from a donor carrying the *MICA* A5.1 mutant, which encodes a truncated nonconventional MICA. We established that a mismatch for *MICA* A5.1 between transplant donor and recipient is critical for BKPyV reactivation and BKPyV-associated nephropathy. Functionally, we found that a low prevalence of BKPyV reactivation was associated with elevated anti-MICA sensitization and reduced plasma level of soluble MICA in recipients, 2 potential effector mechanisms.

**Discussions.** These findings identify the MHC-related MICA as an immunogenetic factor that may functionally influence anti-BKPyV immune responses and infection outcomes.

**Keywords.** BK polyomavirus; innate immunity; *MICA* polymorphism; *MICA* A5.1 mutation; kidney transplantation.

The seroprevalence of BK polyomavirus (BKPyV) is very high (up to 87%) in healthy individuals [1]. Although not associated with disease in immunocompetent individuals, BKPyV is frequently reactivated in kidney transplant recipients during receipt of an immunosuppressive regimen and currently poses a major challenge to transplantation [2]. BKPyV replication is typically found in renal tubular epithelial cells [3–5]. Symptomatic reactivation may result in BKPyV-associated nephropathy and graft loss and in late-onset hemorrhagic cystitis [6, 7]. Immune and genetic factors controlling BKPyV reactivation remain elusive.

MICA is expressed in solid-organ transplants and plays a role in alloimmunity by inducing anti-MICA alloantibodies [8, 9]. MICA is also a key player in innate and adaptive immunity

and contributes to the control of viral infection as a ligand for the activating natural killer (NK) cell receptor NKG2D [10, 11]. *MICA* is highly polymorphic, and up to 102 alleles have been described so far [12]. The A5.1 variant results in a frameshift mutation that generates a premature stop codon that truncates the MICA transmembrane domain and cytoplasmic tail [13]. This feature subsequently affects MICA subcellular localization [14], membrane anchorage [15], and surface expression [16] and the release of soluble MICA (sMICA) molecules [17]. The *MICA* A5.1 genetic variant associates with 9 alleles—*MICA*\*008, \*023, \*028, \*053, \*058, \*070, \*073, \*080, and \*082—with *MICA*\*008 by far the most frequent allele of diverse populations worldwide (27%–40% of individuals carry  $\geq 1$  *MICA*\*008 allele) [18–20]. Regarding the immune response, the functional consequences of carrying the *MICA*\*008/A5.1 allele as compared to full-length wild-type (WT) *MICA* alleles remain poorly understood.

Allotransplantation poses the challenges of a possible mismatch for *MICA* between the transplant donor and recipient. The immune impact of *MICA* mismatch in kidney transplantation remains mostly uncovered. Our previous study demonstrated that a mismatch between donor (D) and recipient (R)

Received 19 January 2016; accepted 19 April 2016.

<sup>a</sup>Present affiliation: Gastrointestinal Unit, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston.

<sup>b</sup>C. B.-B. and B. C. contributed equally to this work.

Correspondence: B. Charreau, INSERM UMR1064, 30 bd J. Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France (beatrice.charreau@univ-nantes.fr).

The Journal of Infectious Diseases®

© The Author 2016. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jiw168

for the *MICA* A5.1 mutation could be a risk factor for long-term transplant survival, owing to enhanced anti-*MICA* sensitization of kidney transplant recipients [16]. Here, we hypothesized that structural changes featuring *MICA* A5.1 proteins could affect BKPyV reactivation after transplantation through atypical modulation of antiviral immune responses. The present study examined the expression and subcellular localization of *MICA* in kidney biopsy specimens and cells and retrospectively investigated *MICA* genotypes and the presence of anti-*MICA* antibodies and s*MICA* in a cohort of 144 kidney transplant donor/recipient pairs according to the occurrence and severity of BKPyV reactivation after graft receipt.

## METHODS

### Study Approval

The observational retrospective study was performed according to the guidelines of the local ethics committee (CCPRB, CHU de Nantes, France). Consent was obtained from participants before their inclusion in this study, to collect and store cells, sera, and DNA (DIVAT BioCollection INSERM, French Health Minister Project N°02G55).

### Subjects and Samples

To investigate the impact of *MICA* A5.1 mutation on recipient BKPyV reactivation, 144 patients who underwent kidney transplantation between 2010 and 2012 at ITUN (CHU de Nantes, France) were included in the study. Recipients that were followed up for at least 1 year to monitor for reactivation of BKPyV were included. To allow matching analyses, only donor/recipient pairs with genomic DNA available for *MICA* typing were selected. HLA and *MICA* antibody testing in sera obtained before and after transplantation was performed at the Laboratoire HLA, EFS Pays de la Loire, Nantes, France, using the Luminex Bead Array technique (One Lambda, Canoga Park, California), for detection of HLA or *MICA* antibody (LABScreen Mixed), and for the identification of HLA and *MICA* single antigen (LABScreen Single antigen). Antibodies were detected by the fluorescent signal for each bead coated with HLA or *MICA* antigen, normalized to the value measured with the negative control serum. MFI values >500 were considered as positive.

### BKPyV Monitoring After Transplantation

During the period studied, urine specimens were collected and whole-blood specimens were collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-lined tubes after transplantation for BKPyV reactivation monitoring. If the viruria level was >10<sup>7</sup> copies/mL or viremia testing had positive results, monthly monitoring was performed. Based on the international recommendations [21], suspected BKPyV-associated nephropathy was defined by persistent and high-level BKPyV viremia (defined as a viremia level of >10<sup>4</sup> copies/mL at >2 consecutive measurements), and confirmed BKPyV-associated nephropathy was defined by positive immunostaining of a renal biopsy specimen

(AC anti-SV40 LT). In case of a confirmed BKPyV viremia level of >10<sup>4</sup> copies/mL, doses of mycophenolate mofetil (Cellcept, Roche Pharmaceuticals, Basel, Switzerland) or enteric-coated mycophenolate sodium (Myfortic, Novartis Pharma) and/or tacrolimus (Prograf, Astellas Pharma, Tokyo, Japan) were progressively decreased or treatment was interrupted according to the response to the first reduction in immunosuppression and the presence of BKPyV-associated nephropathy. In case of BKPyV-associated nephropathy, a minimal level of immunosuppression was maintained with a low dose of tacrolimus or a switch to low-dose cyclosporine A.

For BKPyV nucleic acid testing, DNA was extracted from whole blood, using the MagNAPure instrument and the MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit. Urines samples were boiled, centrifuged, and diluted at 1:10 with phosphate-buffered saline (PBS). Viral DNA detection and quantification were performed using an in-house quantitative real-time polymerase chain reaction, as we previously described [22]. BKPyV viruria and viremia lower limits of quantification were 10 000 copies/mL of urine and 500 copies/mL of whole blood, respectively.

