

UNIVERSITE DE NANTES

MENTION TRES HONORABLE

FACULTE DE MEDECINE

avec félicitations du jury  
et proposition au prix de thèses

Année 2003

N° SP06/03

THESE

pour le

DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en médecine spécialisée: Biologie Médicale

Par

Céline Bodin-Bressollette

Née le 20 Juillet 1973 à Rennes

Présentée et soutenue publiquement le 1er Avril 2003

DEVELOPPEMENT D'UNE PCR EN TEMPS REEL POUR

LA QUANTIFICATION DU BK VIRUS.

APPLICATION AU SUIVI D'UNE COHORTE DE

TRANSPLANTES RENAUDIN.

**Président:** Pr M. HOURMANT  
**Directeur de thèse:** Dr M. COSTE-BUREL  
**Membres du jury:** Pr S. BILLAUDEL  
Pr B.M. IMBERT  
Dr K. RENAUDIN

ABREVIATIONS.....	6
INTRODUCTION.....	7
<b>I. GENERALITES.....</b>	<b>10</b>
A. LE BK VIRUS.....	10
1. <i>Historique, classification</i> .....	10
2. <i>Structure de la particule virale</i> .....	12
a) Structure de la capside.....	12
b) Organisation du génome viral.....	12
3. <i>Cycle de réplication</i> .....	15
a) Adsorption, récepteurs.....	16
b) Entrée du virion, décapsidation.....	16
c) Transcription-processing des ARNm précoces.....	17
d) Synthèse et fonction des protéines précoces.....	17
e) Réplication de l'ADN viral.....	20
f) Expression des gènes viraux tardifs.....	21
g) Assemblage et libération des nouveaux virions.....	22
4. <i>Pathogenèse</i> .....	22
a) Primo-infection, latence et réactivation.....	22
b) Variabilité génétique.....	27
c) Oncogénicité.....	27
5. <i>Epidémiologie et transmission</i> .....	31
6. <i>Manifestations cliniques liées au BK virus</i> .....	32
a) Primo-infection.....	32
b) BK virus et cancer.....	32
c) BK virus et maladies auto immunes.....	33

.....

.....

d) Pathologies liées à une réactivation .....	33
B. LA NÉPHROPATHIE À BK VIRUS EN TRANSPLANTATION RENALE.....	35
1. <i>Epidémiologie</i> .....	35
2. <i>Signes cliniques</i> .....	35
3. <i>Facteurs de risque</i> .....	36
4. <i>Diagnostic biologique</i> .....	37
a) Diagnostic histologique .....	37
b) Diagnostic virologique.....	41
5. <i>Traitement</i> .....	45
C. QUANTIFICATION EN VIROLOGIE.....	47
1. <i>Les différentes techniques de quantification</i> .....	47
2. <i>La PCR en temps réel</i> .....	50
a) Principes généraux.....	50
b) Les techniques de marquage .....	50
3. <i>Construction d'un standard</i> .....	54
a) Différents types de standard.....	54
b) Principe de clonage d'un vecteur.....	55
<b>II. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>56</b>
A. MATÉRIEL .....	56
1. <i>Patients</i> .....	56
2. <i>Prélèvements biologiques</i> .....	56
3. <i>Amorces et sondes utilisées pour la PCR temps réel</i> .....	57
4. <i>Thermocycleur</i> .....	58
5. <i>Témoins positifs</i> .....	58
6. <i>Contrôle interne</i> .....	58

7.	<i>Composants du mélange réactionnel pour la PCR</i> .....	58
8.	<i>Vecteur pGEM-T Easy</i> .....	59
B.	<b>MÉTHODES</b> .....	60
1.	<i>Extraction des acides nucléiques</i> .....	60
2.	<i>Amplification par PCR</i> .....	60
3.	<i>Interprétation des résultats de la PCR</i> .....	61
4.	<i>Construction d'un plasmide</i> .....	62
a)	<i>Purification des produits PCR</i> .....	62
b)	<i>Clonage dans pGEM-T easy</i> .....	62
c)	<i>Vérification du résultat</i> .....	64
5.	<i>Analyse statistique</i> .....	65
	<b>ANNEXES</b> .....	67
	QIAAMP VIRAL RNA MINI KIT.....	67
	COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISÉES LORS DU CLONAGE.....	68
<b>III.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	69
A.	<b>MISE AU POINT DES CONDITIONS DE LA PCR EN TEMPS RÉEL</b> .....	69
1.	<i>Concentration en Taq Polymérase</i> .....	69
2.	<i>Concentration en MgCl<sub>2</sub> et température d'hybridation</i> .....	70
3.	<i>Spécificité</i> .....	72
4.	<i>Conditions définitives de la PCR en temps réel</i> .....	72
B.	<b>VALIDATION DE LA QUANTIFICATION PAR PCR TEMPS RÉEL</b> .....	73
1.	<i>Préparation de la gamme standard</i> .....	73
2.	<i>Résultats de l'amplification de la gamme standard</i> .....	75
3.	<i>Critères de validation de la quantification</i> .....	76
a)	<i>Sensibilité</i> .....	76

b) Reproductibilité .....	76
c) Répétabilité.....	77
C. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS.....	77
1. <i>Comparaison de deux techniques d'extraction</i> .....	77
2. <i>Détermination du seuil de quantification en fonction de la nature du prélèvement</i>	78
3. <i>Interprétation des résultats</i> .....	79
D. RESULTATS OBTENUS AU COURS DU SUIVI LONGITUDINAL DES PATIENTS.....	81
1. <i>Caractéristiques générales de la population étudiée</i> .....	81
2. <i>Données virologiques</i> .....	82
a) Analyse globale des résultats .....	82
b) Distribution des résultats en fonction du délai post transplantation .....	84
c) Relation virurie / virémie.....	87
3. <i>Analyse restreinte au groupe suivi pendant au moins 3 mois</i> .....	89
a) Caractéristiques générales.....	89
b) Traitement immunosuppresseur.....	90
c) Co infections virales .....	91
d) Rejet cellulaire.....	91
e) Complications infectieuses ou urologiques.....	91
f) Charge virale et créatininémie .....	92
g) Recherche de Decoy cells .....	93
4. <i>Cas cliniques</i> .....	96
a) Exemple d'une infection active à BK virus chez une patiente suivie sur un an au cours de l'étude.....	96
b) Suivi de néphropathie à BK virus: analyse retrospective de 4 cas.....	97
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>100</b>

---

<b>CONCLUSION.....</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>110</b>

P.H. Ganté  
Hauts

## ABREVIATIONS

- a.a: acide aminé
- ADN: acide desoxyribonucléique
- Ag: antigène
- ARNm: acide ribonucléique messager
- ATP: acide triphosphate
- cdk: cyclin dépendant kinase
- CMV: cytomégalovirus
- CO<sub>2</sub>: dioxyde de carbone
- dNTP: désoxynucléotides triphosphates (dUTP, dTTP, dATP, dCTP, dGTP)
- EBV: Epstein Barr Virus
- ECP: Effet cytopathogène
- EDTA: Ethylène diamine tétraacétique
- HHV: human herpes virus
- HSV: herpès simplex virus
- Ig: Immunoglobuline
- ISH: In Situ Hybridization
- MgCl<sub>2</sub>: chlorure de magnésium
- ml: millilitre
- NCCR: Non Control Coding Region
- ORI: origine de réplication
- pb: paire de base
- PBS: Phosphate Buffer Saline
- PCNA: Antigène Nucléaire de Prolifération Cellulaire
- PCR: Polymérase Chain Reaction
- pRb: protéine du rétinoblastome
- SAL: Sérum Anti-Lymphocytaire
- SV40: Simian Virus 40
- TBP: TATA box binding protein
- TCR: Transcription Control region
- VZV: varicella zona virus
- µl: microlitre

---

## INTRODUCTION

Le BK virus est un membre de la famille des *polyomaviridae*. Il s'agit de petits virus à ADN, cytolitiques, capables de persister à l'état latent dans certaines cellules de l'organisme. Ils sont caractérisés par une spécificité d'hôte étroite. Deux d'entre eux sont strictement humains: le BK et le JC virus.

Leur cycle de réplication a entièrement lieu dans le noyau cellulaire. En raison de la petite taille de leur génome, ils ont une faible capacité de codage et dépendent donc entièrement de la machinerie cellulaire pour leur multiplication. A ce titre, ils ont permis d'élucider certains des mécanismes du fonctionnement eucaryote, notamment ceux de la régulation de la transcription, du phénomène d'épissage alternatif, de la structure super enroulée de l'ADN au sein du chromosome des cellules eucaryotes.

Leur implication en pathologie humaine est de reconnaissance assez récente car essentiellement liée à des états d'immunosuppression dont la fréquence de prise en charge s'est accrue depuis l'épidémie de SIDA et l'utilisation de thérapeutiques fortement immunosuppressives en transplantation d'organes et greffes de moelle. En effet, malgré une séroprévalence élevée dans la population générale, les polyomavirus humains (BK et JC virus) ne s'expriment que rarement cliniquement chez les sujets immunocompétents. La primo-infection a lieu dans l'enfance et est le plus souvent asymptomatique. Le virus reste ensuite latent dans certaines cellules de l'organisme, majoritairement dans l'épithélium urinaire et les cellules mononucléées circulantes. Les mécanismes de la latence virale sont encore mal connus, et peuvent donner lieu à des épisodes de réactivation.

A l'occasion d'un état d'immunosuppression cellulaire, la réactivation du virus peut être à l'origine d'une excrétion urinaire, ainsi que d'une virémie. Deux mécanismes peuvent expliquer la présence du virus dans le sang: il peut s'agir soit d'une augmentation de la

---

réplication dans les leucocytes circulants, soit d'un passage de l'épithélium urinaire vers le sang à travers les capillaires péri tubulaires.

Dans les suites d'une transplantation rénale, la réactivation du BK virus est très fréquente (jusqu'à 40%), liée à la présence du virus à l'état latent dans les cellules épithéliales tubulaires, et objectivée par la mise en évidence du virus dans les urines. Cette réactivation peut se compliquer d'une néphropathie tubulo-interstitielle dans 5% des cas. Depuis quelques années, plusieurs centres de transplantation ont observé une augmentation du nombre de cas de néphropathies à BK virus chez les transplantés rénaux. La gravité potentielle de cette infection ainsi que la pauvreté des signes d'appel cliniques ont motivé la recherche d'éventuels facteurs de risque de survenue d'une telle pathologie.

Le diagnostic de néphropathie à BK virus repose essentiellement sur les signes histologiques et les techniques d'immuno-histochimie sur la biopsie rénale. La sérologie virale n'a que peu d'intérêt en raison de la séroprévalence élevée. Les techniques de culture cellulaire ne sont pas adaptées au diagnostic rapide. La nécessité de disposer de techniques non invasives participant au diagnostic biologique et permettant le suivi des patients infectés a conduit au développement de techniques plus sensibles et plus rapides de biologie moléculaire, et en particulier à celles de mesure de la charge virale.

Afin d'évaluer l'intérêt du suivi des transplantés rénaux par la mesure des charges virales plasmatiques et urinaires, nous avons développé une technique de PCR en temps réel permettant une détection sensible, spécifique et rapide du génome viral dans le sang et les urines. La construction d'un standard plasmidique a permis la mise au point de la quantification du BK virus dans ces prélèvements. Dans le cadre d'une collaboration avec l'unité de transplantation du CHU de Nantes, nous avons surveillé de façon prospective une cohorte de patients transplantés au cours de l'année 2002. Nous avons également mesuré rétrospectivement les charges virales de quatre patients ayant développé une néphropathie à

---

BK virus. Ce travail nous a permis d'évaluer de façon préliminaire la fréquence de survenue de la réactivation du BK virus dans cette population, de mesurer quantitativement cette réactivation, et de rechercher une relation éventuelle entre la positivité de l'ADNémie et/ou de l'ADNurie et les traitements immunosuppresseurs utilisés en post greffe, la fonction rénale et la survenue de complications immunologiques (rejet), infectieuses, ou urologiques.

---

# I. GENERALITES

## A. LE BK VIRUS

### 1. *Historique, classification*

Le BK virus fut isolé pour la première fois en 1971, sur des cultures de cellules de rein de singe inoculées avec les urines d'un patient transplanté rénal ayant développé une sténose urétérale (1). Ce virus n'avait alors jamais été impliqué en pathologie humaine. La même année, le JC virus, identifié depuis comme responsable de la leucoencéphalite multifocale progressive (LEMP), fut isolé à partir du cerveau d'un patient atteint par ailleurs d'une maladie de Hodgkin (2). Le Simian Virus 40, isolé à l'origine chez des singes originaires d'Asie, avait été découvert plus tôt. Des millions d'américains y ont été exposés entre 1955 et 1961, suite à la contamination de cultures cellulaires de rein de singe servant à la préparation de vaccin contre la poliomyélite (3, 4).

Ces trois virus appartiennent à la famille des *Polyomaviridae*, qui a longtemps été considérée comme un sous-groupe des *Papovaviridae*, auquel appartenait également les papillomavirus. Depuis 2000, ils sont désormais considérés comme une famille virale indépendante. Douze virus sont actuellement classés au sein de cette famille (tableau 1). Leur distribution dans la nature est large (homme, singe, rongeurs,...), par contre ils sont caractérisés par une étroite spécificité d'espèce. Le BK et le JC virus présentent 72% d'homologie de séquence entre eux, et chacun 70 % avec le SV40.

Tableau 1: Hôtes d'origine et caractéristiques des *Polyomaviridae*. (D'après E. O. Major (5))

Hôte	Virus	Caractéristiques
homme	BK virus	cystite hémorragique néphropathie tubulo-interstitielle
	JC virus	agent de la LEMP
singe	Simian virus 40	singe d'Asie persiste dans l'épithélium rénal LEMP du singe immunodéprimé
	Simian agent 12	babouin d'Afrique
	papovavirus lymphotrope	singe vert Africain persiste dans les Ly B
bovin	Polyoma virus bovin	infection fréquente du bétail site de latence probable = rein
lapin	Virus vacuolisant du rein de lapin	
souris	polyoma virus murin	souris sauvages ou en laboratoire latence rénale
	K virus	atteinte de l'endothélium pulmonaire
hamster	papovavirus du hamster	tumeurs cutanées
rat	polyomavirus du rat	atteinte des glandes parotides
perruche	virus de la maladie du bec de la perruche	infection fatale

## 2. *Structure de la particule virale*

Les *polyomaviridae* sont de petits virus nus, dont le génome est un ADN bicaténaire circulaire super enroulé d'environ 5000 paires de base (pb), entouré d'une capsidie icosaédrique de 45 à 50 nm de diamètre. La particule virale est constituée à 88 % de protéines et à 12 % d'ADN. En raison de l'absence d'enveloppe, les polyomavirus sont résistants aux solvants, et de façon plus relative à l'inactivation par la chaleur. La résistance à la dessiccation favorise leur survie en milieu extérieur.

Trois types de particules virales peuvent être observées: des particules infectieuses complètes contenant l'ADN viral complexé avec les protéines histones, des capsides vides, ou des "pseudo-virions" contenant de l'ADN cellulaire.

### a) Structure de la capsidie

La capsidie virale est composée de trois protéines appelées VP1, VP2, VP3, assemblées entre elles de façon à former un icosaèdre (T=7) contenant 360 molécules de VP1, et 30 à 60 molécules de VP2 et de VP3. Chaque virus est constitué de 72 capsomères pentamériques contenant chacun cinq molécules de VP1 et une molécule de VP2 ou de VP3. Les molécules de VP1 peuvent en fait s'assembler entre elles pour former des capsides vides. La capsidie contient la molécule d'ADN complexée avec des protéines histones cellulaires H2A, H2B, H3 et H4, l'ensemble formant une structure de type chromatinién évoquant un mini-chromosome.

### b) Organisation du génome viral

L'étude du génome des *polyomaviridae*, en particulier de celui du SV40, a permis des avancées importantes dans le domaine de la biologie moléculaire chez les cellules eucaryotes. Ils constituent en effet un excellent modèle pour l'étude de la structure super enroulée de l'ADN, la compréhension de l'organisation et du fonctionnement des promoteurs impliqués

---

dans la régulation de la transcription. Le génome viral est organisé de façon à contenir le maximum d'informations (six gènes) dans un minimum d'espace (5 Kb), par un mécanisme de transcription appelé épissage alternatif. Le génome du BK virus peut être divisé en trois régions: régulatrice, "précoce", et "tardive".

La région régulatrice, non codante, est appelée également NCCR ( Non Coding Control Region) ou TCR (Transcription Control Region). Elle constitue le facteur déterminant la spécificité d'hôte de chacun des membres de la famille. En ce qui concerne le BK virus, elle est composée de:

- une origine de répllication unique, commune aux gènes précoces et tardifs. Elle mesure 142 pb. Sa structure générale est commune à tous les *polyomaviridae*: elle est composée d'une séquence inversée répétée de 14 pb, une séquence palindrome riche en GC au centre de 23-24 pb, et une séquence riche en AT de type "TATA box like", boîte d'initiation de la transcription de 15-20 pb. Le BK virus, comme le SV40 et le JC virus, possède également une séquence palindrome supplémentaire.
- les promoteurs des gènes précoces et tardifs
- une région "enhancer", ou région activatrice, constituée de trois séquences répétées de 68 pb, celle du milieu présentant une délétion de 18 pb. Ce type de séquence activatrice est caractérisé par sa capacité à agir sur les promoteurs indépendamment de leur orientation ou de leur position. Les trois blocs sont appelés P (68 pb) - Q (39 pb) - R (63 pb). Ils contiennent des motifs consensus qui sont des sites de fixation pour les facteurs de transcription cellulaires. On distingue ainsi une séquence cis-régulatrice CRE (cAMP responsive element) au niveau de P, une région riche en GC (GC box), site de fixation du facteur transrégulateur Sp1 à la jonction P-Q, et trois sites NF1 (P,Q,R) (6).