### *MICA* A5.1 Genotyping

*MICA* typing of transplant donors and recipients was performed as we previously described [16, 23]. Briefly, *MICA* exon 5 DNA was amplified with the following primers: *MICA*5-F 5'-CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC-3' and *MICA*5-R 5'-CCTTACCATCTCCAGAACTGC-3'. DNA sequencing was performed (Sequencing Core Facility INSERM/SFR Santé F. Bonamy, Nantes, France) using a 48-capillary AB3730 automatic system (Applied Biosystems, Foster City, California) and analyzed using ChromasPro 1.5 software (Digital River, Shannon, Ireland).

### Immunofluorescence

Consent was obtained to collect and use renal biopsy specimens and/or kidney explants for research purposes. Section of frozen kidney biopsy specimens from 6 donors were immunostained according to the following method. Eight-micrometer-thick sections were dried, fixed in acetone, and permeabilized in 0.5% saponin. After rehydration in PBS, tissue sections were blocked with 4% donkey or goat serum for 1 hour before incubation with monoclonal anti-*MICA*/B antibodies (D-8, 10 µg/mL, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) at 4°C for 2 hours, followed by incubation for 2 hours with anti-mouse Alexa 488-labeled secondary antibodies and 4', 6'-diamidino-2-phenylindole for nuclear staining (DAPI, Invitrogen). Specimens were analyzed by confocal fluorescence microscopy (Nikon A1 RSi, Tokyo, Japan) and quantified using the Fiji open source software [24].

### Cell Culture and Flow Cytometry

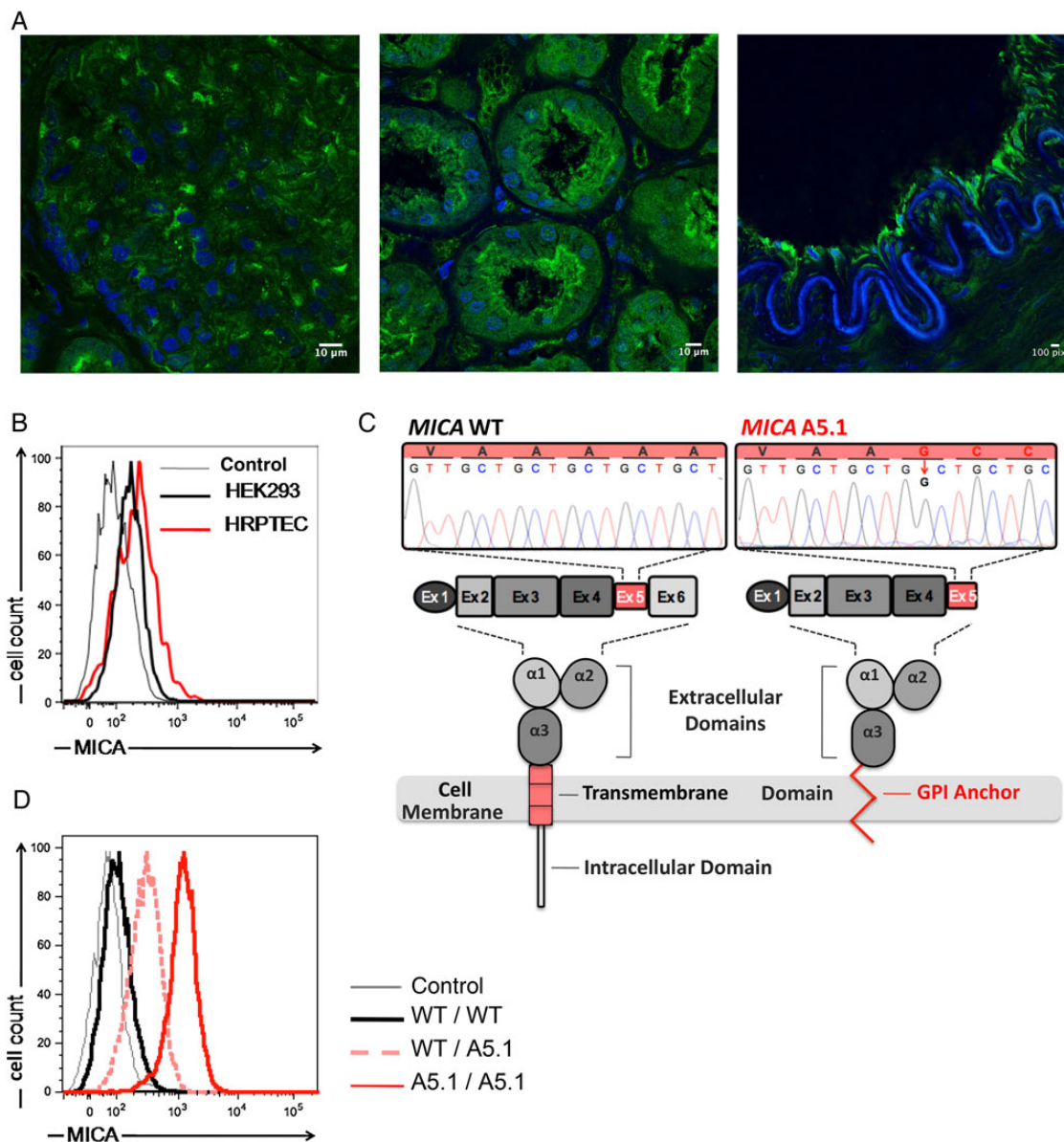
Primary cultures of vascular endothelial cells (human aortic endothelial cells) were isolated and cultured as we previously described [16]. Primary cultures of human renal proximal tubule endothelial cells (American Tissue Culture Collection,

LGC Standards, Molsheim, France), human epithelial cells (HEK293), and a CHO cell line were grown using an epithelial cell growth kit (ATCC) or Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (HEK293 and CHO). For phenotype analysis,  $1 \times 10^5$ – $2 \times 10^5$  cells/sample were harvested using trypsin/EDTA, washed twice, and incubated for 30 minutes with anti-MICA antibodies (BamOmab, Tübingen, Germany). After 3 washes, cells were incubated with Alexa 488-labeled goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> immunoglobulin G (IgG; Jackson Laboratory) at 4°C for 30 minutes. Negative controls

were evaluated using an isotype-matched IgG control. Fluorescence was measured on 10 000 cells/sample, using LSR II (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey) and analyzed using FlowJo software (Tree Star). Results shown are representative of at least 3 independent experiments.

#### Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA) for sMICA

Quantification of sMICA was done using a sandwich ELISA from Immatics (Tübingen, Germany), using recipients' sera harvested before transplantation and at months 6 and 12 after transplantation. Briefly, coating was performed overnight with



**Figure 1.** Major histocompatibility complex class I–related chain A (MICA) expression and localization in control kidney. *A*, Representative immunostaining for MICA (green) in normal kidney, showing MICA expression in a glomerule renal tubules, and vascular endothelium. Nuclei were stained with DAPI (blue). *B*, Flow cytometry comparing MICA expression on human renal proximal tubule epithelial cells (HRPTECs) and the renal cell line HEK293. The CHO cell line was used as a negative control. *C*, A schematic representation of exons and protein domain distribution for full-length MICA wild type (WT) and the MICA A5.1 mutant. *D*, A representative analysis comparing MICA levels on cultured primary endothelial cells isolated from homozygous MICA WT (WT/WT), heterozygous (WT/A5.1), or homozygous MICA A5.1 (A5.1/A5.1) donors.

capture anti-MICA monoclonal antibody (5 µg/mL), serum samples were diluted 1:3 in 7.5% bovine serum albumin–PBS, recombinant MICA\*004 was used as standard, and anti-MICA/B antibody (1 µg/mL) was used as a sandwich monoclonal antibody. Experiments were performed in triplicate according to the manufacturer’s recommendations.

#### Data Analysis

Statistical analysis of the association between donors/recipients of MICA WT or A5.1 genotype mismatch and BKV infection or MICA alloimmunity was performed using Pearson  $\chi^2$  or Fisher exact tests. Quantitative data are expressed as means  $\pm$  standard errors of the mean and were compared using the nonparametric Mann–Whitney test or the Kruskal–Wallis test (with the Dunn multiple comparisons post hoc test) if there were >2 conditions. The cumulative incidence for BKPyV-associated nephropathy,

based on MICA genotype D/R combination, was assessed using the log-rank test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, California). A *P* value of < .05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Predominant Expression for MICA in Renal Tubule Epithelial Cells, the Natural Targets of BKPyV Infection

Because, no exhaustive description of MICA expression in the kidney was available [25], we sought to examine its basal cellular localization in normal kidneys. Figure 1 shows that MICA is most predominantly expressed by epithelial cells in renal tubules and by some vascular endothelial cells. Expression in the tubule epithelium seems higher in intensity than in the endothelium, where glomerular and arterial endothelial cells were

**Table 1. Demographic and Clinical Characteristics of Donors and Recipients, by BK Polyomavirus Status**

Characteristic	BKPyV Controllers (n = 57)	BKPyV Virurics (n = 35)	BKPyV Viremics (n = 52)	<i>P</i> Value <sup>a</sup>
<b>Donors</b>				
Age, y	52 (34–77)	49 (18–77)	56.5 (17–78)	.0628 <sup>b</sup>
<b>Sex</b>				
Male	37 (64.91)	20 (57.14)	27 (51.92)	.3839
Female, no.	20	15	25	
<b>Recipients</b>				
Age, y	51 (25–74)	52 (31–79)	60 (31–81)	.0618 <sup>b</sup>
<b>Sex</b>				
Male	38 (66.66)	22 (62.85)	29 (55.76)	.4992
Female, no.	19	13	23	
Total HLA-A, -B, -DR mismatches, no.	4 (0–6)	4 (0–5)	3 (0–5)	.1020 <sup>b</sup>
Postgraft follow-up time, mo	38 (12–60)	36 (12–60)	29 (12–54)	.1922 <sup>b</sup>
<b>BKPyV reactivation tests, by specimen, no.</b>				
Urine	5 (2–10)	5 (2–13)	7 (3–15)	<.0001 <sup>b</sup>
Whole blood	5 (2–10)	6 (2–13)	7 (3–18)	<.0001 <sup>b</sup>
Time to postgraft BKPyV reactivation diagnosis, <sup>c</sup> mo	NA	6 (1–49)	5 (1–17)	.857 <sup>d</sup>
<b>Maximum BKPyV load, by specimen, log copies/mL</b>				
Urine	NA	5.2 (2.6–9.6)	9.45 (3.6–10.8)	<.0001 <sup>d</sup>
Whole blood	NA	NA	4.3 (2.0–7.2)	NA
BKPyV-associated nephropathy	None	None	14 (26.92)	NA
<b>Immunosuppressive drugs</b>				
<b>Induction</b>				
ATG-Fresenius or Thymoglobuline	28 (49.12)	17 (48.57)	28 (53.84)	.8496
Basiliximab (Simulect)	29 (50.87)	18 (51.42)	24 (46.15)	
<b>Initial and maintenance</b>				
Corticosteroids	40 (70.17)	23 (65.71)	39 (75.00)	.6399
Mycophenolate mofetil (Cellcept)	52 (91.22)	34 (97.14)	50 (96.15)	.3869
Tacrolimus	54 (94.73)	34 (97.14)	50 (96.15)	.9694
Cyclosporine A or others	2 (3.50)	1 (2.85)	2 (3.84)	
<b>Antiviral prophylaxis</b>				
Valganciclovir (Rovalyte)	38 (66.66)	21 (60.00)	37 (71.15)	.5568
Ganciclovir	1 (1.75)	1 (2.85)	None	1.0000

Data are median (range) or no. (%) of subjects, unless otherwise indicated. See Methods for a description of the study groups.

Abbreviations: BKPyV, BK polyomavirus; NA, not applicable.

<sup>a</sup> By the Pearson  $\chi^2$  or Fisher exact tests, unless otherwise indicated.

<sup>b</sup> By the Kruskal–Wallis test.

<sup>c</sup> Corresponds to the time to the first positive viruria test.

<sup>d</sup> By the Mann–Whitney test.



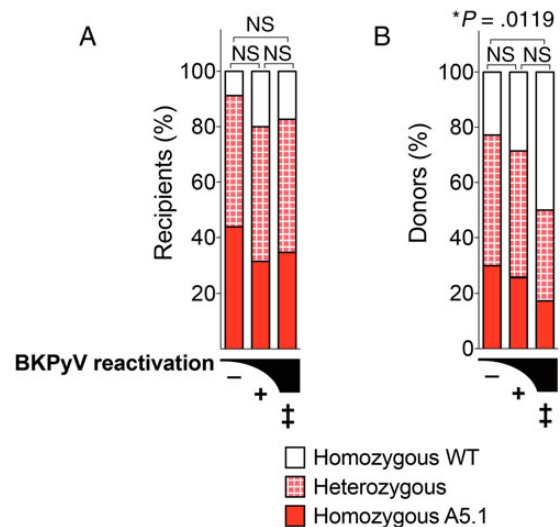
stained (Figure 1A). Among renal tubules, both proximal and distal tubular epithelial cells were stained. Sustained MICA expression on tubular epithelial cells was further confirmed by flow cytometry performed on human renal proximal epithelial cells (Figure 1B). In tubules, MICA staining was concentrated at the apical side of epithelial cells, revealing a yet unknown polarity for MICA in renal cells (Supplementary Figure 1). Since epithelial tubular cells are natural targets for BKPyV infection and replication [26] and because reactivation was of donor origin [27], we postulated that, in kidney transplants, *MICA* polymorphisms may yield changes in MICA proteins that could affect the effectiveness of the response to and outcome of BKPyV infection. We focused on the *MICA* A5.1 mutant, which, in contrast to full-length WT *MICA* alleles, encodes a truncated MICA protein (Figure 1C) [14, 15]. Consistent with our previous results [16], the *MICA* A5.1 mutation was associated with elevated MICA expression at the cell surface (Figure 1D).