La région NCCR est susceptible de subir des modifications à type d'insertions - délétions, permettant de distinguer les souches natives "archétypes", des souches modifiées "variants". (figure 1)(6, 7)

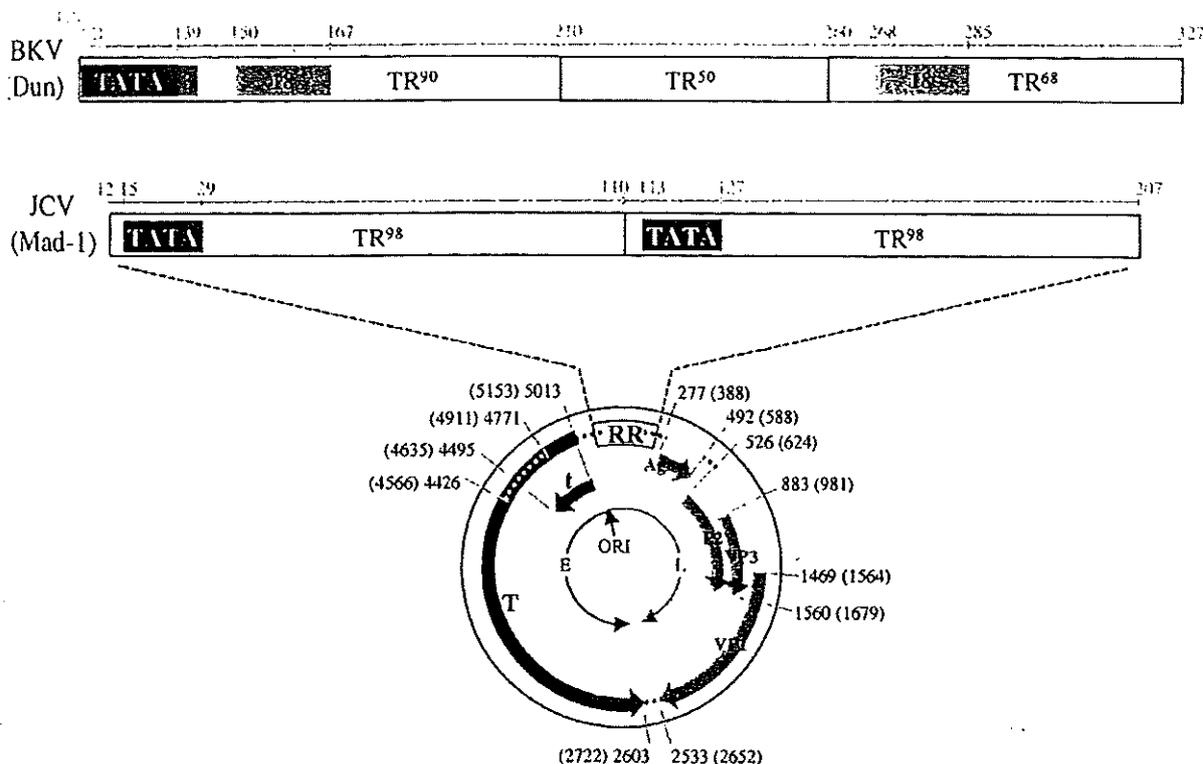


Figure 1: Détail de la région régulatrice non codante (RR) des souches de référence Dunlop du BK virus et Mad-1 du JC virus. Y sont représentés les séquences répétées TR et la boîte d'initiation de la transcription "TATA like". L'organisation générale du génome circulaire est représentée dessous. L'origine de réplication ORI est le point de séparation entre la région précoce E qui code pour les protéines Large T et small t antigén et la région tardive qui code pour les protéines de capsid VP1, VP2, VP3 et l'agnoprotéine (Agno). (d'après Cole (3))

La région précoce est la portion du génome transcrite et exprimée dès l'entrée du virus dans la cellule, et son expression persiste tardivement après l'infection, y compris après la réplication du génome viral par l'ADN polymérase cellulaire. Les gènes précoces codent pour deux protéines de régulation Large T Antigen et small t antigén. Ils partagent la même extrémité amino-terminale et se distinguent par leur partie carboxy-terminale. Deux ARN messager sont produit par épissage alternatif d'un ARN pré-messager commun.

La région tardive est la portion du génome traduite après l'étape de réplication génomique. Elle code pour les protéines de capsid VP1, VP2, et VP3, et pour une protéine appelée agnoprotéine. Les gènes de VP2 et VP3 se chevauchent, VP2 contenant la séquence complète de VP3 à son extrémité amino-terminale. Les ARN messagers de ces différentes protéines sont également issus de l'épissage alternatif d'un ARN pré-messager commun.

### 3. Cycle de réplication

Le modèle proposé pour le cycle de réplication du BK virus s'inspire fortement des données connues pour le SV40(3). Les polyomavirus diffèrent des autres virus car l'endocytose, le transport des virions au noyau et la décapsidation ne requièrent à aucun moment la participation de lysosomes. En raison de la petite taille de son génome et du faible nombre de protéines pour lesquelles il code, le BK virus dépend entièrement de la machinerie cellulaire pour les étapes de transcription et de réplication.

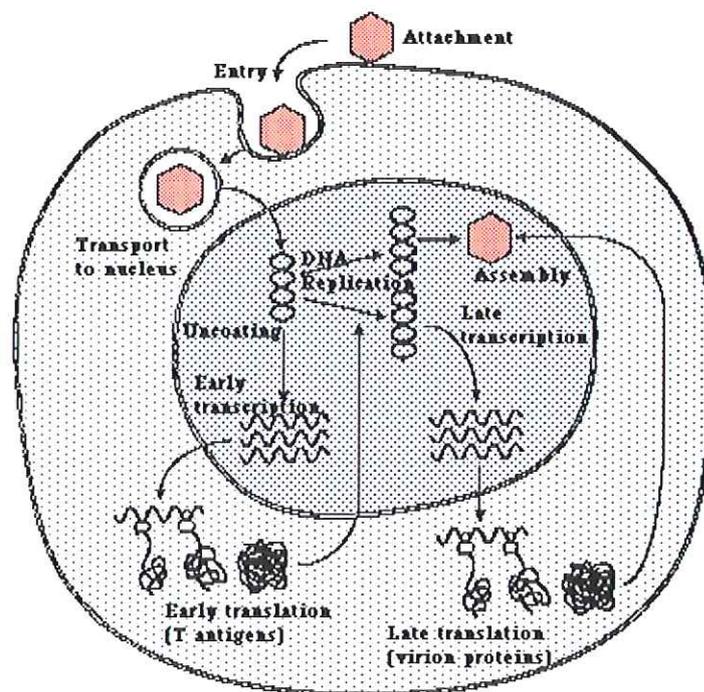


Figure 2: Cycle de réplication des *Polyomaviridae*. Après l'entrée dans la cellule, le virion est transporté directement jusqu'au noyau dans des vacuoles de pinocytose. Le cycle de réplication est ensuite entièrement intranucléaire.

### a) Adsorption, récepteurs

Les récepteurs cellulaires aux *polyomaviridae* ne sont pour l'instant pas bien connus. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, en association à des co-récepteurs non encore identifiés, sont impliqués dans l'entrée du SV40 au sein de la cellule cible. Les récepteurs pour le JC et le BK virus semblent cependant différents. L'inhibition de l'entrée des BK et JC virus après traitement par la neuraminidase, ainsi que leur capacité à agglutiner les globules rouges de type O, suggèrent la présence de glycoprotéines contenant de l'acide sialique au sein du récepteur. D'autres études évoquent la participation de phospholipides.

D'autre part, les anticorps anti-VP1 bloquent l'entrée des virions dans les cellules. Six isoformes de VP1, correspondant à des modifications post-transcriptionnelles, ont été identifiées par isoélectrofocalisation (A à F). Les capsides vides, qui ne possèdent pas l'isoforme E, ne s'adsorbent pas à la surface des cellules. Par ailleurs, VP2 et VP3 sont myristylées et pourraient interagir avec la membrane cellulaire pour faciliter l'entrée du virion. Les protéines de capsid jouent donc un rôle important dans l'adsorption des particules virales à la surface des cellules cibles.

### b) Entrée du virion, décapsidation

Peu de temps après l'infection, les particules virales observées en microscopie électronique sont repérées dans des vacuoles de pinocytose. Ces vésicules peuvent contenir un ou plusieurs virions. La protéine de capsid VP1 contient des signaux de localisation intranucléaires, ce qui permet la migration des vésicules jusqu'au noyau où leur membrane fusionne avec la membrane nucléaire externe. Le complexe protéique du pore nucléaire semble être une des voies d'entrée des virions, mais pas la seule. Le réticulum endoplasmique pourrait également être une des voies d'accès du virus au noyau. La décapsidation n'a sans

doute lieu qu'à l'intérieur du noyau, comme le suggère la détection de virions entiers avant celle du Large T Ag.

### c) Transcription-processing des ARNm précoces

Le mini-chromosome viral, libéré dans l'espace nucléaire, sert de matrice pour la transcription par l'ARN polymérase II cellulaire, aboutissant à la production des ARN messagers viraux précoces. Ces derniers sont produits à bas niveau, ils représentent 0,01 à 0,02% du total des ARN produits par la cellule avant l'étape de réplication virale. Le modèle d'étude de la transcription dans la famille des *polyomaviridae* est le SV40, qui a de plus permis la compréhension des mécanismes de régulation de la transcription chez les cellules eucaryotes. La transcription s'étend de façon bidirectionnelle à partir de sites d'initiation situés près de l'origine de réplication: la transcription des ARNm précoces se fait sur un des deux brins, dans un sens et celle des ARNm tardifs se fait sur l'autre brin, dans la direction opposée. Deux ARN messagers précoces sont obtenus par épissage alternatif à partir d'un pré ARNm commun. Le Large T Ag est produit en beaucoup plus grande quantité que le small t Ag, le ratio entre les deux varie en fonction des lignées cellulaires infectées.

La transcription précoce est autorégulée par la liaison du Large T Ag à l'ADN viral. Sa fixation bloque l'assemblage du complexe de transcription au site d'initiation, et inhibe la transcription précoce. Ceci permet par ailleurs de libérer les éléments intervenant dans la transcription tardive.

### d) Synthèse et fonction des protéines précoces

#### (1) Large T antigen

Le Large T Ag est exprimé de façon prédominante dans le noyau cellulaire. Il s'agit d'une protéine multifonctionnelle complexe de 695 acides aminés (a.a). L'homologie de séquence est de l'ordre de 70 % entre le BK virus et le SV40. Seuls les 70 a.a de l'extrémité carboxy-

---

terminale des Large T Ag sont spécifiques d'espèce. L'organisation fonctionnelle de la protéine est par ailleurs très proche entre les différents membres de la famille.

L'étude de la séquence du Large T Ag du SV40 a permis d'identifier le premier signal de localisation intranucléaire (motif 127-PKKKRKV-133).

Il peut être divisé en trois régions:

- La première est un homologue du domaine J des molécules chaperonnes de l'ADN appelées DnaJ. Ce domaine joue un rôle important dans l'assemblage du virion, la réplication de l'ADN, le contrôle transcriptionnel.
- La deuxième région contient la séquence consensus LCXCXE, qui permet la liaison aux protéines de la famille des suppresseurs de tumeurs pRB.
- La troisième contient le site de fixation à la protéine p53.

Le Large T Ag subit des modifications post traductionnelles multiples: phosphorylation, acylation, adénylation, O-glycosylation, poly (ADP)-ribosylation.

Plus de 95% du Large T Ag est intranucléaire, libre ou associé à la chromatine et/ou à la matrice nucléaire. Les fonctions de cette protéine sont multiples:

- **protéine de liaison à l'ADN:** le Large T Ag interagit spécifiquement avec des séquences pentamériques (GAGGC), au niveau de l'origine de réplication du génome viral. La liaison au site I entraîne l'autorégulation de la production des ARNm précoces, et la liaison au site II joue un rôle dans l'initiation de la réplication de l'ADN viral.
- **activité hélicase:** permet de dérouler la double hélice d'ADN en supprimant les liaisons hydrogène qui unissent les bases complémentaires. Il s'agit d'une action catalytique qui nécessite la présence d'ATP.
- **formation de complexes avec l'ADN polymérase  $\alpha$ , ainsi qu'avec la RPA ( protéine déstabilisant l'hélice), impliqués dans la réplication de l'ADN.**

- formation de complexes avec des protéines impliquées dans la **régulation de la croissance cellulaire**: suppresseur de tumeur p105Rb, p107, p130, p53 (surtout décrit pour le SV40). Le rôle du Large T Ag dans la transformation cellulaire sera développé plus loin (paragraphe I4a).
- interactions avec des facteurs de transcription cellulaires: TATA box binding protéine TBP, Sp1, AP-2, TEF-1.

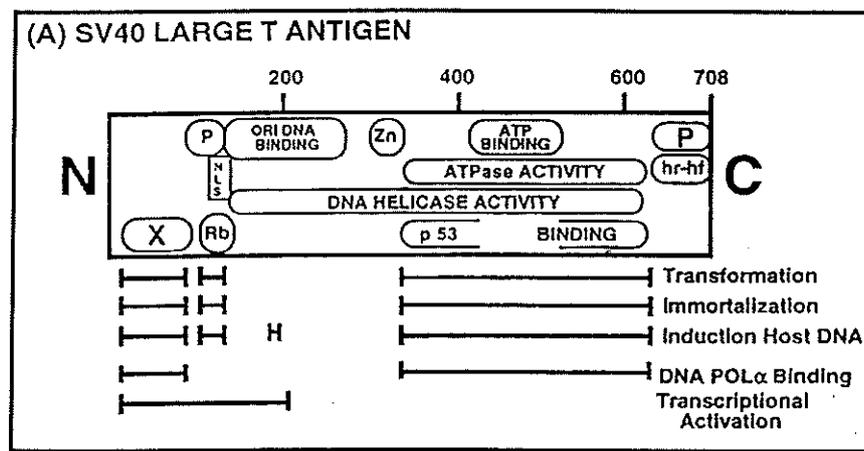


Figure 3: Détail des domaines correspondant aux différentes fonctions du Large T Ag du SV40 de la partie amino terminale N à la partie carboxy terminale C (3).

### (2) small t antigen

Il s'agit d'une protéine riche en cystéine, de 172 a.a pour le BK virus. Ses 82 derniers a.a, dans la partie amino-terminale, sont communs avec le Large T Ag car issus de l'épissage alternatif d'un ARN pré-messager commun. Moins bien connu, il semble avoir des fonctions multiples au cours du cycle de réplication et des interactions avec la cellule cible. Il s'associe avec deux sous-unités de la protéine phosphatase 2A (PP2A), ce qui inactive les protéines kinases ERK1 et MEK1 et favorise ainsi la progression dans le cycle cellulaire.

### e) Réplication de l'ADN viral

Dès la détection du Large T Ag dans les cellules, une augmentation de la production des enzymes cellulaires est observée, reflet de la capacité du Large T Ag à stimuler l'expression de promoteurs viraux et cellulaires, entraînant l'entrée en cycle de la cellule et la réplication de l'ADN. Les éléments nécessaires à la réplication sont: une origine de réplication fonctionnelle, la présence du Large T Ag et des protéines cellulaires impliquées dans la synthèse de l'ADN.

L'initiation de la réplication, en présence d'ATP, est caractérisée par un changement conformationnel du Large T Ag au site II de liaison à l'ADN: la formation d'un double hexamère autour de l'ADN entraîne l'ouverture et le déroulement d'une partie du palindrome de départ. Lorsque la région ORI est déroulée, le Large T Ag se détache de l'ADN et s'associe avec la RPA (il s'agit d'une "single strand binding protein", qui se fixe sur chacune des chaînes de l'hélice parentale et stabilise les brins d'ADN monocaténares, empêchant le réappariement et le repliement par self complémentation). Le complexe de "pré-initiation" ainsi formé par la région ORI, le Large T Ag et la RPA s'associe à l'ADN polymérase  $\alpha$ , à l'origine de la spécificité d'espèce, pour former le complexe d'initiation. La réplication est bidirectionnelle de part et d'autre de l'origine de réplication et l'avancée de la fourche de réplication est facilitée par l'activité hélicase du Large T Ag qui se déplace le long de l'ADN. Le facteur de réplication cellulaire C se lie à l'extrémité 3' des brins d'ADN nouvellement formés, et facilite la liaison au PCNA (antigène nucléaire de prolifération cellulaire) et à l'ADN polymérase  $\delta$ , entraînant l'élongation des fragments continus et des fragments d'Okazaki.

Les deux fourches de réplication avancent à peu près à la même vitesse de part et d'autre de l'origine de réplication. Il n'y a pas de séquence identifiée de terminaison de la réplication.

Elle survient au sein de n'importe quelle séquence localisée à environ 180° de l'ORI. La topoisomérase II sépare ensuite les deux molécules filles de la molécule mère.

La réplication de l'ADN viral est régulée par la phosphorylation du large T antigène. En effet, le site de phosphorylation de ce dernier est situé près de son site de fixation à l'ADN. La forme déphosphorylée du Large T Ag est donc plus active que sa forme phosphorylée.

#### f) Expression des gènes viraux tardifs

Le début de la réplication coïncide avec un changement du schéma transcriptionnel. La transcription des ARNm tardifs augmente de façon très importante, leur production étant beaucoup plus abondante que celle des ARNm précoces. Deux sortes d'ARNm tardifs sont produits: l'ARNm 16S, majoritaire (traduit en VP1), et 19S, minoritaire (traduit VP2 et VP3). Les ARNm tardifs sont tous polycistroniques. Tous les ARNm 16S sont composés d'une séquence leader spécifique de chaque espèce et d'un deuxième exon contenant le signal de polyadénylation, après épissage de la région 527-1464. Les ARNm 19S contiennent le même site de polyadénylation. Les séquences des protéines VP2 et VP3 se chevauchent, VP2 contenant entièrement VP3 à son extrémité carboxy-terminale.

Les protéines de capsid jouent un rôle vraisemblablement important pour l'entrée du virus dans la cellule. VP1 interagit probablement avec les récepteurs cellulaires spécifiques. La protéine VP2 est myristylée à son extrémité amino-terminale, et son absence a pour conséquence une diminution significative du pouvoir infectant *in vitro*. Elle joue donc également un rôle important dans la transmission du virus de cellule à cellule.

La troisième protéine codée par les gènes tardifs est l'agnoprotéine, codée par un des cadres de lecture ouvert situé en amont des gènes des protéines de capsid. Cette petite protéine de 66 a.a s'accumule dans la région périnucléaire pendant la dernière phase du cycle de multiplication. Son rôle semble être de faciliter la translocalisation de VP1 au niveau du noyau au début de l'infection, et de favoriser la dissémination virale de cellule à cellule.