### Study Cohort

Our cohort study included 144 kidney transplant donor/recipient pairs, with grafting occurring between 2010 and 2012 and at least 1-year of follow-up monitoring for BKPyV reactivation after transplantation. Kidney transplant recipients comprised 57 patients without BKPyV reactivation (BKPyV controllers), 35 patients with mild BKPyV infection (positive viruria and negative viremia test results), and 52 recipients with severe BKPyV infection (positive viruria and positive viremia test results). In the viremia group, 14 patients (26.92%) had histologically confirmed BKPyV-associated nephropathy on renal biopsy. Banked donor and recipient biological samples (serum and DNA) were used for *MICA* genotyping, anti-MICA sensitization analysis, and quantification of sMICA. Characteristics of the cohort are summarized in Table 1. There was no significant difference in recipient or donor ages, percentages of males, or HLA mismatches. The majority of patients received similar preconditioning and maintenance therapies. The mean follow-up periods were 29, 36, and 38 months in the viremic, viruric only, and controller groups, respectively.

### Recipients of a Renal Graft Carrying the *MICA* A5.1 Mutation Have a Lower Risk of BKPyV Reactivation

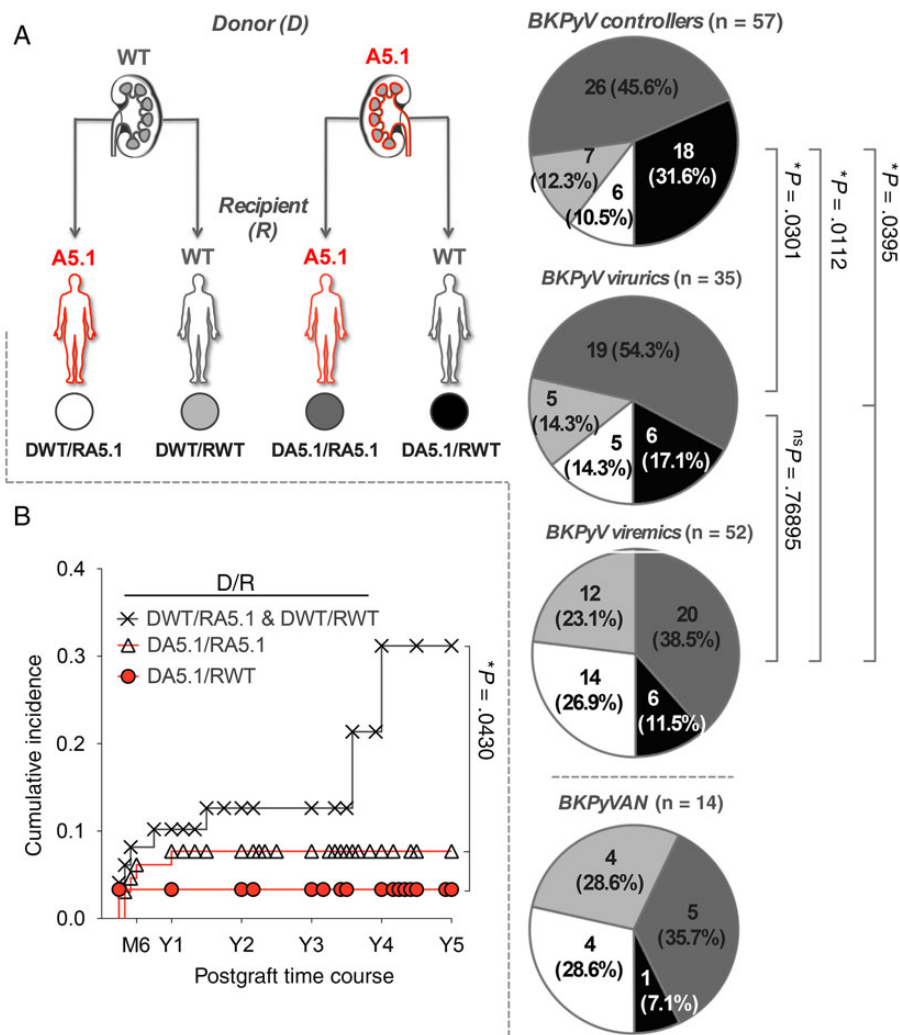
First, we examined the frequency of recipients and associated transplant donors carrying none (WT/WT), 1 (WT/A5.1), or 2 (A5.1/A5.1) *MICA* A5.1 alleles according to the occurrence of BKPyV reactivation and infection severity. In recipients, we found a roughly similar distribution of the 3 genotypes among the groups (Figure 2A). A significantly higher prevalence of donors carrying at least 1 *MICA* A5.1 allele was observed in transplant recipients without BKPyV reactivation (77.19%) as compared to recipients with BKPyV viremia (49.99%;  $P = .0119$ ; Figure 2B). These data suggest that intragraft MICA expression may have a significant influence on BKPyV reactivation after transplantation and may indicate a protective role for MICA A5.1.



**Figure 2.** Influence of the *MICA* A5.1 mutation among transplant donors and recipients on BK polyomavirus (BKPyV) reactivation. Percentages of recipients and donors carrying none (homozygous wild type [WT]), 1 (heterozygous), or 2 (homozygous A5.1) *MICA* A5.1 alleles in BKPyV controller (–), viruric (+), and viremic (++) patients. Bars represent percentages of recipients (A) and donors (B) in each group. Abbreviation: NS, not significant.

### Mismatch for *MICA* A5.1 Variant Between Transplant Donor and Recipient Is Critical for BKPyV Reactivation and BKPyV-Associated Nephropathy

We then investigated the effect of a mismatch for MICA A5.1 between donor (D) and recipient (R) pairs on BKPyV reactivation. Four combinations were examined, including the 2 well-matched pairs DWT/RWT and DA5.1/RA5.1 and the 2 mismatched combinations DWT/RA5.1 and DA5.1/RWT (Figure 3A). A net increase in the percentage of DWT/RA5.1 pairs was found among recipients with BKPyV viremia (26.9%) as compared to BKPyV controllers (10.50%), with an intermediate frequency among recipients with mild infection (BKPyV viruria, 14.3%). Distribution for DWT/RWT exhibited a similar increase (12.3% among controllers, 14.3% among viruric-only individuals, and 23.1% among viremic individuals). Interestingly, in the subgroup of viremic patients who developed polyomavirus-associated nephropathy ( $n = 14$ ), the DWT/RA5.1 and DWT/RWT combinations were found together in 57.2% of patients. On the other hand, an opposite gradual decrease in the percentage of the DA5.1/RWT combination among severe (11.5%) and mild (17.1%) BKPyV infections, compared with BKPyV-negative recipients (31.6%), suggests that this combination is associated with a lower risk of BKPyV reactivation. Again, in our cohort, BKPyV-associated nephropathy was rarely associated with the DA5.1/RWT combination (1 case BKPyV-associated nephropathy of 14 [7.1%]), further supporting the concept that this combination could be protective. The predominant well-matched DA5.1/RA5.1 combination showed only few variations among the groups.



**Figure 3.** Influence of donor/recipient *MICA* A5.1 mismatch on BK polyomavirus (BKPyV) reactivation. A, According to both donor (D) and recipient (R) *MICA* genotypes, D/R pairs were classified into 4 groups as follows: DWT/RA5.1 (white panel), DWT/RWT (light gray panel), DA5.1/RA5.1 (dark gray panel), and DA5.1/RWT (black panel). The distribution of the 4 D/R combinations among BKPyV controllers (–), viruric patients (+), viremic patients (++), and patients with BKPyV-associated nephropathy (BKPyVAN) are presented. “A5.1” refers to both heterozygous and homozygous individuals for the *MICA* A5.1 mutation. “WT” refers to individuals homozygous for *MICA* wild-type alleles. B, Cumulative incidence of BKPyV-associated nephropathy 5 years after transplantation, according to *MICA* A5.1 D/R combination.

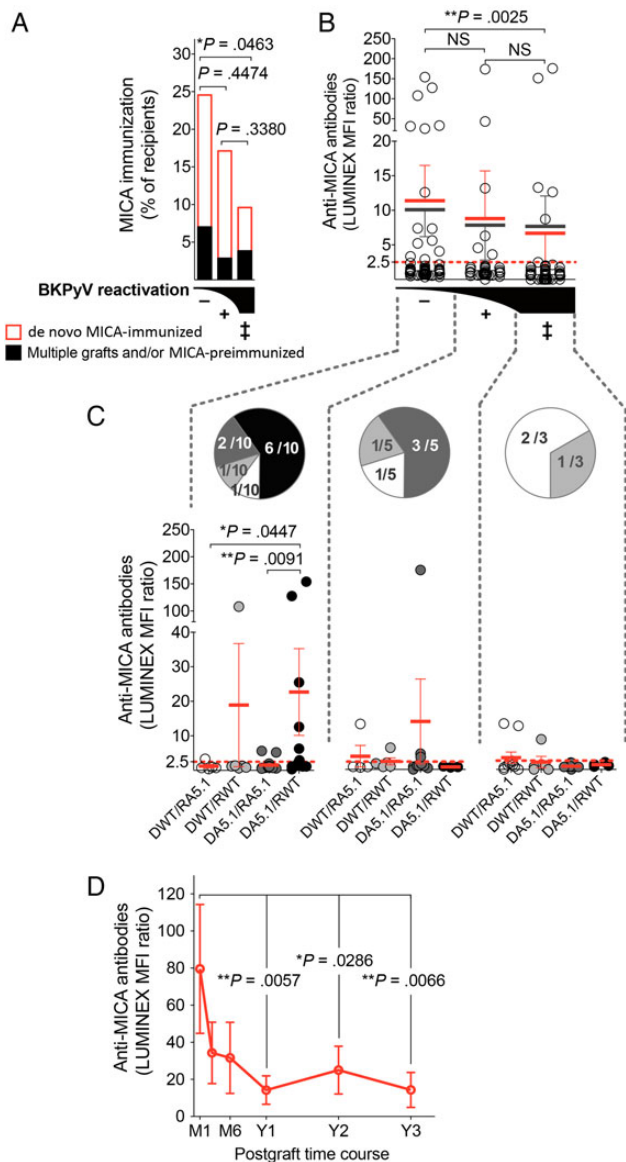
Subsequent univariate analysis showed a significant association between the combinations DWT/RA5.1 and DWT/RWT and a higher risk for BKPyV-associated nephropathy, with a cumulative incidence of 31.19% at 5 years, compared with 7.69% for DA5.1/RA5.1 and 3.33% for DA5.1/RWT ( $P = .0430$ ; Figure 3B). Our data also indicate that DWT/RA5.1 and DWT/RWT were associated with the occurrence of BKPyV-associated nephropathy after the first year following transplantation.

#### Anti-MICA Sensitization in Transplant Recipients Is Associated With a Low Prevalence of BKPyV Reactivation

The humoral response against MICA was examined in the present cohort in regard to *MICA* A5.1 mismatch and virus reactivation. The frequency of MICA-immunized recipients was found to be significantly higher in recipients with no BKPyV reactivation (24.55%) versus recipients with severe BKPyV

reactivation (9.60%;  $P = .0463$ ; Figure 4A). Antibodies were mostly de novo anti-MICA antibodies induced in response to kidney transplantation. Elevated titers of anti-MICA antibodies were also associated with an absence of BKPyV reactivation ( $P = .0025$ ; Figure 4B). Again, intermediate values in both antibody frequency and titer were found in patients with mild BKPyV reactivation (ie, viruria only), suggesting a link between MICA immunization and BKPyV reactivation. Among BKPyV controllers, the level of de novo antibodies was significantly greater in the DA5.1/RWT group, compared with levels for the DWT/RA5.1 ( $P = .0447$ ) and DA5.1/RA5.1 ( $P = .0091$ ) combinations (Figure 4C). Next, the time course of anti-MICA antibodies revealed that MICA immunization reaches a peak early during the first month after transplantation and then progressively decreases, stabilizing after 1 year (Figure 4D).





**Figure 4.** Frequency, strength, and time course of anti-major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A (MICA) immunity in kidney transplant recipients. *A*, Percentages of recipients with anti-MICA antibodies in BK polyomavirus (BKPyV) controller (–), viruric (+), and viremic (++) patients. Presence of preformed (black) vs de novo postgraft-induced (red) anti-MICA antibodies is indicated. Bars represent percentages in each group. *B* and *C*, Relative titers (expressed as median fluorescence intensity ratios from Luminex analyses; means  $\pm$  standard errors of the mean are indicated) of anti-MICA antibodies, according to BKPyV infection (*B*) and MICA A5.1 D/R mismatch (*C*). In panel *B*, black bars refer to the analysis of all patients, whereas red bars refer to patients with only de novo MICA immunization. In panel *C*, only recent recipients of transplants with de novo MICA immunization were included. The number of recipients in the groups is indicated in sector graphs. *D*, Time course of the anti-MICA response in transplant recipients with MICA immunization in the cohort ( $n = 25$ ); statistical analysis was performed by comparing data to values at month 1. Abbreviation: NS, not significant.