### **g) Assemblage et libération des nouveaux virions**

Après l'étape de traduction, les protéines de capsid synthétisées dans le cytoplasme sont transportées dans le noyau pour l'assemblage des virions. Des signaux de localisation intranucléaires sont présents à l'extrémité amino-terminale de VP1 et carboxy-terminale de VP2 et VP3. Les interactions protéines de capsid/ADN viral/protéines histones aboutissant à la formation d'un virion entier sont mal connues. Les virions nouvellement formés sont transportés dans des vésicules jusqu'à la membrane cellulaire puis libérés.

## **4. Pathogenèse**

### **a) Primo-infection, latence et réactivation**

Les évènements survenant au cours de la primo-infection sont mal connus. L'hypothèse la plus probable concernant le mode d'entrée du virus dans l'organisme est la voie respiratoire, en raison de la fréquence des séroconversions chez l'enfant. Le virus est sans doute ensuite disséminé par voie hématogène vers les différents organes cibles, en particulier le rein et le tractus urinaire. Le virus reste ensuite latent dans les cellules des organes cibles, et peut réactiver à la faveur d'une immunosuppression (en particulier cellulaire).

L'infection productive aboutit à la lyse cellulaire dans les cellules permissives. Dans les cellules non permissives, l'infection est abortive et s'arrête au stade de synthèse des antigènes précoces. La réplication du génome viral est alors bloquée, sans conséquences ultérieures pour la cellule. Dans un certain nombre de cas le génome viral s'intègre au génome cellulaire, et peut être source de réactivation ultérieure, ou de modification du phénotype pouvant conduire à l'immortalisation cellulaire (8)(figure 4).

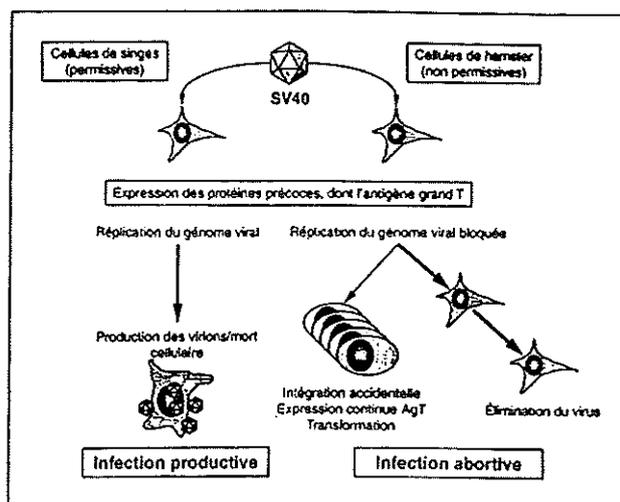


Figure 4: SV40: transformation cellulaire et cycle lytique: dans les cellules permissives (cellules de singe), le cycle, complet, aboutit à la lyse cellulaire. Dans des cellules non permissives (cellules de hamster par exemple), le cycle, abortif, n'aboutit qu'à l'expression du Large T Ag. L'absence de réplication du génome viral aboutit alors à son élimination au fil des divisions cellulaires. En cas d'intégration au génome cellulaire, le virus persiste dans la cellule et induit leur prolifération par l'intermédiaire du Large T Ag (8).

La spécificité cellulaire est régulée au niveau transcriptionnel (pas de transcription des antigènes précoces), alors que la spécificité d'espèce semble plutôt être régulée au niveau de la réplication (transcription des antigènes précoces, mais pas d'interaction Ag T/ADN, donc pas d'initiation de la réplication). Cette spécificité d'espèce explique la transformation possible de cellules d'animaux de laboratoire infectés par du BK virus humain.

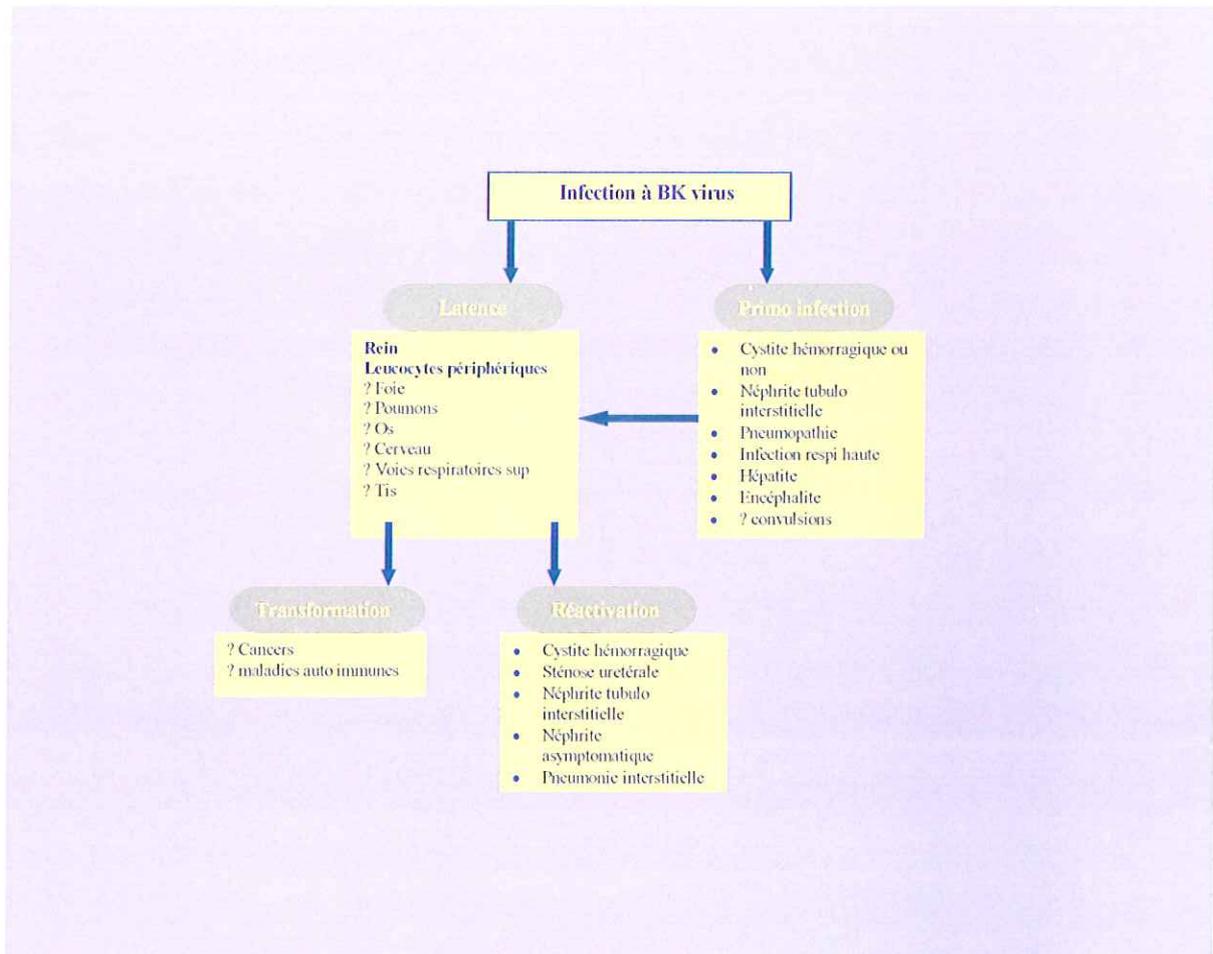
La persistance du BK virus à l'état latent dans certains organes a été rapportée par de nombreux auteurs. L'ADN viral serait soit intégré au génome cellulaire, soit sous forme épisomale. Dans tous les cas, de façon similaire aux herpès virus, un nombre limité de gènes viraux est transcrit, permettant d'échapper à la surveillance exercée par le système immunitaire. Les différents sites de latence du BK virus ont été identifiés grâce à des techniques d'hybridation Southern Blot et d'amplification génique (PCR). Le site majoritaire est l'épithélium du rein et du tractus urinaire (épithéliums de transition, des tubules rénaux, de

---

la capsule de Bowman)(5) (4). La présence de l'ADN du BK virus a également été détecté dans divers autres organes (foie, estomac, poumons, parathyroïdes, nodules lymphoïdes), et en particulier dans le cerveau et les cellules mononucléées sanguines.

Les leucocytes circulants ont donc aussi été identifiés en tant que site de latence, d'abord chez des patients immunodéprimés, en particulier chez les sujets séropositifs pour le VIH, ainsi que les greffés de moelle, mais aussi chez des sujets immunocompétents (9). Dans une étude réalisée sur les leucocytes circulants de 40 donneurs immunocompétents de l'Université de Pennsylvanie, l'amplification par PCR de la région TCR du génome viral s'est révélée positive dans 55% des cas, sans doute à un faible nombre de copies (7). Dans une autre étude, menée sur 231 donneurs et personnels d'un centre de transfusion en Italie, les amplifications par PCR ciblées d'une part sur une séquence de VPI et d'autre part sur la région régulatrice NCCR se sont révélées positives respectivement dans 7,3 et 21,6% des extraits issus de cellules mononucléées sanguines (10).

De la capacité du BK virus à persister à l'état latent découle la possibilité de réactivation virale dans certaines circonstances. Ce phénomène peut être observé dans un contexte d'immunosuppression, le plus souvent cellulaire, même modérée. Les principales situations au cours desquelles une réactivation du virus a pu être mise en évidence sont: greffe de moelle, transplantation d'organe, SIDA, hémopathies malignes, chimiothérapie, syndrome d'immunodéficience congénital, grossesse. La réactivation est le plus souvent affirmée par la mise en évidence d'une virurie.



**Figure 5:** La primo infection à BK virus est le plus souvent asymptomatique, bien que de nombreuses manifestations cliniques non spécifiques aient été suggérées. Les sites de latence proposés sont nombreux, les principaux étant le rein et les leucocytes périphériques. Le rein constitue également le site principal de réactivation.

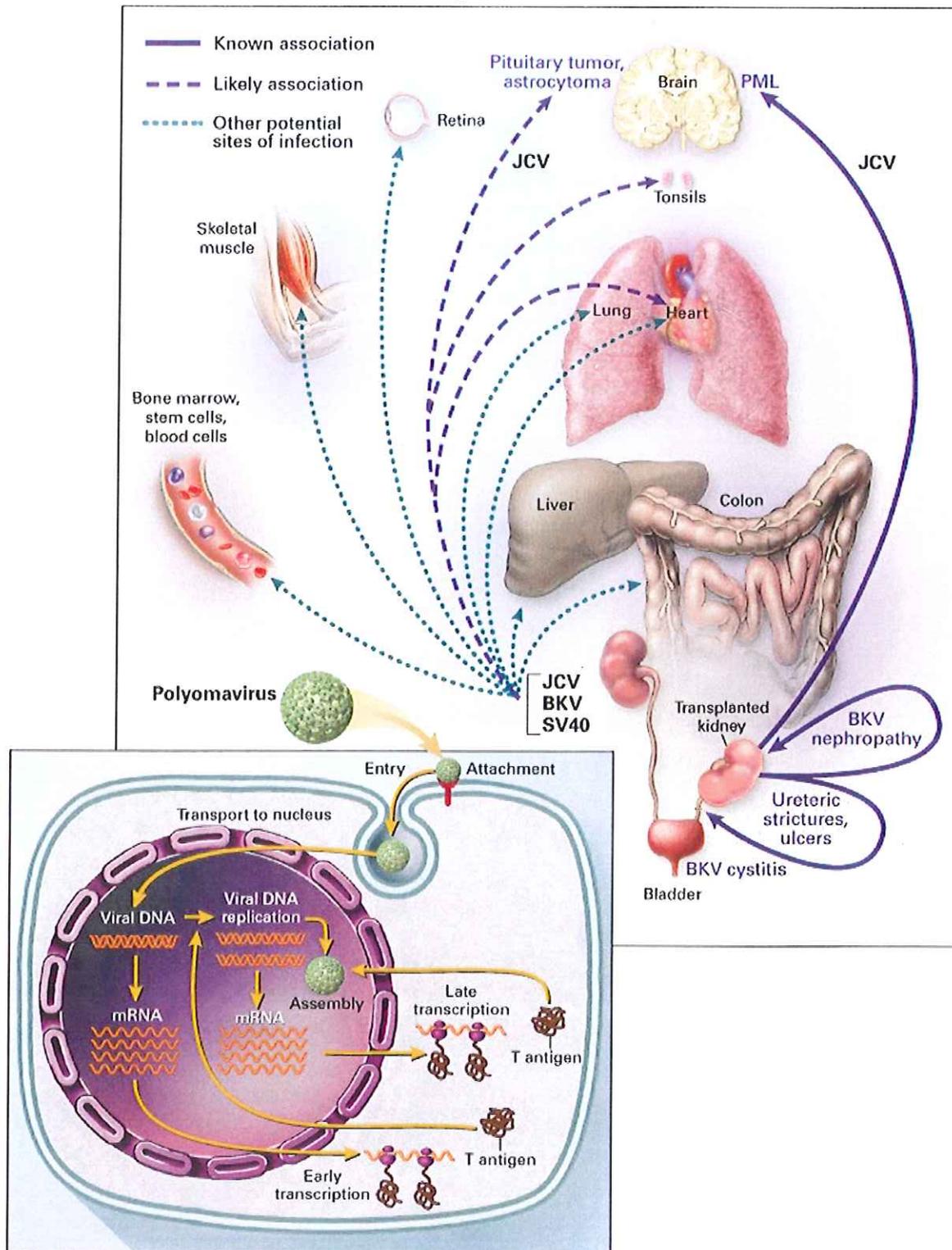


Figure 6: Les polyomavirus humains peuvent infecter différents types cellulaires. Le BK virus est surtout impliqué dans la survenue de néphropathies en transplantation rénale et de cystites hémorragiques en greffe de moelle. d'après *Fishman, M.D. (11)*

## b) Variabilité génétique

La région régulatrice NCCR est susceptible de subir des modifications à type d'insertions ou de délétions. Ces modifications sont à l'origine de la distinction entre souches "archétypes" et souches "variantes". Une hypothèse est que les souches natives "archétypes" soient celles qui circulent, disséminent dans la population générale et établissent une infection persistante dans l'organisme. Les souches réarrangées apparaissent *in vitro* après plusieurs passages en culture cellulaire, et ont également été mises en évidence *in vivo* (12). Le site et les mécanismes moléculaires de ces réarrangements ne sont pas précisément connus. Par analogie avec le JC virus, certains pensent que les réarrangements ont lieu sur le site de l'infection primaire, d'autre qu'ils ont lieu lors du transport du virus vers des sites de latence. Chatterjee a montré que les formes "variants" sont présents dans les leucocytes périphériques de donneurs sains(7). D'autres ont mis en évidence des variants chez des patients atteints de néphrite interstitielle ou de cystite hémorragique (6,13). Les modifications observées entraînent l'apparition des sites de liaison à des facteurs de transcription cellulaires (Sp1, NF-1) et leur rôle éventuel dans la virulence de certaines souches virales reste à préciser.

## c) Oncogénicité

Les polyomavirus sont des virus oncogènes, au même titre que d'autres petits virus à ADN comme les papillomavirus ou certains types d'adénovirus. Ce pouvoir transformant s'exprime dans le cadre d'une infection abortive, alors que l'infection de cellules permissives aboutit à un cycle de réplication complet et donc à la destruction cellulaire. Ce phénomène s'observe lorsque la cellule infectée n'appartient pas à l'hôte naturel du virus.

### (1) Pouvoir oncogène expérimental *in vivo*

L'inoculation du BK virus par voie sous cutanée, intracérébrale, ou intra veineuse à l'animal de laboratoire (hamster, rat, souris) peut avoir pour conséquence le développement de

tumeurs. Différents types histologiques ont pu être observés, fonction de la voie d'inoculation et de l'animal: épendymomes, neuroblastomes, tumeurs des îlots pancréatiques, fibrosarcomes, ostéosarcome chez le hamster; fibrosarcomes, liposarcomes, ostéosarcomes, néphroblastomes, gliomes chez le rat ou la souris(14).

## (2) Transformation cellulaire *in vitro*

### (a) cellules de rongeurs

Les virions entier, l'ADN complet, ou les fragments génomiques codant pour les antigènes précoces du BK virus sont capables de transformer *in vitro* des fibroblastes embryonnaires ou des cellules rénales ou cérébrales de rongeurs, de lapin ou de singe. L'ADN viral est soit intégré au génome cellulaire, soit présent sous forme épisomale.

### (b) cellules humaines

Les essais de transformation *in vitro* de cellules humaines sont quelquefois inefficaces, et souvent abortives. Des altérations morphologiques, une augmentation de la durée de vie, l'apparition d'anomalies chromosomiques peuvent être observées. Cependant, les cellules transformées ne présentent pas toutes les caractéristiques des cellules tumorales. L'ADN viral y est le plus souvent présent sous forme épisomale, non intégrée(14).

## (3) Mécanismes moléculaires de l'oncogénicité

Les oncoprotéines virales sont des protéines précoces, qui sont traduites avant l'étape de réplication de l'ADN. Les polyomavirus, comme les papillomavirus humains ou l'adénovirus, nécessitent la machinerie cellulaire de synthèse de l'ADN pour assurer leur réplication. Ils ont pour cela développé des mécanismes d'activation de la croissance favorisant l'entrée de la cellule en phase S, et pour lesquels les antigènes viraux précoces, en particulier le Large T Ag, jouent un rôle important. En effet, celui ci a la capacité de se fixer et d'inhiber les produits des gènes suppresseurs de tumeurs (15).

Le produit du gène suppresseur de tumeur p53 a pour rôle essentiel de pallier aux altérations de l'ADN cellulaire en bloquant le cycle cellulaire au stade G1 et en favorisant l'entrée en apoptose (figure 7). La liaison de Large T Ag avec la protéine p53 stabilise cette dernière mais l'inactive et favorise ainsi l'apparition d'anomalies chromosomiques (figure 9). Le site de liaison se situe, pour le virus SV40, près de l'extrémité carboxy-terminale du Large T Ag, qui est une zone importante pour la stimulation mitogénique et la transformation.

La famille des gènes suppresseurs de tumeur pRb (pRb, p107, p130) joue également un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire. La protéine pRb contrôle normalement l'entrée de la cellule en phase S du cycle cellulaire. En phase G1 du cycle cellulaire, la forme déphosphorylée de pRb est liée au facteur E2F et l'inactive. Le facteur E2F est une protéine essentielle à l'activation des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN. La phosphorylation de pRb est sous la dépendance du complexe cycline/cdk, et entraîne la libération du facteur E2F. Celui ci favorise alors la transcription des gènes cellulaires impliqués dans l'entrée de la cellule en phase S (figure 8).