To further investigate the possible contribution of recipient immunization status, the frequency and titer of anti-HLA class I and class II antibodies were also examined (Supplementary Figure 2). Sustained BKPyV reactivation was associated in

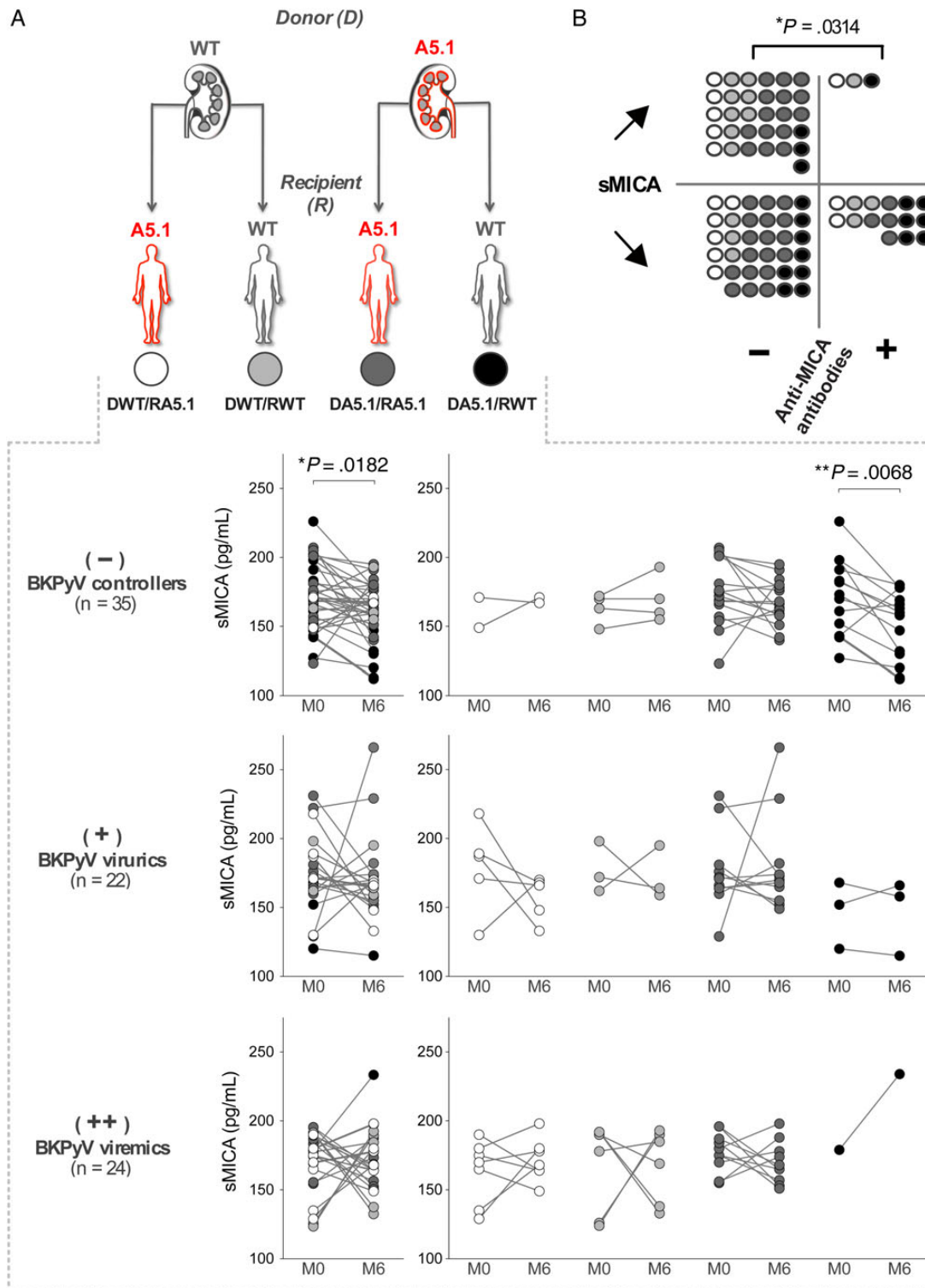
our cohort with a higher frequency of anti-HLA class I sensitization (69.22%) in comparison with mild (39.99%) or no (45.61%) virus reactivation ( $P = .0047$  and  $P = .0240$ , respectively). Although not statistically significant, a similar trend toward more anti-HLA class II sensitization associated with worse BKPyV evolution was also observed.

#### sMICA Levels Are Reduced in Transplant Recipients With No BKPyV Reactivation

A finely tuned balance between levels of sMICA and anti-MICA antibodies is critical for an effective control of tumors [28, 29]. Therefore, we wondered whether the increase in anti-MICA antibodies might be correlated with alterations in sMICA levels in kidney transplant recipients. Using ELISA, we quantified sMICA levels in plasma samples from kidney transplant recipients collected before (month 0) and 6 months after transplantation. Although roughly similar levels of sMICA were present in all patients at month 0 (mean levels, 171.7, 172.9, and 170.8 pg/mL for controller, viruric only, and viremic patients, respectively; Supplementary Figure 3), a significant decrease in sMICA levels was observed in the BKPyV controller group at month 6 after graft, compared with month 0 values ( $P = .0182$ ), whereas no significant changes were found in kidney transplant recipients with moderate or sustained virus reactivation (Figure 5A). Moreover, our data show that, among BKPyV controllers, the significant decrease in sMICA levels at month 6 was restricted to recipients in the DA5.1/RWT combination ( $P = .0068$ ). To further investigate the relationship between sMICA levels and anti-MICA immunity, we first distinguished patients with no variation or an increase of sMICA levels after transplantation from those with postgraft decreases in sMICA levels and then evaluated the proportion of patients with detectable anti-MICA antibodies (Figure 5B). Patients with anti-MICA were significantly predominant among the recipients, with a postgraft decrease in sMICA levels (15 of 50 [30%]), compared with recipients with increased or unchanged sMICA levels (3 of 32 [9.4%];  $P = .0314$ ), emphasizing a possible duality between anti-MICA antibodies and circulating sMICA that may contribute to the control of BKPyV reactivation.

#### DISCUSSION

Although a reduction in T-cell immunosuppression is effective to restore immune control of BKPyV replication, this approach must be balanced against the increased risk of kidney transplant rejection. Determination of the risk factors for BKPyV reactivation after transplantation is required to develop preventive measures against BKPyV-associated nephropathy and graft rejection. Our first question was to investigate the distribution of MICA proteins in the kidney, and our findings revealed strong expression of MICA in the kidney, with predominance in tubular epithelial cells, the natural cell target for BKPyV [30–32]. These data



**Figure 5.** Plasma levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A (sMICA) in transplant recipients. *A*, Plasma levels of sMICA were quantified at months 0 and 6 after transplantation, using a dedicated enzyme-linked immunosorbent assay, in BK polyomavirus (BKPvV) controller (–), viruric (+), and viremic (++) patients. Concentrations of sMICA according to donor/recipient mismatch are indicated. *B*, Comparison of variations in sMICA plasma levels between months 0 and 6 (“/,” increase; “\,” decrease), according to the MICA immunization status of the recipients (“–,” no immunization; “+,” immunization).

support the idea that allele-dependent changes in MICA structure in tubule epithelial cells may affect, via its interaction with

NKG2D, immune antiviral NK and T-cell responses [33] [34, 35], as well as antigrft immunity. We found that MICA also

polarizes on the apical side of tubule epithelium. Whether MICA polarization in renal tubular epithelial cells may change with respect to the *MICA* allele, such as *MICA\*008/A5.1*, and be involved in pathologies remains to be explored.