Le Large T Ag du SV40 a la capacité de se lier à la protéine pRb et apparentées sous forme déphosphorylée, empêchant leur fixation à E2F (figure 9). Le site de liaison de Large T Ag à pRB implique un motif conservé de type HPDKGG, retrouvé chez E1A de l'adénovirus ou E7 du papillomavirus. Ce motif se situe pour SV40, ainsi que pour le BK virus, au sein du domaine J, à la jonction Large T Ag - small t ag. Ce phénomène permet de favoriser la croissance cellulaire, en mobilisant la machinerie cellulaire responsable de la synthèse de l'ADN. Pour le BK virus, la liaison Large T Ag/ pRb a également été mis en évidence mais à plus bas niveau (16). Un des modèles proposés implique le domaine J du Large T Ag. Celui ci interagirait avec les protéines de la famille pRb, entraînant la libération du facteur E2F(16).

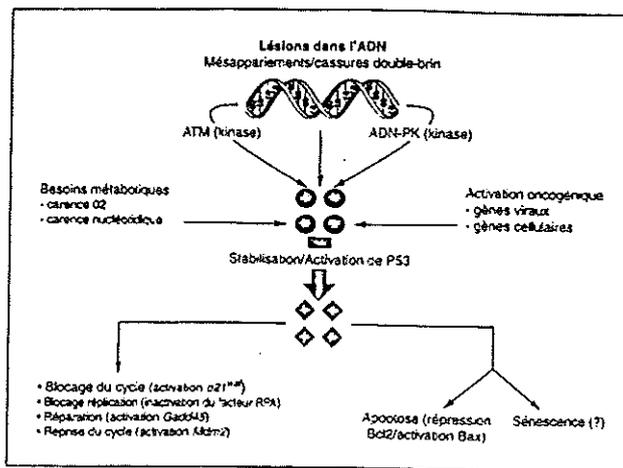


Figure 7: Rôle de la protéine p53: sa forme activée induit un arrêt transitoire du cycle cellulaire en phase G1 et active la machinerie de réparation de l'ADN. Elle peut aussi induire l'entrée en apoptose de la cellule

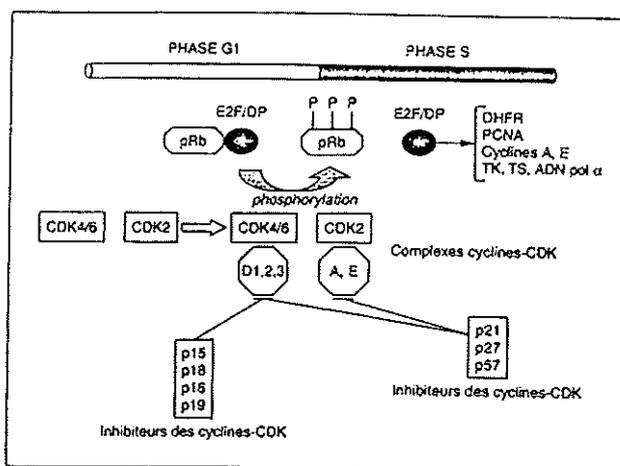


Figure 8/ La protéine E2F active l'entrée des cellules en phase S. Cette activité est contrôlée négativement par les membres de la famille pRb sous leur forme hypophosphorylée. La phosphorylation des protéines pRb est sous le contrôle de kinases couplées à des cyclines (cdk), elles mêmes contrôlées par d'autres facteurs cellulaires.

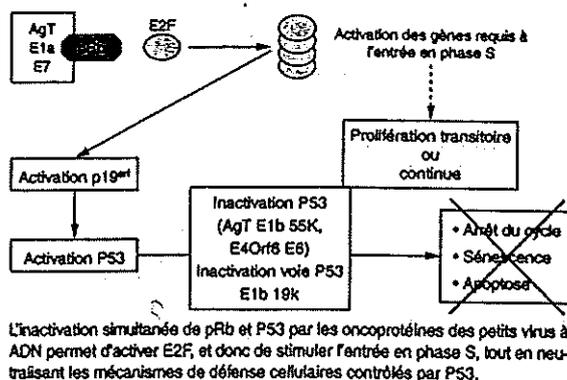


Figure 9: Coopération moléculaire entre les oncoprotéines des petits virus à ADN et les protéines de la famille pRb, p53 et E2F.

D'après Maréchal V., (8)

## *5. Epidémiologie et transmission*

Le BK virus est un virus ubiquitaire, dont le pic d'apparition des anticorps se situe tôt dans l'enfance. La séroprévalence varie entre 60 et 100% en fonction des études épidémiologiques menées dans différents pays. Aux Etats-Unis, 50 % des enfants entre 3 et 4 ans possèdent des anticorps. La séroprévalence atteint presque 100% vers l'âge de 10-11 ans puis diminue progressivement pour se situer aux alentours de 70-80% pour les sujets plus âgés(5). Une étude espagnole menée sur les eaux d'égout de différentes villes dans le monde a recherché par technique PCR les ADN génomiques des JC, BK, et SV40 virus. Sur un total de 28 échantillons, 96 % étaient positifs pour le JC virus et 78 % pour le BK virus. Par contre, les prélèvements étaient négatifs pour le SV40 (17).

La voie de transmission la plus fréquemment proposée par les différents auteurs implique les voies respiratoires hautes, pouvant expliquer la séroprévalence élevée dès le plus jeune âge. L'hypothèse d'une transmission par voie transplacentaire a également été avancée, l'ADN viral ayant pu être isolé dans les tissus fœtaux et maternels (18). La mise en évidence du virus dans d'autres liquides biologiques, en particulier les urines et le sang, amènent également à poser l'hypothèse d'une transmission par ces voies (19).

Les différentes études épidémiologiques ont proposé deux types de classification: la première, basée sur les techniques sérologiques, a permis d'identifier quatre sérotypes, correspondant sur le plan génotypique à des séquences différentes de la protéine de capsid VP1 (20). Le deuxième schéma de classification est basé sur le séquençage de la région de régulation TCR, différenciant les souches "archétypes" et les formes "réarrangées".

## 6. *Manifestations cliniques liées au BK virus*

### a) Primo-infection

La primo-infection à BK virus est dans la grande majorité des cas asymptomatique. Les rares symptômes ayant été associés à ce virus sont de la fièvre et des signes respiratoires hauts non spécifiques. Des études sérologiques chez l'enfant ont permis de retrouver une ascension des anticorps IgM, évoquant une primo infection à BK virus, dans certains tableaux d'infection respiratoire haute. Cependant, bien que l'ADN viral ait pu être mis en évidence dans les amygdales, voire dans des prélèvements d'aspiration nasopharyngée, jamais les particules virales infectieuses n'ont été isolées(19).

### b) BK virus et cancer

Les capacités transformantes des *polyomaviridae in vitro* et le développement possible de néoplasies chez les rongeurs sont connues depuis longtemps. L'ADN du BK virus a pu être mis en évidence par hybridation *in situ* (ISH) dans plusieurs types histologiques de tumeurs cérébrales (épendymome, méningiome, glioblastome, neuroblastome, oligodendrogliome, ..), ainsi qu'occasionnellement dans d'autres tissus (adénome hypophysaire, tumeur pancréatique, sarcomes, carcinome rénal ou urinaire). Cependant, il n'existe aucune preuve de la responsabilité directe du BK virus dans le développement de ces processus tumoraux(5). Le séquençage de l'ADN viral intégré au génome cellulaire, ou persistant sous forme épisomale, a permis de mettre en évidence une variabilité de la région régulatrice NCCR. Cependant, les réarrangements observés ne sont pas forcément limités aux souches retrouvées dans des tissus tumoraux. Les facteurs viraux de virulence et/ou de carcinogenèse ne sont donc pas pour l'instant bien identifiés.

### c) BK virus et maladies auto immunes

L'association entre BK virus et certaines maladies auto-immunes, en particulier le lupus érythémateux disséminé (LED) a été décrite dans la littérature. En effet, la primo-infection, ainsi que les épisodes de réactivation à BK virus, semblent responsables de la production d'auto anticorps anti-ADN double brin, et anti-histones. De plus, une étude a montré l'existence d'une virurie persistante ou récurrente chez 60% des patients atteints d'un lupus(21). La même observation a été faite dans des cohortes de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de polymyosite.

### d) Pathologies liées à une réactivation

Les tableaux cliniques liés au BK virus et décrits chez les sujets immunodéprimés sont la conséquence d'une réactivation virale à la faveur d'un déficit de l'immunité cellulaire. Le rein est le site de réactivation le plus fréquemment décrit et se traduit par la mise en évidence du virus dans les urines. En effet, une excrétion urinaire peut être retrouvée chez 0,3% de la population générale, 3% des femmes enceintes, 10 à 45 % (selon les séries) des transplantés rénaux, jusqu'à 50 % des greffés de moelle (22). La présence du virus dans les urines reste cependant le plus souvent asymptomatique(19).

#### (1) Atteinte rénale

En greffe de moelle, lorsque l'infection à BK virus s'exprime cliniquement, on observe le plus souvent une cystite hémorragique, survenant 2 à 8 semaines après la greffe(23). Ils s'agit d'épisodes tardifs et prolongés, à différencier des cystites hémorragiques secondaires à un traitement par cyclophosphamide (Endoxan®), et de pronostic souvent péjoratif.

En transplantation rénale, une virurie asymptomatique peut être observée, conséquence d'une réactivation et d'une réplication virales. Elle peut quelquefois se compliquer d'une néphrite tubulo-interstitielle, pouvant avoir pour conséquence une dégradation de la fonction rénale, et

au stade ultime la perte du greffon. La néphropathie à BK virus sera le sujet d'un paragraphe à part entière.

### **(2) Atteinte pulmonaire**

Deux cas de pneumopathie interstitielle confirmée par immuno-histochimie ont été décrits chez des patient sidéens, l'une associée à des signes neurologiques, l'autre compliquée d'un syndrome de détresse respiratoire aigu ayant entraîné le décès du patient(19).

### **(3) Atteinte neurologique**

La présence du BK virus à l'état latent dans le cerveau, et la possibilité de pathologies secondaires à une réactivation virale restent pour l'instant controversées. Cependant, plusieurs cas ont été rapportés dans la littérature. Les plus récents concernent: un patient immunocompétent pour lequel le bilan étiologique d'encéphalite a mis en évidence une ascension des IgM anti BK virus en faveur d'une primo infection; et deux patients sidéens ayant présenté une atteinte multiviscérale (pneumopathie, néphrite tubulo-interstitielle, hydrocéphalie dans un cas et rétinite bilatérale, néphrite, méningo-encéphalite dans l'autre) aboutissant au décès dans les semaines qui suivirent (24). L'immuno-histochimie réalisée sur les organes atteints s'est révélée positive pour le BK virus et négative pour les autres virus (JC virus, CMV, EBV).

### **(4) Atteinte ophtalmologique**

Un seul cas de rétinite bilatérale atypique a été décrit, toujours chez un patient sidéen, attribué au BK virus après mise en évidence du génome viral dans le sang par PCR et in situ par immuno-histochimie(25).

## B. LA NÉPHROPATHIE À BK VIRUS EN TRANSPLANTATION RENALE

### 1. *Epidémiologie*

Les premiers cas de néphropathie à BK virus chez les transplantés rénaux ont été décrits dans les années 70. La survenue fréquente de réactivations sérologiques du BK virus avait déjà été mise en évidence au cours du suivi prospectif de transplantés rénaux (26). L'intérêt porté à cette pathologie correspond à une augmentation récente du nombre de cas. En effet, différents centres de transplantation ont décrit une émergence de cette pathologie à partir de 1995 (Pappo O. 1996, Mod Pathol) (27, 28). La présence de BK virus dans les urines, reflet d'une réactivation, est détectée en fonction des séries dans 10 à 45% des prélèvements en post transplantation. Le BK virus peut également être présent de façon concomitante dans le sang (29). La réactivation virale est le plus souvent précoce, dans les 3 mois suivant la transplantation, mais peut aussi être retardée et apparaître dans les deux ans qui suivent. Cette réactivation peut se compliquer d'une néphrite interstitielle, survenant 2 à 60 mois (en moyenne 9) après la transplantation. Certaines séries décrivent jusqu'à 5% de néphrites interstitielles en post greffe, conduisant dans 50 % des cas à un dysfonctionnement, voire à une perte du greffon.

### 2. *Signes cliniques*

Il n'existe pas de signes cliniques spécifiques de la néphropathie à BK virus. Le signe d'appel le plus fréquent est la dégradation de la fonction rénale, objectivée par une augmentation des taux plasmatiques de créatinine. Aucun signe systémique évocateur d'une atteinte virale (fièvre, signes respiratoires, ...) n'est habituellement observé. Un cas de néphropathie à BK virus récemment décrit chez un enfant transplanté de 6 ans, a été détecté deux semaines après la survenue d'une symptomatologie générale évocatrice d'infection virale (congestion nasale et gastro entérite). Dans la même série, deux autres patients ont présenté

des signes généraux (myalgies, fièvre, malaise) dans les semaines précédant le diagnostic de néphropathie à BK virus (30). Cependant, le lien avec une éventuelle primo infection ou réactivation à BK virus n'a pu être établi en l'absence de sérologie ou de prélèvement direct isolant le virus dans les selles ou les sécrétions respiratoires(30).

Les diagnostics différentiels à envisager sont l'épisode de rejet, la survenue d'une nécrose tubulaire aiguë, ou une éventuelle néphrotoxicité médicamenteuse. En raison de l'absence de symptôme clinique spécifique, le diagnostic positif de néphropathie à BK virus nécessite dans tous les cas une confirmation histologique. Le diagnostic différentiel, même histologique, avec un épisode de rejet n'est pas toujours facile et un certain nombre de patients ont d'abord été traités par des bolus de corticoïdes (30). Dans ce cas, la dégradation de la fonction rénale doit faire envisager un autre diagnostic, et éventuellement faire discuter une nouvelle biopsie du greffon.

L'évolution, en dehors de tout traitement, se fait vers une dégradation de la fonction du greffon. Dans une série publiée par Randhawa (31), la surveillance histologique de treize patients pour lesquels le diagnostic de néphrite tubulo interstitielle avait été posé a montré chez neuf d'entre eux la persistance de lésions cytopathiques et tubulaires, et parmi ceux ci sept ont développé une néphropathie chronique ayant nécessité une néphrectomie. D'autres manifestations cliniques, beaucoup plus rares, ont pu être décrites, comme la survenue d'une sténose urétérale ou d'une hématurie.

### *3. Facteurs de risque*

La survenue de réactivations à BK virus est liée à l'état d'immunosuppression en post transplantation. Dans une série récente de huit patients présentant une néphropathie à BK virus, les différents facteurs incriminés dans la résurgence de ce pathogène sont: l'utilisation de nouveaux immunosuppresseurs (mycophénolate mofétil et tacrolimus), le nombre

d'épisodes de rejet ayant nécessité un traitement, la transplantation d'un greffon de donneur séropositif à un receveur séronégatif pour le BK virus, le nombre d'incompatibilité HLA, le sexe masculin, la survenue d'infections à CMV, et la recherche plus systématique du virus par les histopathologistes(32).

Le mycophénolate mofétil est la prodrogue de l'acide mycophénolique. Il inhibe la synthèse de novo des purines et induit un arrêt de la prolifération des lymphocytes B et T à l'interface G1-S du cycle cellulaire. En transplantation rénale, il a supplanté à l'azathioprine.

Le tacrolimus (FK506 = Prograf) est un inhibiteurs des calcineurines au même titre que la ciclosporine (Néoral). Ces nouveaux traitements sont plus fortement immunosuppresseurs que des molécules plus anciennes.

La néphrite interstitielle liée au BK virus n'a pas été décrite chez des patients ayant bénéficié de la transplantation d'un autre organe que le rein (coeur, foie), et rarement dans les autres contextes d'immunodépression. L'environnement immun allogénique pourrait donc être un facteur favorisant la réactivation virale (33). Les dommages tissulaires locaux inhérents soit à la transplantation, soit aux effets secondaires des traitements, soit à des épisodes de rejet cellulaire, créent également un environnement favorable à la réactivation virale (34). La durée d'ischémie froide (courte en cas de donneur vivant, plusieurs heures en cas de donneur décédé), ne semble pas corrélée à la présence du BK virus dans les urines de patients transplantés (35). Dans la même étude, aucune différence significative d'excrétion urinaire de polyomavirus n'a été retrouvée entre les patients ayant eu un ou plusieurs épisodes de rejet et ceux qui n'en ont pas présenté.

#### *4. Diagnostic biologique*

##### *a) Diagnostic histologique*

L'infection à BK virus est responsable d'une néphrite tubulo-interstitielle corticale profonde et médullaire, rapidement fibreuse. Les lésions morphologiques des voies urinaires

sont dues à l'effet cytopathogène du virus. A l'heure actuelle, la ponction biopsie rénale est l'examen de référence permettant de poser le diagnostic de néphropathie à BK virus. Il s'appuie sur un faisceau d'arguments associant modifications histologiques du tissu rénal et techniques spécifiques d'immunohistochimie(36).

### (1) signes non spécifiques

Des signes d'inflammation interstitielle ("tubulite") sont observés. Le diagnostic différentiel avec un rejet cellulaire n'est pas toujours facile. L'infiltrat inflammatoire, constitué de cellules mononucléées (lymphocytes, macrophages) et de polynucléaires neutrophiles, est réparti de façon focale autour des tubules.

Les signes histologiques plus évocateurs sont visibles au niveau des cellules épithéliales tubulaires, associant inclusions intranucléaires et zones de nécrose focale pouvant mettre à nu les membranes basales. L'atteinte rénale est localisée de façon privilégiée sur les tubes distaux, surtout collecteurs, et plus rarement au niveau des cellules pariétales de la capsule de Bowman.

Les inclusions intranucléaires observées sont de quatre types morphologiques:

- type I: cellules à gros noyau homogène présentant un aspect de verre dépoli. Ce sont les plus fréquemment observées.
- type II: aspect finement granulaire de tout le noyau
- type III: inclusion centrale séparée par un halo clair d'un noyau de chromatine très basophile
- type IV: inclusions vésiculaires, cellules à noyau élargi, chromatine mottée et irrégulière. Ce sont les cellules les moins caractéristiques, présentant des anomalies morphologiques proches de cellules tumorales.

Certaines des modifications cytologiques ainsi observées ont également été décrites au cours d'infections à cytomegalovirus, herpes simplex virus ou adénovirus.

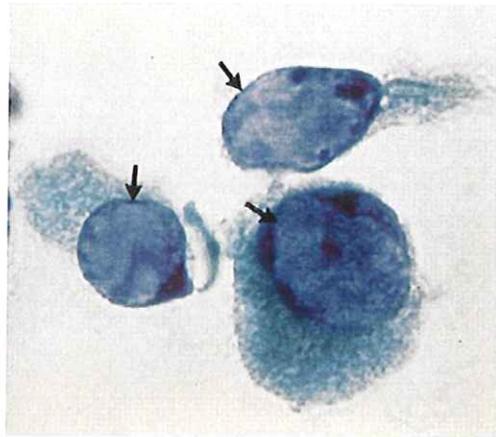
---

Un autre signe indirect de l'infection du BK virus est la présence de "Decoy cells"(cellules pièges) dans les urines. Ce sont des cellules infectées, d'origine urothéliale, observées après coloration de Papanicolaou. La "decoy cell" ne doit pas être confondue avec certaines cellules carcinomateuses, ou une cellule infectée par un autre virus tel le CMV, dont l'aspect peut être proche. Il s'agit d'une cellule volumineuse, hyperbasophile, contenant de gros noyaux homogènes avec un aspect en verre dépoli dont l'inclusion centrale paraît occuper tout le noyau. Elles sont un marqueur morphologique de réactivation et de réplication virale. La recherche systématique en parallèle de Decoy cells dans les urines semble montrer une très bonne corrélation de ce test avec l'atteinte histologique. Sa valeur prédictive positive est calculée à 90% dans cette étude. Leurs résultats sont en désaccord avec ceux de Nickleit et al, pour qui la présence de Decoy cells dans les urines a une bonne sensibilité mais une valeur prédictive positive de seulement 27% (37).

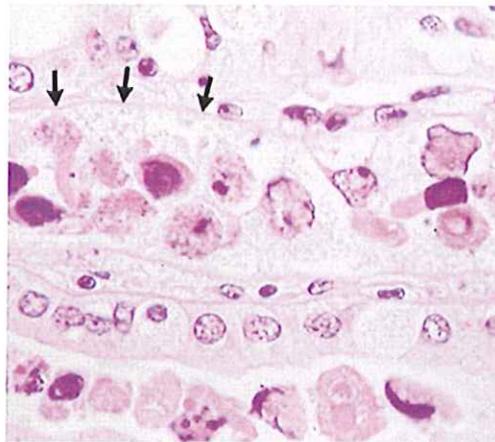
## (2) spécifiques

L'utilisation de techniques d'immunohistochimie permet de confirmer le diagnostic. Plusieurs anticorps monoclonaux anti-polyomavirus sont commercialisés, soit communs aux BK, JC, et SV40, soit spécifique. Ces anticorps sont dirigés contre un antigène précoce (Large T Ag), ou contre une protéine de capsid.

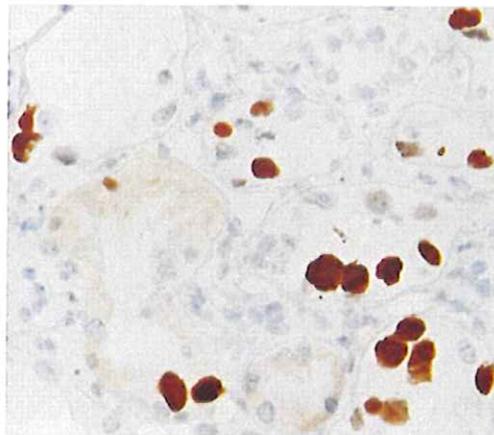
L'hybridation *in situ* peut être réalisée sur la cytologie ou sur des lames de biopsie fixées à l'aide de sondes génomiques radiomarquées ou biotinylées.



A



B



C

**Figure 10: A= Coloration de Papanicolaou mettant en évidence des Decoy cells dans les urines (x400). B= Biopsie de greffon montrant des inclusions virales dans les cellules épithéliales tubulaires. On peut également observer un élargissement du noyau, et le décollement des cellules mettant à nu la membrane basale (flèches) (x160). C= immunohistochimie utilisant un anticorps murin anti Large T Ag, marquage intranucléaire permettant de confirmer le diagnostic de néphropathie à BK virus (x100).**

---

Dans une étude publiée en 2001, Drachenberg et al ont étudié 2190 biopsies réalisées au cours du suivi de 1312 transplantés rénaux entre Juin 1997 et Octobre 2000 (38). Des signes histologiques d'atteinte virale à BK virus ont été mis en évidence dans 4,1% des cas. Trois stades d'évolution de l'atteinte histologique ont été décrits: le premier stade associe une atteinte cytopathique modérée avec de rares images de nécrose tubulaire focale, sans inflammation. Le stade suivant est caractérisé par l'aggravation des lésions cytologiques, une atteinte tubulaire et des signes d'inflammation conduisant à la fibrose interstitielle. Le stade ultime est une fibrose du greffon, dont le diagnostic différentiel avec un rejet chronique est très difficile. Le diagnostic de néphropathie à BK virus est en général fait au stade intermédiaire.

## **b) Diagnostic virologique**

### **(1) Techniques de diagnostic indirect: sérologies**

Le BK et le JC virus agglutinent tous les deux les globules rouges de type O. La sérologie repose donc la plupart du temps sur les techniques d'inhibition de l'hémagglutination. Des techniques ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), plus sensibles, ont également été développées plus récemment (7). Il n'existe pas de kits commerciaux. En pratique, la séroprévalence dans la population générale adulte est de l'ordre de 80%, et les pathologies associées au BK virus sont la conséquence probable d'une réactivation. Le diagnostic sérologique n'a donc que peu d'intérêt, et les méthodes de diagnostic direct sont à privilégier. Cependant, les techniques sérologiques peuvent participer à l'étude épidémiologique du virus.

## (2) Techniques de diagnostic direct

### (a) Cultures cellulaires

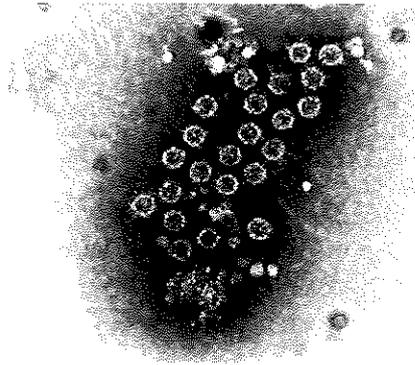
Le BK virus se multiplie de façon efficace dans les cellules embryonnaires de rein humain (HEK), ainsi que dans les cellules épithéliales rénales de singe. Sur de telles cultures cellulaires, les antigènes précoces T et t sont détectés dès la 24ème heure, mais les virions infectieux ne sont mis en évidence que beaucoup plus tardivement. L'effet cytopathogène évoquant la présence d'un membre de la famille des *polyomaviridae* apparaît en général au bout de deux à trois semaines. Il est caractérisé par la présence de cellules arrondies, translucides en microscope à contraste de phase, contenant des vacuoles intra cytoplasmiques et se détachant de la couche cellulaire adhérente après élongation du cytoplasme. La multiplication virale est possible mais beaucoup moins efficace dans les fibroblastes humains ou les cellules lymphocytaires(5).



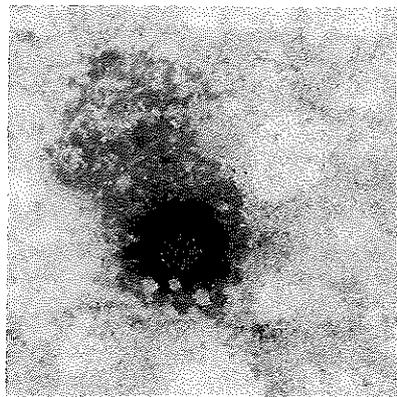
Figure 11: Effet cytopathogène du BK virus sur des cellules embryonnaires de rein: cellules élargies, noyau pycnotique et élongation du cytoplasme.

### (b) Microscopie électronique

La microscopie électronique a longtemps été utilisée pour la mise en évidence des polyomavirus sur des coupes biopsiques ou dans les urines. L'observation en microscopie montre des petits virus de 40 à 50 nm de diamètre, monomorphes, intranucléaires, intra cytoplasmiques et extracellulaires, en petits groupes, parfois d'aspect granuleux, pseudo cristalloïde. (figures 12 et 13)



**Figure 12: Image de microscopie électronique montrant un groupe de BK virus dans un prélèvement urinaire. (photographie C.Mollat, laboratoire de Virologie CHU Nantes).**



**Figure 13: détail de microscopie électronique/ particule virale de BK virus (C. Mollat, laboratoire de Virologie, CHU Nantes).**

(c) Biologie moléculaire

Le diagnostic d'infection à BK virus a bénéficié du développement de techniques de diagnostic direct par biologie moléculaire.

(i) PCR qualitative

L'extraction des acides nucléiques se fait sur des prélèvements urinaires ou plasmatiques, ou sur des prélèvements biopsiques. Une amplification par PCR est alors réalisée, les amorces étant choisies dans une région d'intérêt, codant en général soit pour la protéine de capsid VP1, soit pour une protéine précoce (Large T Ag ou t). Les techniques utilisées sont soit de la PCR classique, soit de la PCR en temps réel (39).

La positivité de la PCR urinaire est le reflet de la présence du virus dans les cellules épithéliales tubulaires. Cependant, elle ne permet pas de faire la différence entre le virus à l'état latent ou en phase de réplication. Il ne s'agit donc pas d'un test discriminant pour le diagnostic d'infection active à BK. Par contre, la présence du génome viral dans le sang semble mieux corrélée à une atteinte histologique, le pourcentage de patients virémiques étant significativement plus élevé lorsque la néphropathie à BK est confirmée par l'histologie (40).

#### (ii) PCR quantitative

Le développement récent de la quantification par PCR temps réel, et la nécessité de disposer d'outils non invasifs permettant de faire un diagnostic précoce et de suivre les patients ayant une atteinte histologiquement prouvée a conduit à la mise au point de telles techniques pour le BK virus.

La charge virale BK peut être mesurée dans les urines (41, 42) , associées ou non au plasma (29, 43-46), voire même dans les prélèvements biopsiques (47).

#### (iii) Séquençage

Les *polyomaviridae*, en raison de la petite taille de leur génome, furent les premiers virus à ADN à être entièrement séquencés. Le développement récent de techniques de séquençage a permis d'étudier les différentes souches virales isolées chez les malades, afin d'essayer d'identifier d'éventuels facteurs de virulence. La recherche de mutations peut concerner la région VPI, pour laquelle une des conséquences possibles serait une modification de la séquence en acides aminés et donc un changement conformationnel. L'autre région digne d'intérêt est la région NCCR. La variabilité de la région régulatrice non codante dépend à priori du tissu à partir duquel a été isolée la souche, et le séquençage de cette région permet de distinguer les souches "archétypes" des souches "variants".

## 5. Traitement

Il n'existe pour l'instant pas de consensus sur la prise en charge des néphropathies à BK virus. Le traitement repose en grande partie sur une réduction du traitement immunosuppresseur, ce qui a l'inconvénient d'exposer le patient à un risque accru de rejet immunologique. *In vitro*, des études ont montré l'efficacité de certaines molécules contre le BK virus parmi lesquelles un dérivé de la vitamine A (acide rétinoïque), les inhibiteurs de l'ADN gyrase procaryote, ainsi que le Cidofovir (Vistide®)(48). Ce dernier semble le plus intéressant. Il s'agit d'un analogue de la cytidine. Après pénétration dans la cellule, le cidofovir est phosphorylé pour donner le diphosphate de cidofovir. Il agit en inhibant de manière compétitive et sélective l'ADN polymérase virale. L'incorporation de la molécule dans l'ADN viral a pour conséquence un ralentissement de la vitesse de synthèse de l'ADN viral. Le cidofovir est actif contre les *Herpes viridae* humains et a été utilisé chez les patients sidéens présentant une rétinite à CMV résistant au Ganciclovir ou au Foscarnet. Son activité *in vivo* sur les polyomavirus murins et sur le SV40 a été à l'origine de son utilisation dans les infections à BK virus. L'administration se fait par voie intra veineuse en raison de sa faible biodisponibilité. Environ 90% de la dose administrée est éliminée dans les urines sous forme inchangée, par filtration glomérulaire et excrétion tubulaire. Le problème posé par le cidofovir chez les transplantés rénaux est donc celui de sa toxicité rénale, il n'est ainsi pas recommandé chez les patients dont la créatininémie est supérieure à 133  $\mu\text{mol/l}$  (clairance 55 ml/mn) ou qui ont une protéinurie évaluée à au moins deux croix à la bandelette. La dose habituelle conseillée chez l'adulte est de deux injections de 5 mg/kg à une semaine d'intervalle, puis une dose d'entretien de 5 mg/kg tous les quinze jours. Une administration orale de Probenecide lors de chaque perfusion peut réduire le risque de néphrotoxicité. Pour l'instant, peu de cas d'utilisation du cidofovir dans les néphropathies à BK virus ont été rapportés dans la littérature. Les doses utilisées sont inférieures à la posologie recommandée (de 0,25 à 1 mg/kg par injection, c'est à dire 5 à 20%

---

des doses habituelles). L'efficacité du traitement semble satisfaisante, et peut être suivie par PCR quantitative (30, 49).

## C. QUANTIFICATION EN VIROLOGIE

### 1. *Les différentes techniques de quantification*

Différentes cibles peuvent être choisies pour la quantification virale: le virion entier, les protéines virales (antigènes), ou les acides nucléiques.

Les protéines virales peuvent être détectées par des réactions antigène-anticorps. C'est le principe de la réaction E.L.I.S.A, qui peut être qualitative ou quantitative.

Les virions entiers peuvent être visualisés et dénombrés en microscopie électronique, mais il s'agit d'une technique lourde, coûteuse et qui nécessite un opérateur entraîné. Ils peuvent aussi être quantifiés par des techniques de culture cellulaire. L'une d'entre elle est la quantification par dilution limite, aboutissant au calcul de la dilution pour laquelle 50% des répliques sont négatives. Le titre infectieux dans l'échantillon initial est l'inverse de cette dilution et est exprimé en TCID<sub>50</sub> (tissue culture infectious dose 50). La méthode des plages, basée sur le même principe, s'applique uniquement à des virus ayant une action lytique. Cependant, ces techniques restent dépendantes des contraintes liées aux cultures cellulaires et ne sont pas très précises.

Les techniques de biologie moléculaire, basées sur la détection des acides nucléiques viraux, ont permis de s'affranchir de ces contraintes. Cependant, ces techniques quantifient non plus des particules infectieuses, mais du matériel génomique dont la signification n'est pas forcément la même en pathologie. Parmi les différentes méthodes qui ont été développées au cours du temps, les premières furent celles reposant sur des réactions d'hybridation en Southern ou Dot Blot, avec analyse de l'intensité d'image par comparaison à une gamme étalon. La technique du bDNA, ou "ADN branché", repose sur une amplification du signal après hybridation. le signal lumineux mesuré est proportionnel à la quantité initiale de génome, et comparé à une gamme standard externe. Les techniques les plus couramment

utilisées actuellement reposent sur la réaction de PCR (polymérisation en chaîne). Il s'agit d'une amplification enzymatique in vitro permettant la multiplication spécifique d'une séquence d'ADN donnée en plusieurs millions d'exemplaires. La réaction de PCR consiste en une succession de cycles comprenant chacun plusieurs étapes:

- dénaturation par la chaleur à 92-95°C séparant les deux brins
- hybridation avec les deux amorces spécifiques ("annealing") après abaissement de la température autour de 50-60°C
- extension des amorces par une ADN polymérase à 70-72°C

L'enzyme maintenant utilisée n'est pas inactivée par la chaleur. Il s'agit de la Taq polymérase (isolée d'une bactérie thermophile adaptée à la vie dans des sources d'eau chaude "*thermus aquaticus*"). Elle reste donc active entre chaque cycle malgré les variations de température. L'amplification est théoriquement exponentielle, puisqu'à chaque cycle le nombre de brins d'ADN est multiplié par deux. En pratique, le rendement n'est pas de 100%, il diminue au bout d'un certain nombre de cycles pour atteindre un plateau. Ce phénomène est lié à plusieurs facteurs:

- la quantité de Taq polymérase devient limitante par rapport au nombre de cibles à amplifier
- les températures élevées atteintes au cours des cycles inactivent peu à peu la Taq pol et dégradent les dNTP
- la production de pyrophosphates lors de l'amplification peut inhiber la catalyse enzymatique
- l'accumulation d'amplicons tend à favoriser l'hybridation entre brins néo-synthétisés plutôt qu'entre brins et amorces.

---

La PCR quantitative repose sur l'exploitation de la cinétique d'amplification qui peut être décomposée en deux parties: une phase exponentielle, suivie d'un plateau, et sur l'amplification en parallèle d'un standard de quantité connue.

Pendant la phase exponentielle, il existe une relation linéaire entre la quantité de produits de PCR et la quantité initiale d'ADN. La quantité  $X_n$  de produit obtenu après  $n$  cycles d'amplification est  $X_n = X_0 (1+r)^n$  où  $n$  est le nombre de cycles et  $r$  le rendement de la PCR ( $0 < r \leq 1$ ). Si  $r$  est constant, la quantité d'amplicons produite est proportionnelle à la quantité initiale d'ADN (50).

La quantification en point final a été appliquée d'abord à la technique de dilutions limites, en amplifiant en parallèle des dilutions du produit initial et une gamme de témoins. Une autre technique, encore utilisée au laboratoire pour la quantification du Cytomégalovirus, est la PCR compétitive à saturation qui repose sur la co-amplification avec les mêmes amorces dans le même tube de l'acide nucléique recherché et d'un acide nucléique de séquence proche et titré.