An important finding of this study was a higher prevalence of donors carrying at least 1 *MICA* A5.1 allele among transplant recipients with no BKPyV reactivation as compared to recipients with BKPyV viremia ( $P = .0148$ ), supporting the idea that *MICA* A5.1 could be a protective allele against BKPyV infection. Consistent with this hypothesis, the genotyping of donor/recipient pairs identified *MICA* A5.1 mismatch as a critical factor for BKPyV reactivation. Recipients carrying a WT *MICA* genotype transplanted with a kidney from a donor carrying the A5.1 *MICA* variant have a lower risk of reactivating BKPyV and developing BKPyV-associated nephropathy. In contrast, combinations involving a donor carrying a WT *MICA* genotype (DWT/RA5.1 and DWT/RWT) compose a high-risk group.

Only limited and still conflicting data are available on the role of HLA matching in the pathogenesis of BKPyV in transplant recipients [36–38]. Similarly the implication of individual HLA antigens in the course of BKPyV infection remains preliminary [39]. Interestingly, a protective role of the KIR3DS1 genotype in BKPyV was reported, which sustains the involvement of both NK cells and immunogenetics [34].

Confirming results of our previous study [16], in this cohort we observed that a DA5.1/RWT mismatch correlates with increased anti-MICA immunity in controllers. Our findings raise the interesting question of whether anti-MICA antibodies directed against donor MICA molecules expressed on tubule epithelial cells could be protective by eliminating infected cells. There are some possible explanations of the specific targeting of *MICA\*008/A5.1* on infected cells by antibodies. First, *MICA* A5.1 displays specific features that avoid its downregulation by viral proteins such as HCMV UL142 [17] and may similarly permit escape from regulation by BKPyV. Second, a minimal threshold could be required for antibody-mediated activation of complement or cell cytotoxicity, and it can be speculated that only *MICA* A5.1 reaches the level needed. Finally, another possibility is that *MICA* A5.1 is associated with changes in *MICA* polarization on tubular epithelial cells and unmasks epitopes for antibody binding and subsequent killing. Moreover, the early and transient presence of these antibodies in kidney transplant recipients (Figure 4D) may ensure a timely control of infection by preventing further BKPyV replication.

In contrast, sustained reactivation correlates with a higher prevalence of anti-HLA antibodies. It could be argued that HLA sensitization may promote humoral rejection and the subsequent implementation of immunosuppression creating conditions for BKPyV replication [40]. In contrast to anti-HLA, monitoring of the anti-MICA response is not routinely performed. Thus, early and transient MICA sensitization, as

observed in our cohort, should not, in contrary to HLA, induce changes in immunosuppressive regimen favoring virus replication.

A drop in sMICA level could be temporally linked to the rise in anti-MICA antibodies in the low-risk group of patients. Thus, another role for anti-MICA antibodies could be to neutralize circulating sMICA. In several tumors, sMICA is released by proteolysis that results in systemic downregulation of NKG2D on NK and CD8<sup>+</sup> T cells and evasion of immune recognition [28]. The level of sMICA has a diagnostic value in cancer [41]. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) also indirectly suppresses NK cell recognition of HIV-1-infected CD4<sup>+</sup> T cells by enhancing sMICA release [42, 43]. Thus, reduced sMICA levels in patients in whom BKPyV is not reactivated may help to maintain a sustained level of NKG2D activation required for virus control by NK and T cells [34, 35]. Although our findings suggest an association between sMICA and anti-MICA antibodies, further investigations are required to clarify whether immune complexes were formed in vivo and cleared from the circulation.

Our study has several limitations that should be considered for a balanced interpretation of the results. First, the investigation was done in a relatively small cohort, particularly when we considered the various combinations of donors and recipients. In addition, analysis of a nonrelated allele, as well as an investigation of the impact of the immunosuppressive regimen, might have helped validate the data.

To conclude, we propose *MICA* A5.1 D/R matching as a critical factor to consider to avoid BKPyV reactivation. Here, we identified the *MICA* A5.1 mutation as a good prognostic factor for BKPyV reactivation when carried by the transplant donor and particularly when the recipient does not carry the mutation. In contrast, combinations involving *MICA* WT donors were associated with severe BKPyV infection (based on a high viruria level and the presence of viremia) and BKPyV-associated nephropathy. Further basic and prospective clinical studies are needed to define whether selective matching between transplant donor and recipient could prevent BKPyV reactivation and BKPyV-associated nephropathy and to elucidate the molecular mechanisms involved.

### Supplementary Data

Supplementary materials are available at <http://jid.oxfordjournals.org>. Consisting of data provided by the author to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the author, so questions or comments should be addressed to the author.

### Notes

**Acknowledgments.** We thank the MicroPicell imaging core facility (Philippe Hulin and Steven Nedellec; SFR Santé F. Bonamy, University of Nantes) for confocal microscopy and data analysis.

P. T., N. G., P.-J. G., A. C.-G., C. B.-B., and B. C. conceived and designed the experiments. P. T., N. G., P.-J. G., S. M., and M.-L. C. performed the experiments. P. T., N. G., P.-J. G., A. C.-G., C. B.-B., B. C., and K. R. analyzed the data. S. M., A. C.-G., M. H., K. R., and C. B.-B. contributed reagents,

materials, and analysis tools. P. T., A. C.-G., C. B.-B., and B. C. wrote the paper.

**Disclaimer.** The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Financial support.** This work was supported by the IHU-Cesti, LabEx IGO, and LabEx Transplantex projects, which received French government financial support, managed by the National Research Agency, via Investment Into The Future programs ANR-10-IBHU-005, ANR-11-LABX-0016-01, and ANR-11-LABX-0070; Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region (support to the IHU-Cesti project); the Fondation Centaure (support to the French Transplantation Research Network); the Agence de la Biomédecine; and the IHU-Cesti (fellowship to P.-J. G.).