La dernière technique en date repose sur la PCR en temps réel, et diffère des précédentes en colligeant les données d'amplification au point de départ de la phase exponentielle, contrairement à la PCR classique qui collecte les données en fin de réaction. Ceci permet de s'affranchir des problèmes liés à la saturation de la réaction de PCR développés ci-dessus. Elle est par conséquent plus fiable et plus sensible que les techniques en point final. Cette technique a été beaucoup développée ces dernières années pour la quantification virale, en particulier celle des *herpes viridae* (51, 52)

## 2. *La PCR en temps réel*

### a) Principes généraux

Certaines conditions spécifiques à cette technique sont à respecter pour le choix des amorces et de la sondes et la détermination des conditions opératoires. Le thermocycleur est relié à un outil de mesure en continu d'un signal proportionnel à la quantité d'amplicon produit, ainsi qu'à un logiciel permettant l'analyse informatique des résultats. La qualité de l'analyse est liée à l'allure générale de la courbe, l'étape cruciale de détection de la positivité étant le point d'inflexion de celle-ci au début de l'amplification. La lecture du signal au cours des premiers cycles permet à l'appareil de se faire une ligne de base à chaque manipulation. Le seuil de détection, appelé Cycle seuil (Ct), est déterminé soit automatiquement par l'appareil, soit manuellement.

### b) Les techniques de marquage

Pour la PCR en temps réel, le marquage peut reposer sur deux types de chimie: celles des intercalants et celle des sondes(53). Parmi les premiers, le plus utilisé est le SyberGreen. Il ne s'agit pas à proprement parler d'un intercalant car il se loge dans le sillon mineur de l'ADN en cours de synthèse, environ toutes les dix bases. Sa liaison à l'ADN double brin en cours d'élongation pendant la réaction de PCR lui permet d'émettre une fluorescence à 530 nm après excitation. Cette fluorescence peut être suivie d'un cycle à l'autre et elle est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé.

La chimie des sondes est basée sur l'utilisation de sondes fluorescentes et sur le principe du transfert d'énergie. Plusieurs types de sondes ont été développés:

---

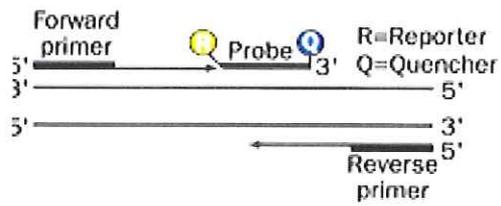
- Les sondes d'hydrolyse (technologie taqMan™)

La technologie Taqman est une technique d'amplification génique en temps réel de développement récent. Le principe repose sur l'introduction dans le mélange réactionnel habituel d'une sonde marquée de part et d'autre par un fluorochrome "reporter" dérivé de la fluorescéine (FAM) en 5' et un fluorochrome "quencher" dérivé de la rhodamine (TAMRA) en 3'. Cette sonde est un oligonucléotide dont la séquence est située entre les deux amorces de la région à amplifier. Les cycles d'amplification comprennent une étape supplémentaire d'hybridation de la sonde entre la dénaturation et l'hybridation des amorces. Pour cela, la température d'hybridation de la sonde doit être supérieure à celle des amorces. De plus, la séquence de la sonde ne doit pas commencer par un G en 5', sinon la Taq polymérase ne réalise pas l'hydrolyse de la sonde et l'élongation ne peut pas se faire.

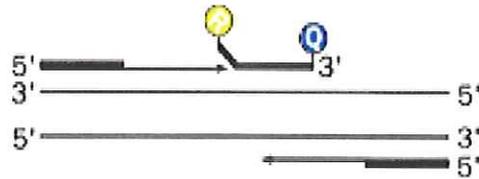
La proximité des deux fluorochromes provoque un transfert d'énergie de résonance (FRET) du Reporter vers le Quencher, c'est à dire que ce dernier absorbe la fluorescence émise par le Reporter soumis à une source d'excitation (phénomène de quenching). Lorsque la séquence cible d'ADN est présente, la polymérase procède à l'élongation à partir d'une des deux amorces hybridées. Lorsqu'elle rencontre la sonde hybridée, elle la clive grâce à son activité 5'-3' exonucléasique. Le Reporter ainsi libéré, s'éloigne du Quencher et sa fluorescence devient détectable. A chaque cycle d'amplification, une molécule de Quencher est libérée qui entraîne une augmentation de la fluorescence mesurée.

Les instruments de quantification de deuxième génération sont des thermocycleurs sur lesquels des systèmes optiques ont été montés. Ils ont pour intérêt la disponibilité de deux à quatre longueurs d'onde d'excitation. Le Rotor-Gene™2000, développé par Corbett Research, en fait partie. Il est caractérisé par un système de chauffage à air pulsé.

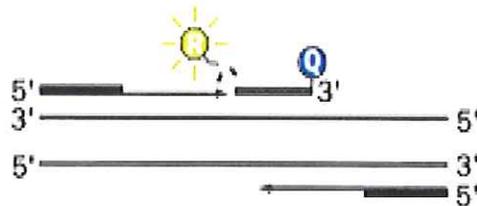
### Polymerization



### Strand displacement



### Cleavage



### Polymerization completed

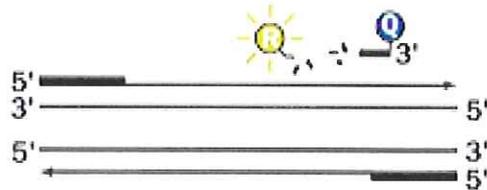


Figure 14 Différentes étapes de la réaction TaqMan: la sonde (probe), marquée de part et d'autre par un Reporter (R) et un Quencher (Q), est clivée par l'ADN polymérase lors de l'élongation. L'éloignement des deux fluorochromes provoque une émission de fluorescence.

---

### Les sondes d'hybridation FRET de Roche™

Ce système est basé sur l'utilisation d'un couple de sondes marquées l'une par un fluorophore "donneur" à son extrémité 3', l'autre par un fluorophore "accepteur" à son extrémité 5'. Lorsqu'au cours de la réaction de PCR les deux amorces s'hybrident à l'ADN et se positionnent de façon adjacente, l'excitation du fluorophore "donneur" provoque une émission de fluorescence qui excite à son tour le fluorophore "accepteur". C'est la fluorescence spécifique de ce dernier, proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée, qui est détecté par l'appareil.

#### - Les sondes d'hybridation Molecular Beacons

Il s'agit de sondes d'hybridation caractérisées par une structure repliée "tige-boucle". Elles portent un Reporter à l'extrémité 3' et un Quencher à l'extrémité 5'. La séquence spécifique de la cible est située au niveau de la boucle et les séquences latérales sont complémentaires entre elles, afin de stabiliser la structure. En l'absence de cible, cette conformation permet le rapprochement des fluorophores et donc le transfert de la fluorescence du reporter vers le Quencher. Lors de l'hybridation à la cible, la sonde change de conformation et l'éloignement du Reporter et du Quencher permet à ce dernier d'émettre sa fluorescence. Le signal est alors mesuré par l'appareil.

### 3. Construction d'un standard

L'intensité du signal de détection permet de mesurer la quantité d'acides nucléiques si la relation linéaire entre les deux paramètres est parfaite. Cependant, les coefficients de cette relation ne sont jamais parfaitement identiques d'une manipulation à l'autre. Il est donc nécessaire d'introduire à chaque fois un étalon ayant une concentration connue et stable en acides nucléiques viraux. La gamme étalon permet de valider la réaction et d'extrapoler la valeur de l'échantillon étudié par proportionnalité avec ses propres valeurs.

#### a) Différents types de standard

##### (1) standard endogène

Un standard endogène est une séquence nucléotidique présente naturellement dans l'échantillon à analyser, par exemple le gène domestique de la  $\beta$  globine, dont un exemplaire est présent dans toutes les cellules. Ce type de standard a l'avantage de permettre le contrôle de l'ensemble des étapes d'extraction et d'amplification et des variations inter tube.

##### (2) standard exogène

Le standard exogène est une séquence nucléotidique synthétisée par PCR ou intégrée au sein d'un plasmide. Dans la technique de PCR compétitive, il est introduit dans l'échantillon à analyser. Il est donc nécessaire qu'il diffère de la séquence à amplifier mais que les mêmes amorces puissent être utilisées au cours de la PCR. Il peut être construit en modifiant légèrement la séquence du produit de PCR recherché par délétion ou insertion. En ce qui concerne la technique de PCR en temps réel, il existe très peu de variations inter tube. L'ensemble de la procédure est contrôlée par l'introduction d'un contrôle interne dans l'échantillon, avec ses propres amorces et sa propre sonde marquée par un fluorochrome de longueur d'onde différente de ceux utilisés pour marquer la sonde spécifique de la séquence à

amplifier. Une gamme de dilutions d'un standard exogène (qui peut être soit un produit de PCR soit un plasmide), de concentration connue, est analysé en parallèle.

### b) Principe de clonage d'un vecteur

L'insertion d'un produit d'amplification génomique dans un plasmide permet d'obtenir un ADN recombiné (ADN/plasmide). Ils possèdent dans leur génome les signaux nécessaires à leur répllication, mais ne savent pas se multiplier d'eux même. Ils doivent donc être introduits dans des cellules hôtes (en général des bactéries).

La sélection des bactéries ayant incorporé le DNA recombiné repose sur le principe de l' $\alpha$  complémentation. En effet, les vecteurs utilisés possèdent un fragment du gène lacZ, codant pour le peptide  $\alpha$ , correspondant à la partie amino-terminale de la  $\beta$  galactosidase. Le peptide  $\alpha$  n'a pas d'activité  $\beta$  galactosidase, mais il peut compléter une bactérie mutante qui elle, à l'inverse, possède un gène défectif codant pour une  $\beta$  galactosidase dépourvue des acides aminés 11 à 41, et de ce fait inactive. Si un ADN étranger, inséré dans la région lacZ, change la phase de lecture, il empêchera l' $\alpha$  complémentation, et provoquera la formation de plages blanches en présence des réactifs X Gal et IPTG. En effet, pour mettre en évidence une activité  $\beta$  galactosidase, ces deux réactifs sont indispensables: l'IPTG (isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside) permet de déréguler la synthèse de  $\beta$  galactosidase. Le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$  D-galactosidase) est un  $\beta$  galactoside hydrolysé par la  $\beta$  galactosidase, libérant une substance X colorée en bleu. La sélection des colonies bactériennes transformées se fait sur la couleur: les colonies blanches sont celles qui possèdent le vecteur ayant intégré le segment d'ADN à cloner, les colonies bleues sont celles qui ne possèdent pas le vecteur, ou chez lesquelles celui ci n'a pas intégré le segment d'ADN.

---

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. MATÉRIEL

#### 1. *Patients*

Les patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale entre le 1er Décembre 2001 et le 31 décembre 2002 sont surveillés à intervalle régulier. Sur un total de 192 nouveaux greffés rénaux au cours de ces 13 mois, 118 ont pour l'instant pu être suivis dans le cadre de notre travail. Aucun critère d'exclusion n'a été appliqué. Le statut sérologique du receveur et du donneur vis à vis du BK virus n'a pas été recherché. La surveillance virologique des patients est prévue à 1, 2, 3, 6, 9 et 12 mois post transplantation, à l'occasion de consultations de suivi systématique. Quatre autres patients ont été étudiés de façon rétrospective. Il s'agit de patients pour lesquels une néphropathie à BK virus a été diagnostiquée dans les mois suivant une transplantation rénale

#### 2. *Prélèvements biologiques*

Les prélèvements acheminés au laboratoire, en structure pré PCR, comprennent pour chaque patient un échantillon de 5 ml d'urines de 24 heures, et un ou deux tubes de 3 ou 7 ml de sang EDTA. Ce dernier est centrifugé afin de récupérer le plasma. Urine (UR) et plasma (SE) sont conservés à -20°C en attendant l'étape d'extraction des acides nucléiques. Lorsque une PCR EBV est réalisée sur le même prélèvement, les cellules mononucléées sont séparées préalablement par Ficoll (milieu de séparation des lymphocytes, MSL Eurobio). Une PCR CMV nécessite la séparation des polynucléaires par Dextran (Sigma), sur un tube EDTA distinct. L'un des patients présentant une néphropathie à BK virus est suivi à Nantes, nous avons donc repris les extraits d'acides nucléiques et prélèvements primaires conservés à -20°C. Les trois autres sont suivis à Brest, les échantillons plasmatiques et urinaires nous ont été envoyés congelés par le laboratoire de microbiologie du CHU de Brest.

### 3. Amorces et sondes utilisées pour la PCR temps réel

La séquence amplifiée, d'une taille de 85 pb, correspond à une portion du gène précoce codant pour le Large T Ag, qui constitue une zone conservée et spécifique du génome du BK virus.

Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer Express à partir de la séquence complète de la souche de référence Dunlop disponible sur Genbank. Les amorces sens et antisens ont toutes les deux une taille de 21 bases, leurs températures de fusion ( $T_m$ ) sont proches, respectivement 67,4 et 67,8°C, et leurs séquences sont sélectionnées de façon à éviter la formation de boucles intracaténaïres et de dimères d'amorces. Leur spécificité pour la séquence à amplifier a été vérifiée à l'aide du logiciel Blast. Elles sont synthétisées par Genosys, fournies sous forme déssalée et purifiée, et reconstituées en eau distillée à la concentration de 200  $\mu$ M.

La sonde mesure 30 bases, sa position a été choisie, comme pour les amorces, à l'aide du logiciel Primer Express, et son  $T_m$  est de 86°C, c'est à dire supérieur d'environ 15°C à celle des amorces. Elle a été synthétisée par Eurogentec, fournie sous forme lyophilisée, reconstituée en eau distillée de façon à obtenir une solution mère d'une concentration de 200  $\mu$ M, puis conservée à -20°C. Sa spécificité pour la séquence cible, ainsi que l'absence d'hybridation avec les amorces ont été vérifiées. Elle est marquée à chacune de ses extrémités par un fluorochrome, FAM en 5' et Tamra en 3'.

**Tableau 2: Séquences des amorces et de la sonde. La position sur la séquence complète de la souche de référence Dunlop est précisée**

		Séquence	position
Amorce sens	Genosys	5'-GACATAGCATGCAAGGGCAGT-3'	4811-4831
BK VIRUSRG1			
Amorce antisens	Genosys	5'-CCTCTTTGCCAGATACCCTG-3'	4895-4875
BK VIRUSRG2			
Sonde BK	Eurogentec	5'Fam-CACAGAAGGCTTTTTGGAACAAATAGGCCA-Tamra-3'	4833-4862
VIRUSSRG			

#### *4. Thermocycleur*

L'appareil de PCR temps réel utilisé est le **Rotor-Gene™2000** (Corbett Research, Ozyme). Il s'agit d'un thermocycleur relié à un bloc optique avec un système de chauffage par air pulsé. Le Rotorgène sur lequel la mise au point a été réalisée possède deux canaux de lecture.

#### *5. Témoins positifs*

Le témoin positif utilisé pour la PCR BK VIRUS est un extrait d'acides nucléiques issu d'un prélèvement urinaire d'une patiente ayant présenté une néphropathie à BK virus documentée par une biopsie rénale positive, et pour laquelle la PCR qualitative classique était positive.

#### *6. Contrôle interne*

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

#### *7. Composants du mélange réactionnel pour la PCR*

La Taq polymérase est la "Hot Start" Polymérase Q-BIOgene, fournie avec le tampon 10X et le MgCL<sub>2</sub> 25 mM. Les dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont fournis par Roche à la concentration initiale de 200 mM. Une solution à 10 mM composée des quatre nucléotides à quantités égales (50 µl de chaque et 1800 µl d'eau) est reconstituée en eau distillée stérile, aliquotée et conservée à -20°C.

## 8. Vecteur pGEM-T Easy

Le vecteur T commercialisé par Promega a comme intérêt de présenter un T à chaque extrémité, permettant l'insertion facile de produits de PCR amplifiés par une ADN polymérase thermostable de type Taq, car cette enzyme ajoute un A à chaque extrémité 3' des fragments amplifiés. Il possède le fragment lacZ codant pour l' $\alpha$  peptide, de nombreux sites de restriction, et un gène de  $\beta$  lactamase permettant la sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide (figure 15). Les bactéries mutantes utilisées sont les bactéries JM 109 (Promega), souches d'*Escherichia coli* non pathogène pour l'homme, possédant la mutation lacZ $\Delta$ M15 (c'est à dire ne synthétisant pas les acides aminés 11 à 41 du peptide  $\alpha$ ).

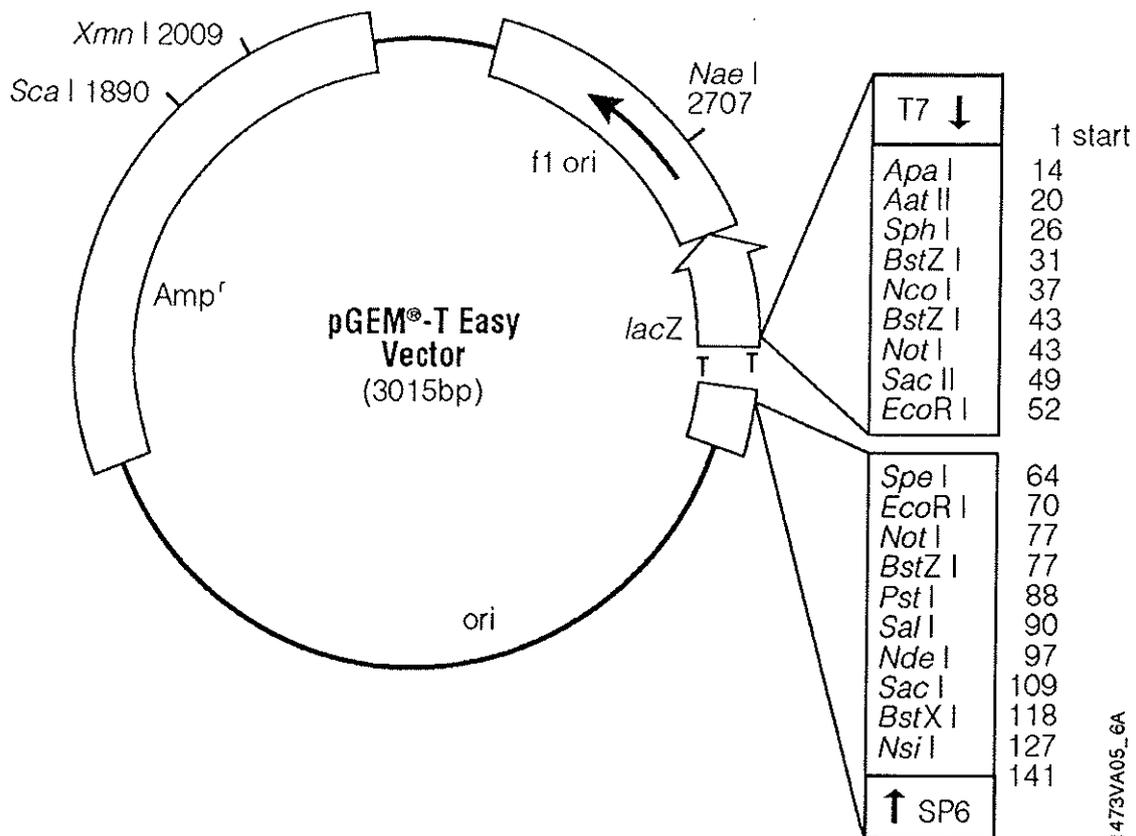


Figure 15 Schéma représentant la structure du vecteur plasmidique pGEM T Easy

## B. MÉTHODES

### 1. *Extraction des acides nucléiques*

L'extraction de l'ADN viral à partir du plasma et des urines est en routine réalisée au laboratoire à l'aide du kit "QIAamp Viral RNA Mini Kit" (QIAGEN), selon les recommandations du fabricant (cf annexe 1). Le principe d'extraction, dérivant d'une technique de fixation-élution, repose sur l'utilisation d'une membrane sélective en gel de silice. Ce kit permet l'extraction des ADN aussi bien que des ARN viraux. Un témoin d'extraction est réalisé au sein de chaque série avec du tampon PBS.