**Potential conflicts of interest.** All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

- Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* **2009**; 199:837–46.
- Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* **2005**; 41:354–60.
- Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* **1999**; 10:1080–9.
- Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, et al. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* **1999**; 67:103–9.
- Grinde B, Gayorfar M, Rinaldo CH. Impact of a polyomavirus (BKV) infection on mRNA expression in human endothelial cells. *Virus Res* **2007**; 123:86–94.
- Petrogiannis-Haliotis T, Sakoulas G, Kirby J, et al. BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient. *N Engl J Med* **2001**; 345:1250–5.
- Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* **2002**; 347:488–96.
- Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* **2007**; 357:1293–300.
- Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Baltar JM, Ortega F, Lopez-Larrea C. Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: new target for immunointervention. *Am J Transplant* **2009**; 9:251–7.
- Ogasawara K, Lanier LL. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol* **2005**; 25:534–40.
- El-Gazzar A, Groh V, Spies T. Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *J Immunol* **2013**; 191:1509–15.
- Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* **2001**; 22:378–85.
- Zou Y, Han M, Wang Z, Stastny P. MICA allele-level typing by sequence-based typing with computerized assignment of polymorphic sites and short tandem repeats within the transmembrane region. *Hum Immunol* **2006**; 67:145–51.
- Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, et al. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**; 99:2971–6.
- Ashiru O, Lopez-Cobo S, Fernandez-Messina L, et al. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA\*008. *Biochem J* **2013**; 454:295–302.
- Tonnerre P, Gerard N, Chatelais M, et al. MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* **2013**; 24:954–66.
- Ashiru O, Boutet P, Fernandez-Messina L, et al. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA\*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* **2010**; 70:481–9.
- Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S. MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* **1999**; 49:557–60.
- Zhang Y, Lazarro AM, Lavingia B, Stastny P. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol* **2001**; 62:620–31.
- Chalupny NJ, Rein-Weston A, Dosch S, Cosman D. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**; 346:175–81.
- Hirsch HH, Randhawa P; AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* **2013**; 13(Suppl 4): 179–88.
- Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebillé V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant* **2005**; 5:1926–33.
- Tonnerre P, Gerard N, Chatelais M, Charreau B. MICA gene polymorphism in kidney allografts and possible impact of functionally relevant variants. *Transplant Proc* **2010**; 42:4318–21.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **2012**; 9:676–82.
- Hankey KG, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* **2002**; 73:304–6.
- Babel N, Volk HD, Reinke P. BK polyomavirus infection and nephropathy: the virus-immune system interplay. *Nat Rev Nephrol* **2011**; 7:399–406.
- Saundh BK, Baker R, Harris M, Welberry Smith MP, Cherukuri A, Hale A. Early BK polyomavirus (BKV) reactivation in donor kidney is a risk factor for development of BKV-associated nephropathy. *J Infect Dis* **2013**; 207:137–41.
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **2002**; 419:734–8.
- Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, et al. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105:1285–90.
- Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol* **2009**; 83:1350–8.
- Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology* **2013**; 437:63–72.
- Low J, Humes HD, Szczypka M, Imperiale M. BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro. *Virology* **2004**; 323:182–8.
- Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant* **2007**; 7:2727–35.
- Trydzenskaya H, Juerchott K, Lachmann N, et al. The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients. *Kidney Int* **2013**; 84:359–65.
- Cioni M, Leboeuf C, Comoli P, Ginevri F, Hirsch HH. Characterization of immunodominant BK polyomavirus 9mer-Epitope T-cell responses. *Am J Transplant* **2016**; 16:1193–206.
- Masutani K, Ninomiya T, Randhawa P. HLA-A2, HLA-B44 and HLA-DR15 are associated with lower risk of BK viremia. *Nephrol Dial Transplant* **2013**; 28:3119–26.
- Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* **2002**; 13:2145–51.
- Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Mann D, Hirsch HH, Wali R, Ramos E. Negative impact of human leukocyte antigen matching in the outcome of polyomavirus nephropathy. *Transplantation* **2005**; 80:276–8.
- Bohl DL, Storch GA, Ryschewitsch C, et al. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant* **2005**; 5:2213–21.
- Hirsch HH, Randhawa P. BK virus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* **2009**; 9(suppl 4):S136–46.
- Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* **2006**; 118:684–7.
- Nolting A, Dugast AS, Rihn S, et al. MHC class I chain-related protein A shedding in chronic HIV-1 infection is associated with profound NK cell dysfunction. *Virology* **2010**; 406:12–20.
- Matusali G, Tchidjou HK, Pontrelli G, et al. Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells. *FASEB J* **2013**; 27:2440–50.



# Thèse de Doctorat

Simon MAZALREY

## Facteurs de pathogénèse au cours des infections à virus BK : Polymorphisme génétique viral et réponse immunitaire antivirale

Factors involved in the pathogenesis of BK polyomavirus infections after renal transplantation: genetic polymorphism of the viral genome, antiviral immunity

### Résumé

Le *polyomavirus* BK (ou BKPyV) est un virus ubiquitaire qui infecte plus de 80% de la population adulte. Asymptomatique chez le sujet immunocompétent, il peut être la cause de cystites hémorragiques chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques ou de néphropathies interstitielles après transplantation rénale. Parmi les facteurs de risques impliqués dans le développement des néphropathies à BKPyV, nous nous sommes intéressés à l'étude de la variabilité de la région régulatrice non codante (NCCR) du génome viral et à la réponse immunitaire cellulaire spécifique anti-BKPyV en post-greffe. La région NCCR du *BKPyV* est caractérisée par l'apparition de réarrangements (rrNCCR) chez certains patients présentant une virémie intense et prolongée. Ces réarrangements sont également observés *in vitro* au cours de la multiplication virale sur cellules permissives. Dans le but de caractériser les rrNCCR et d'étudier leur impact sur la réplication virale, nous avons étudié l'émergence de ces réarrangements *in vitro* et *in vivo* sur des échantillons cliniques d'une cohorte de transplantés du rein du CHU de Nantes. Par ailleurs, nous avons étudié la réponse spécifique anti-BKPyV dans les premiers mois post-greffe dans une cohorte prospective de patients adultes transplantés de rein. Nos résultats montrent une augmentation du taux des anticorps au cours de l'infection, et l'absence de valeur prédictive de la réponse médiée par les lymphocytes T sur la survenue d'une infection active à BKPyV. L'ensemble de ces résultats contribue à une meilleure compréhension des mécanismes en jeu au cours des infections à BKPyV en transplantation rénale.

### Mots clés

**BK Polyomavirus**  
**Polymorphisme génétique**  
**Immunité anti-virale**  
**Transplantation rénale**

### Abstract

The BK polyomavirus is ubiquitous and infects the majority of the adult population. It is not associated with any specific disease in immunocompetent individuals, but can be responsible for hemorrhagic cystitis after stem cell transplantation or interstitial nephropathy after kidney transplantation. Among the different risk factors involved in the development of such opportunistic diseases, we focused on the genetic polymorphism of the non coding control region of the viral genome (NCCR) and on the specific immune responses directed against BKPyV after kidney transplantation. The NCCR region is characterized by the emergence of rearrangements *in vitro* on permissive cells, and *in vivo* in case of prolonged infection and high viral loads. We described the emergence of such rearranged strains *in vitro*, correlated them with increased viral replication and transcription, and compared these sequences with clinical strains obtained from kidney transplanted patients. Our second objective was to study the specific immune responses in the first months following kidney transplantation. We showed that the active infection was associated with an increase in the anti-BKPyV IgG levels, and that the detection of a CD4+ or CD8+ mediated response was not predictive of a protection toward viral reactivation. Our results contribute to a better understanding of the different factors involved in the pathogenesis of BKPyV infections.

### Key Words

**BK Polyomavirus**  
**Genetic polymorphism**  
**Antiviral immunity**  
**Renal transplantaion**