Une autre technique a été évaluée pour les urines, et comparée à la technique d'extraction QIAGEN. Elle consiste à déposer directement un échantillon du prélèvement après chauffage à 100°C pendant 10 minutes et centrifugation 5 min à 2500 rpm.

### 2. *Amplification par PCR*

Au cours de la mise au point, différentes concentrations de MgCl<sub>2</sub> (5, 6, 7, 9 mM) et de Taq polymerase (0,125 ou 0,25 µl/réaction) ont été testées. Les concentrations finales des autres composants du mélange réactionnel sont:

- tampon Q-BIOgene 1X;
- 0,2 mM de chaque dNTP A,U,C,G;
- 0,5 mM de chacune des amorces BK VIRUSRG1 et BK VIRUSRG2;
- 0,3 mM de sonde BK VIRUSSR
- mix IPC 0,5X (sonde et amorces)
- IPC DNA 0,5X
- eau distillée stérile (qsp 22,5 µl).

Un volume de 2,5 µl d'acides nucléiques est déposé soit après extraction Qiagen, soit après chauffage-centrifugation pour les urines.

Plusieurs programmes d'amplification ont été testés, faisant varier la température d'hybridation (58,60,62°C) et la concentration en MgCl<sub>2</sub>. Les protocoles déjà en cours au laboratoire pour l'Epstein Barr virus et le Parvovirus B19 ont été utilisés pour définir les différentes étapes de la PCR temps réel. Quarante cinq cycles d'amplification sont réalisés, avec des cycles de trois étapes.

La spécificité de la technique a été vérifiée en analysant des témoins positifs pour d'autres virus à ADN: JC virus, HSV, VZV, CMV, EBV, Parvovirus B19, HHV6, HHV7.

### *3. Interprétation des résultats de la PCR*

Les critères de validation de la technique de PCR en temps réel sont:

- l'allure générale des courbes d'amplification, permettant de définir facilement le cycle à partir duquel la fluorescence passe la ligne de seuil (cycle seuil Ct). Les courbes sont de type sigmoïde, comprenant un point d'inflexion net (Ct), une phase exponentielle et une phase de saturation.
- la négativité du témoin d'extraction (Ct>45)
- l'amplification des témoins positifs (Ct<40)
- l'amplification du contrôle interne (Ct<40) qui permet de vérifier l'absence d'inhibiteurs de PCR dans chaque tube.

Tous les prélèvements sont amplifiés une première fois sans la gamme étalon. Le résultat qualitatif est rendu soit "N" pour négatif, soit "PFA" pour positif faible lorsque le cycle de positivité dépasse 30 Ct, soit "P" pour positif (Ct supérieur à 30). Les échantillons positifs faibles ou positifs sont analysés sur une deuxième amplification en parallèle avec la gamme de standard pour la quantification. La charge virale est ensuite exprimée en copies/ml ou en log copies/ml.

#### *4. Construction d'un plasmide*

##### **a) Purification des produits PCR**

Une amplification génomique à partir d'un extrait positif connu, pur et dilué au 1/10, a été réalisée en parallèle dans deux mélanges réactionnels: le premier, contenant la sonde d'hydrolyse, a permis de s'assurer du bon déroulement de l'amplification; le deuxième, ne contenant pas de sonde, a servi secondairement à la purification du produit de PCR par technique enzymatique. Pour cela, 4 µl d' EXOSAP-IT (USB Corporation) sont ajoutés à 10 µl de produit de PCR. ExoSAP-IT contient l'enzyme Exonucléase I et une phosphatase alcaline. Le mélange est incubé 15 min à 37°C (température à laquelle l'exonucléase I est active) puis 15 min à 80°C sur le GeneAmp PCR system 9 600 (Perkin Elmer). La pureté du produit ainsi obtenu a été vérifiée par la réalisation d'une migration électrophorétique en gel de polyacrylamide 9%. L'amplicon est ensuite conservé à -20°C.

##### **b) Clonage dans pGEM-T easy**

Le clonage du produit de PCR dans le vecteur pGEM T Easy nécessite une première étape de ligation, permettant l'insertion de l'amplicon, une deuxième étape de transformation des bactéries compétentes par choc thermique suivie de la culture et de la sélection des colonies transformées. Le plasmide est ensuite extrait et la présence de l'amplicon est vérifiée après digestion enzymatique par migration électrophorétique. La composition des milieux utilisés au cours des différentes étapes est détaillée en annexe.

###### **(1) ligation**

Le vecteur pGEM T Easy est fourni avec les différents éléments du mix de ligation. Celui ci comprend l'enzyme T4 DNA ligase, le tampon de ligation, et un contrôle ADN d'intégration.

Quatre mélanges réactionnels, contenant des concentrations différentes du produit de PCR purifié, le plasmide pGEM T Easy et l'enzyme T4 DNA ligase sont préparés (tableau 3) et incubés une heure à température ambiante.

**Tableau 3: Composition des différents mélanges testés pour la réaction de ligation**

	A (en $\mu$ l)	B (en $\mu$ l)	C (en $\mu$ l)	D (en $\mu$ l)
tampon T4 DNA ligase	5	5	5	5
pGEM TEasy	1	1	1	1
amplicon BK VIRUS	1 (pur)	1 (dilué au 1/10)	2 (dilué au 1/10)	-
contrôle ADN	-	-	-	1
T4 DNA ligase	1	1	1	1
H2O distillée stérile ( qsp 10 $\mu$ l )	2	2	1	2

## (2) transformation des bactéries JM109

A la fin de l'incubation, un tube de 200  $\mu$ l de bactéries compétentes JM109 ( $>10^8$  cfu/ $\mu$ g), conservées à  $-80^\circ\text{C}$ , est déposé dans de la glace. Quatre tubes Falcon 10 ml, ainsi que du milieu SOC auquel ont été ajoutés extemporanément du magnésium et du glucose, sont déposés sur la glace.

50  $\mu$ l de bactéries JM109 et 2  $\mu$ l de mix ligation sont mélangés délicatement dans chaque tube falcon, et incubés 20 minutes à  $+4^\circ\text{C}$ . Les tubes sont ensuite déposés rapidement dans un bain marie réglé à  $+42^\circ\text{C}$ , pendant exactement 50 secondes. Ils sont ensuite à nouveau transférés sur la glace pendant 2 minutes. Dans chaque tube sont ajoutés 950  $\mu$ l de milieu SOC supplémenté, le tout est incubé 1h30 à  $37^\circ\text{C}$ , avec agitation. Cent microlitres de chaque milieu contenant des bactéries transformées sont enfinensemencés sur des boites de culture préparées préalablement. Il s'agit d'un milieu LB auquel ont été ajoutés de l'IPTG 0,1 M , X-

Gal , et ampicilline. Les boites sont incubées 18 heures à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humidifiée.

Le lendemain, quelques colonies blanches (ayant donc intégré le vecteur contenant l'amplicon), sont réisolées sur des boites MH auxquelles un disque d'ampicilline est ajouté afin de s'assurer qu'il s'agit de bactéries résistantes à l'ampicilline, et non d'une contamination.

Les cultures sont incubées 24 heures à 37°C sous CO<sub>2</sub> 5%.

A partir de la culture pure de bactéries transformées ainsi obtenue, les colonies sont inoculées dans 10 ml de milieu LB liquide et incubées 24 heures à 37°C sous agitation.

Les souches transformées d'E.Coli JM109 sont conservées à -80°C sur des billes de latex, après repiquage sur pente TS 72 heures à 37°C sous CO<sub>2</sub> 5% pour obtenir des cultures jeunes.

### c) Vérification du résultat

#### (1) Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction plasmidique est réalisée avec le kit QIAmp Plasmid Minikit (QIAGEN), en suivant les recommandations du fabricant. Dix ml de milieu de culture liquide contenant les bactéries transformées sont centrifugés 10 minutes à 6500rpm, à +4°C. Le culot est repris dans 0,3 ml de tampon P1, puis transféré dans un tube Eppendorf. Trois cent microlitres de tampon de lyse P2 sont alors ajoutés, l'ensemble étant mélangé par retournement, puis incubé cinq minutes à température ambiante. Une nouvelle incubation de cinq minutes est ensuite réalisée sur la glace après ajout de 300 µl de tampon P3. L'ensemble est ensuite centrifugé 10 minutes à 10000 rpm, puis le surnageant est déposé sur une colonne Qiagen préalablement lavée avec un tampon. Quatre lavages successifs sont réalisés, puis la colonne est déposée sur un nouveau tube Eppendorf . L'étape suivante est une élution, suivie d'une précipitation par de l'isopropanol stabilisé à température ambiante. Après 30 minutes de centrifugation à 10000

rpm, le surnageant est éliminé et un dernier lavage est effectué avec 1 ml d'éthanol 70%. Le culot obtenu après centrifugation 10 minutes à 10000 rpm est séché à l'étuve à 37°C, puis repris dans 30 µl d'eau stérile.

### (2) digestion enzymatique

Une digestion enzymatique du plasmide ainsi extrait est réalisée avec l'enzyme de restriction EcoR1, qui possède des sites de coupure de part et d'autre des sites d'insertion de l'amplicon. Un µl de l'extrait plasmidique est incubé pendant une heure avec un 1 µl d'EcoR1, 2 µl de tampon de digestion et 16 µl d'eau distillée, à 37°C.

### (3) électrophorèse en gel de polyacrylamide

La révélation des produits obtenus après extraction et digestion enzymatique est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide 9%. La préparation du gel se fait avec 10 ml d'acrylamide/bisacrylamide 37,5/1, 10 µl de Temed et 100 µl d'ammonium persulfate. Un marqueur de taille est déposé en parallèle de l'échantillon à analyser.

## 5. *Analyse statistique*

Les données cliniques analysées associent des paramètres démographiques ainsi que des éléments cliniques et biologiques du suivi post greffe. Les premiers concernent l'âge, le sexe, la date de greffe, la durée de dialyse et la néphropathie initiale. Ces dernières ont été classées en sept groupes:

- Insuffisance rénale terminale d'étiologie inconnue
- Glomérulonéphrites
- Néphropathies tubulo-interstitielles
- Polykystose rénale
- Maladies congénitales
- Néphropathies vasculaires

---

- Maladies systémiques

Les éléments cliniques et thérapeutiques du suivi post greffe retenus sont: la durée d'ischémie froide, le nombre d'identité HLA, la survenue d'épisodes de rejet aigu, de complications infectieuses (infection urinaire, pyélonéphrite aigue) ou urologiques (fistule, sténose, ou nécrose urétérale), la nature des traitements immunosuppresseurs d'induction (SAL, Simulect) et d'entretien (cyclosporine, tacrolimus, corticothérapie). Les éléments biologiques étudiés associent la recherche de réactivation du Cytomégalovirus ou du virus d' Epstein Barr par PCR, la créatininémie plasmatique ainsi que sa clairance, et la protéinurie des 24 heures.

La recherche d'une relation entre la survenue d'une PCR BK positive dans les urines et/ou le plasma avec un caractère qualitatif (sexe, rejet, infection, complication urologique, SAL, Simulect, traitement d'entretien, PCR EBV, PCR CMV, corticothérapie) est réalisée à l'aide du logiciel Epi Info: le  $\chi^2$  et le risque relatif sont calculés à partir d'un tableau 2x2 (comparaison de deux moyennes). La recherche d'une relation avec un caractère quantitatif (âge, créatininémie, durée de dialyse, durée d'ischémie froide, nombre d'identités HLA), a été recherchée par le test de Student.

## ANNEXES

### QIAAMP VIRAL RNA MINI KIT

- **Préparation des réactifs:**

- **Buffer AVL:**

Incuber à 80°C jusqu'à dissolution totale du précipité

Ajouter 1ml de Buffer AVL à 1 tube de RNA CARRIER.

Dissoudre et transférer dans le flacon.

Aliquoter dans des tubes eppendorf de 1,5ml sous 560µl.

Conserver jusqu'à 6 mois à 4°C

Ne pas incuber à 80°C plus de 5mn (dégradation du RNA CARRIER)

- **Buffer AW1:**

Ajouter 125 ml d' Ethanol Absolu (volume final : 220ml)

Conserver 1 an à T° ambiante.

- **Buffer AW2:**

Ajouter 160 ml d' Ethanol Absolu (volume final : 226ml)

Conserver 1 an à T° ambiante.

- **Protocole de purification de l'ADN et de l'ARN**

Sortir les tubes de buffer AVL et dissoudre totalement le tampon RNA Carrier/buffer AVL au bain-marie 56°C.

Ajouter 140 µl de prélèvement ( si volume inférieur, compléter avec du PBS stérile)

Vortexer

Incuber au moins 10mn à t° ambiante (un délai supérieur n'affecte pas la qualité de l'extraction).

Ajouter 560µl d'Ethanol absolu et vortexer.

Installer les colonnes bouchon ouvert sur le *QIAvac 6S Vacuum Manifold*

Brancher le tuyau sur la trompe à vide et ouvrir l'eau.

Déposer 630µl du mélange sans mouiller les bords de la colonne. laisser le lysat traverser la colonne et déposer ensuite le reliquat, laisser filtrer

Déposer 750µl de Buffer AW1. filtrer.

Déposer 750µl de Buffer AW2. filtrer.

Fermer le robinet d'eau et fermer les colonnes .

Placer la colonne sur un tube collecteur (fourni dans le coffret)

Centrifuger à 14000trs 3mn (Centrifugeuse JOUAN A14) pour éliminer toute trace de tampon AW

#### **Elution**

Placer la colonne sur un tube à centrifuger de 1,5ml

Ajouter 60µl de tampon AVE (eau RNase free + 0.04% azide de sodium)

Incuber 1mn à T° ambiante. Centrifuger à 8000trs 1mn.

L'ARN-ADN ainsi élué est stable 1an à -20°C

#### **COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISÉES LORS DU CLONAGE**

- **Milieu SOC (Pour 100ml):**

Bacto®-tryptone: 2 g

Bacto®-yeast extract: 0,5g

NaCl 1M: 1ml

KCl 1M: 0,25 ml

Mg<sup>2+</sup>: 1 ml (stérilisé par filtration)

glucose: 1 ml (stérilisé par filtration)

eau distillée stérile qsp 100ml

Solution autoclavée, filtrée, pH 7

- **Milieu LB modifié**

milieu LB: 100 ml

ampicilline: 100 µg/ml

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside): 80 µg/ml

[solution stock 100 mM conservée à -20°C (100 mg dans 2 ml N,N' diméthyl-formamide)]

IPTG [solution stock 0,1 M conservée à +4°C]: 0,5 mM/ml

### III. RESULTATS

La première étape du travail a permis la mise au point de la PCR en temps réel et l'optimisation des différentes étapes de l'analyse des échantillons (extraction des acides nucléiques, PCR qualitative, quantification génomique). Ces outils ont ensuite été utilisés pour l'évaluation prospective des infections à BK virus observées dans une cohorte de patients transplantés au cours de l'année 2002.

#### A. MISE AU POINT DES CONDITIONS DE LA PCR EN TEMPS RÉEL

##### 1. *Concentration en Taq Polymérase*

La Taq polymerase "Hot Start" QBiogen, fournie à la concentration de 40 UI/ $\mu$ l, a été testée à deux concentrations différentes (0,2 UI/ $\mu$ l et 0,4 UI/ $\mu$ l). Les cycles seuils obtenus pour 11 dilutions de la solution mère de standard sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4: Influence de la concentration en Taq polymérase sur la réaction d'amplification.

dilution de standard	Ct / (0,4 UI/ $\mu$ l)	Ct / (0,2 UI / $\mu$ l)
$10^{-2}$	6,5	7,2
$10^{-3}$	8,7	9,7
$10^{-3}$	12,9	13,2
$10^{-4}$	16,6	17,5
$10^{-5}$	19,9	20,1
$10^{-6}$	22,8	23,2
$10^{-7}$	26,5	26,5
$10^{-8}$	29,7	30,0
$10^{-9}$	32,0	32,6
$10^{-10}$	35,9	36,4
$10^{-11}$	>45	>45

Les différents points de la gamme de standard se positivent en moyenne un cycle plus tôt pour une concentration de 0,4 UI/ $\mu$ l mais la dernière dilution détectée positive est  $10^{-11}$  dans les deux cas.

L'augmentation de la quantité de Taq polymérase dans le mélange réactionnel ne permet pas de gagner en sensibilité, la concentration retenue est donc 0,2 UI/ $\mu$ l.

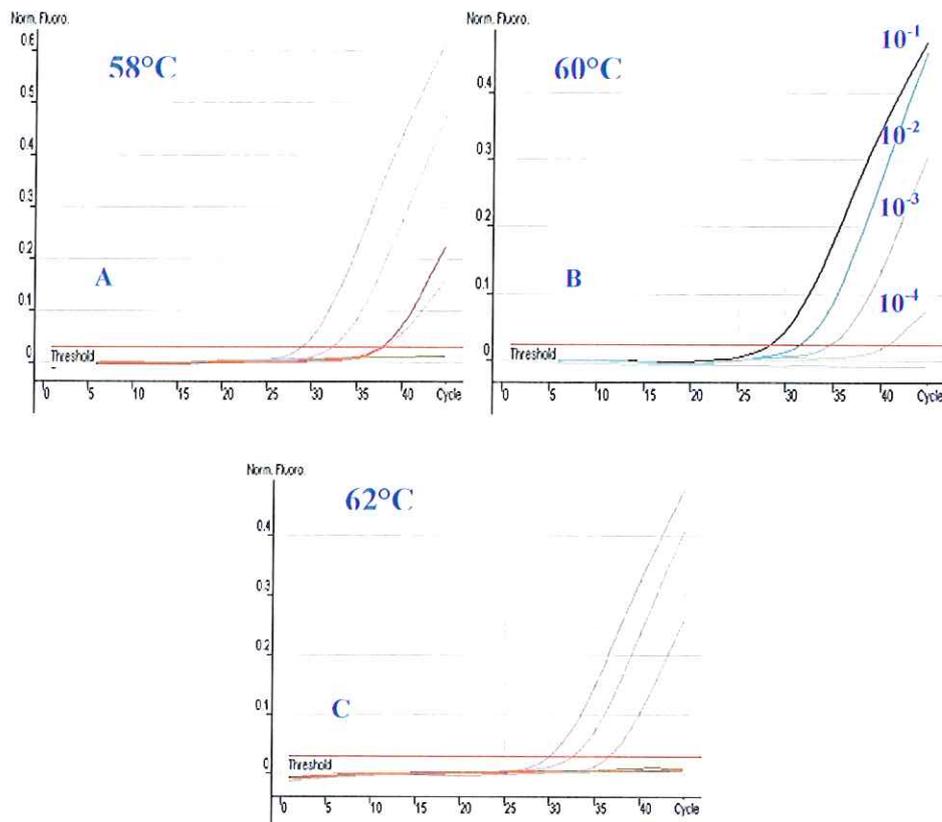
## 2. Concentration en $MgCl_2$ et température d'hybridation

Quatre concentrations de  $MgCl_2$  (5,6,7,9 mM) et trois températures d'appariement des amorces (58, 60, 62°C) ont été testées en parallèle dans les mêmes conditions opératoires sur cinq dilutions de raison dix du témoin positif ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ). Le tableau 5 reprend le résultats des Ct obtenus pour chaque température et chaque concentration en  $MgCl_2$ .

Tableau 5: Résultats des cycles seuil obtenus pour les différentes concentration en  $MgCl_2$  et les différentes températures d'appariement des amorces testées.

conc $MgCl_2$	échantillon	58°C	60°C	62°C
5 mM	témoin + $10^{-1}$	28,39	29,07	29,13
	témoin + $10^{-2}$	31,98	31,86	33,89
	témoin + $10^{-3}$	37,72	33,57	37,84
	témoin + $10^{-4}$	>45	>45	>45
	témoin + $10^{-5}$	>45	>45	>45
6mM	témoin + $10^{-1}$	29,53	ND	30,4
	témoin + $10^{-2}$	33,21	ND	32,82
	témoin + $10^{-3}$	38,17	ND	37,2
	témoin + $10^{-4}$	>45		38,37
	témoin + $10^{-5}$	>45		>45
7mM	témoin + $10^{-1}$	28,91	29,05	30,12
	témoin + $10^{-2}$	32,35	32,18	32,7
	témoin + $10^{-3}$	38,2	35,44	36,8
	témoin + $10^{-4}$	37,86	41,4	>45
	témoin + $10^{-5}$	>45	>45	>45
9mM	témoin + $10^{-1}$	30,76	29,26	30,46
	témoin + $10^{-2}$	34,87	32,58	33,52
	témoin + $10^{-3}$	37,23	36,56	35,54
	témoin + $10^{-4}$	>45	>45	>45
	témoin + $10^{-5}$	>45	>45	>45

Les courbes d'amplification sont représentées pour chaque température à la concentration de 7 mM de  $MgCl_2$  dans la figure 16.



**Figure 16: Courbes d'amplification obtenues avec une concentration de 7 mM de  $MgCl_2$  pour les dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  du témoin positif. Comparaison de 3 températures d'hybridation des amorces (58, 60, 62°C).**

La concentration en  $MgCl_2$  qui permet de détecter la plus forte dilution du témoin positif est 7 mM. A cette concentration, les résultats obtenus sont similaires pour les températures d'hybridation des amorces de 58°C ou 60°C.

### 3. Spécificité

Des extraits d'ADN, témoins positifs pour les virus HSV1, HSV2, VZV, EBV, HHV6, HHV8, Parvovirus B19, et surtout JC virus, ont été analysés au cours de la même réaction et amplifiés selon les mêmes conditions opératoires que des témoins positifs BK virus. Aucune amplification n'a été observée, confirmant la spécificité de la technique.

### 4. Conditions définitives de la PCR en temps réel

Les concentrations et volumes définitifs de chaque composant du mélange réactionnel pour la PCR en temps réel BK virus sur le Rotorgène sont rapportés dans le tableau 6 :

Tableau 6/ composition du mélange réactionnel de la PCR en temps réel BK virus

	concentration initiale	volume (µl)	concentration finale
Tampon 10X Q-Biogène	10 X	2,5	1 X
dNTP (A,U,C,G)	2,5 mM	2	0,2 mM
amorces BKS1RG	20 mM	0,625	0,5 mM
amorces BKS2RG	20 mM	0,625	0,5 mM
MgCl <sub>2</sub> Q-BIOgène	25 mM	7	7 mM
sonde BKVSRG	20 mM	0,375	0,3 mM
IPC (primers + sonde)	10 X	1,25	0,5 X
ADN IPC (Appleira)	50 X	0,25	0,5 X
Hot Start Q-BIOgene	5 UI	0,125	
extrait		2,5	
eau distillée		7,75	

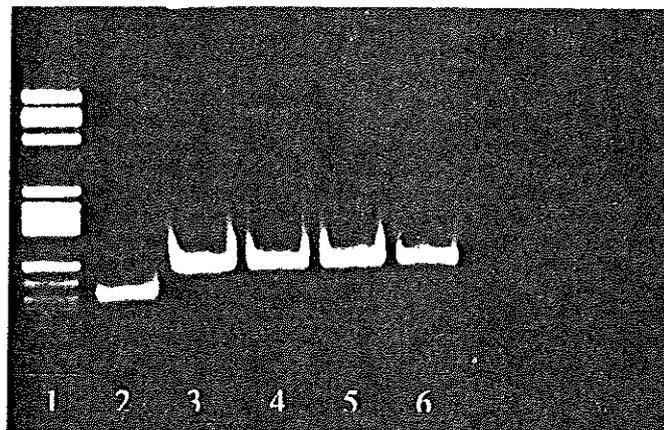
Au sein de chaque série sont insérés un témoin d'extraction et deux dilutions  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  du témoin positif.

La programmation des cycles d'amplification comprend une première étape de 15 minutes à 95°C puis 45 cycles d'amplification de trois étapes: 15 secondes à 94°C, 20 secondes à 60°C, 20 secondes à 72°C. L'acquisition du signal de fluorescence se fait sur le canal 1 (longueur d'onde) pour le BK virus et le canal 2 (longueur d'onde) pour le contrôle interne IPC.

## B. VALIDATION DE LA QUANTIFICATION PAR PCR TEMPS RÉEL

### 1. Préparation de la gamme standard

Après la ligation du produit de PCR au plasmide et la transformation des cellules JM 109, 4 colonies blanches supposées contenir le plasmide ayant intégré l'amplicon ont été ré-isolées. Une électrophorèse en gel de polyacrylamide (figure 17) a été réalisée sur les produits obtenus après extraction plasmidique et digestion enzymatique par l'enzyme de restriction EcoRI. Le produit de PCR initial a été déposé sur le même gel comme témoin.



- 1: marqueur de taille
- 2: produit de PCR
- 3-6: extraits plasmidiques après digestion enzymatique

Figure 17: Photographie de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide confirmant la présence de l'amplicon intégré au vecteur pGEM T Easy entre les sites de restriction de l'enzyme EcoRI.

La bande obtenue pour les 4 échantillons est identique, avec un poids moléculaire légèrement supérieur à celui du produit de PCR initial, ce qui s'explique par la présence de séquences plasmidiques de part et d'autres de la séquence cible après digestion avec l'enzyme de restriction.

La concentration de la solution mère du plasmide, après extraction, mesurée par spectrophotométrie, est de  $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Le ratio 260 / 280 nm, qui permet d'évaluer la pureté de l'ADN, est supérieur à 1,5.

Le nombre  $x$  de copies de plasmide dans  $1 \mu\text{g}$  est défini par la formule suivante:

$$x = 10^{-6} \text{ g} * 6,023 \cdot 10^{23} / (660 * 3100) = 2,94 \cdot 10^{11} \text{ copies}$$

où:

- 660 correspond au poids moléculaire d'une paire de bases
- 3100 est le nombre de paires de bases du plasmide ayant inséré l'amplicon
- $6,023 \cdot 10^{23}$  est le nombre d'Avogadro (nombre de molécules dans une mole)

La concentration finale de la solution mère de plasmide obtenue est donc de  $4,4 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu\text{l}$ .

La gamme de standard est préparée en effectuant des dilutions de raison 10 de la solution mère de plasmide. Onze d'entre elles ( $10^{-2}$  à  $10^{-11}$ ) sont aliquotées par volumes de  $20 \mu\text{l}$  et conservées à  $-20^\circ\text{C}$ , afin de limiter les étapes de congélation-décongélation de la gamme à chaque série.

## 2. Résultats de l'amplification de la gamme standard

Sachant que le volume d'ADN amplifié dans chaque mélange réactionnel est de 2,5  $\mu$ l, la gamme standard représentée s'étend donc théoriquement de  $10^{10}$  à 1 copie/réaction. Les courbes d'amplification et la courbe étalon correspondant sont représentées sur la figure 18.

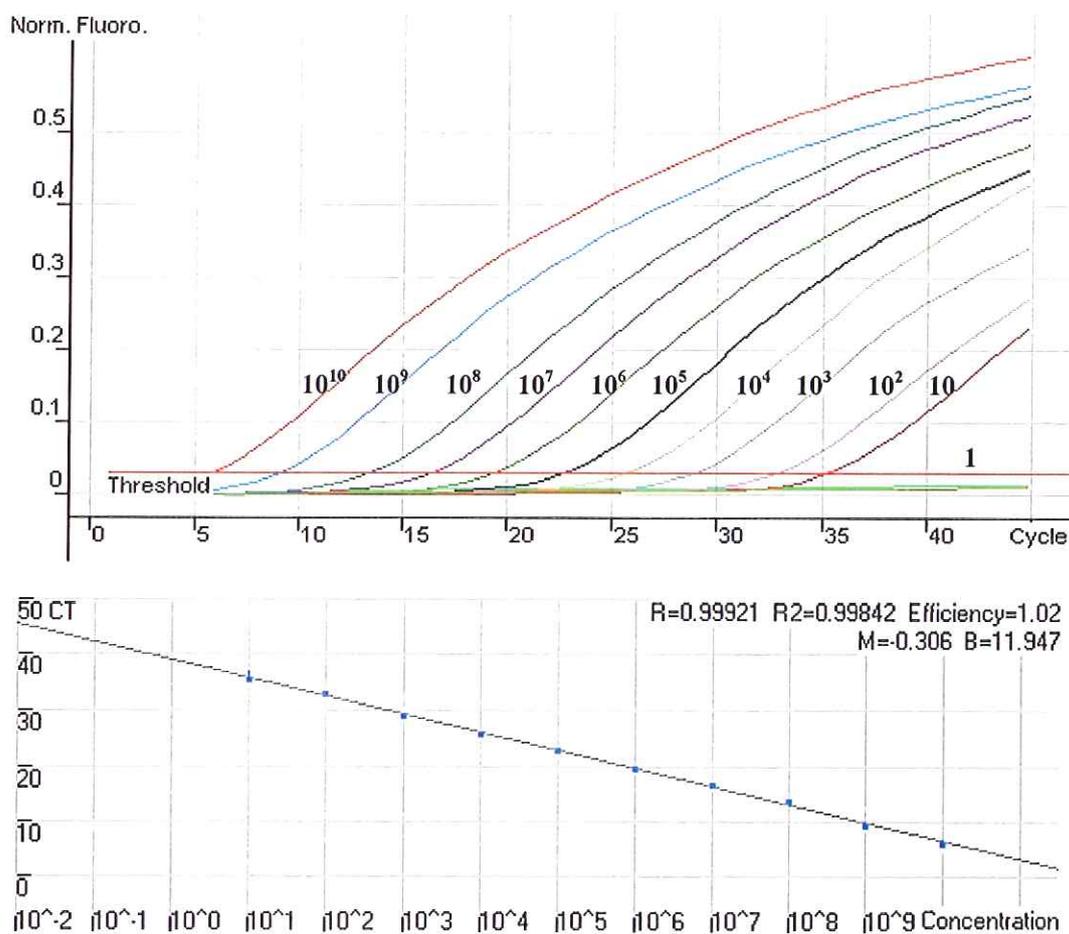


Figure 18 (A) Réactions d'amplification des différentes dilutions de la gamme standard ( $10^{10}$  copies à 1 copie par réaction). (B) Courbe étalon permettant de calculer le coefficient de corrélation linéaire (R) et l'efficacité de la réaction (efficiency).

Les résultats obtenus permettent de valider la réaction et de définir le seuil de quantification:

- Le témoin d'extraction est négatif
- Seule la dilution correspondant à une quantité théorique de 1 copie/réaction reste négative.
- Le coefficient de corrélation est calculé à 0,99, la linéarité de la réaction est donc excellente entre  $10^{10}$  et 10 copies/réaction.
- L'efficacité de la réaction, proche de 1, est également excellente

### 3. Critères de validation de la quantification

#### a) Sensibilité

La limite de détection de la réaction de quantification est de 10 copies par réaction.

#### b) Reproductibilité

La reproductibilité, ou variabilité inter-essai, a été testée pour chaque dilution de standard sur neuf expériences en utilisant le même mélange réactionnel conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  auquel la Taq polymérase était ajoutée extemporanément. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 7.

Tableau 7: Résultats des tests de reproductibilité à partir de 9 expériences. Moyennes des cycles seuils (Ct) et coefficients de variation.

copies/réaction	$10^{10}$	$10^9$	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$
moyenne de Ct	7,5	10,3	14,9	18,1	21,0	24,7	27,7	31,2	34,4	37,5
écart type	0,11	0,25	0,48	0,34	0,52	0,66	0,58	0,38	0,74	1,31
CV%	1,48	2,40	3,23	1,86	2,45	2,66	2,08	1,23	2,14	3,49

Les résultats obtenus sont satisfaisants, car les CV inter essai varient de 1,23 et 3,49%.

### c) Répétabilité.

La répétabilité, ou variabilité intra essai, a été effectuée sur dix replicates de chaque dilution de standard avec le même mélange réactionnel. Les résultats sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8: Moyennes des Ct et coefficient de variation obtenus pour l'étude de la variabilité intra essai (répétabilité).

copies/réaction	$10^{10}$	$10^9$	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10
moyenne de Ct	7,20	9,88	14,61	17,98	21,21	24,45	25,60	30,11	32,48	36,28
Ecart type	0,34	0,48	0,71	0,42	0,41	0,67	0,49	0,51	0,37	1,06
CV	4,73	4,89	4,84	2,32	1,93	2,75	1,90	1,70	1,13	2,93

Le coefficient de variation obtenu varie de 1,1 pour 100 copies /réaction à 4,9 pour  $10^9$  cop/réaction. Il est donc satisfaisant.

## C. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

### 1. *Comparaison de deux techniques d'extraction*

Lors de l'extraction d'urines pour lesquelles la charge virale s'est révélée très élevée, nous nous sommes heurté à un problème d'inter-contamination des échantillons illustré par la positivité du témoin d'extraction. Afin de limiter au maximum ces risques de contamination liés aux manipulations itératives, nous avons décidé de déposer directement 2,5  $\mu$ l d'urines dans le mélange réactionnel, sans étape d'extraction Qiagen préalable. Un aliquot de chaque échantillon urinaire est ainsi chauffé 10 minutes à 100°C, puis centrifugé brièvement et utilisé tel quel dans la PCR. Afin de valider cette procédure, chaque échantillon urinaire d'une série a été analysé deux fois, soit après extraction Qiagen classique, soit directement après chauffage-centrifugation (cf tableau 9).

Tableau 9: Comparaison des résultats des Ct d'échantillons urinaires après extraction Qiagen ou purs chauffés centrifugés.

	Ct après extraction	Ct urines pures
1	> 45	> 45
2	> 45	> 45
3	> 45	> 45
4	> 45	> 45
5	9,2	10,7
6	34,9	30,5
7	15,7	10,0
8	38,8	> 45
9	21,4	21,5
10	9,9	9,4
11	26,9	26,6
12	12,9	13,9

Nous avons obtenu une très bonne corrélation entre les deux techniques, que ce soit pour des échantillons à charge virale élevée (Ct bas) ou non (Ct élevé). Cette corrélation nous permet de valider la procédure de chauffage centrifugation. Dans certains cas, une inhibition de la réaction de PCR est observée, l'échantillon urinaire est alors dilué au 1/5e en eau distillée ultra pure et réanalysé lors de la série suivante.

## *2. Détermination du seuil de quantification en fonction de la nature du prélèvement*

En raison du traitement différent des échantillons urinaires et plasmatiques, les seuils de quantification sont différents. En prenant en compte toutes les étapes du protocole pour le traitement des échantillons plasmatiques (prise d'essai avant extraction 140 µl, volume après extraction 60 µl, dépôt 2,5 µl et seuil de sensibilité de la PCR de 10 copies/réaction), le seuil de détection est donc fixé à 1700 copies/ml. Pour les échantillons urinaires, déposés sans extraction préalable, le seul facteur de correction est lié au volume déposé dans le mélange réactionnel (2,5 µl) et le seuil de détection est de 4000 copies/ml.

### 3. Interprétation des résultats

Les résultats de la quantification d'échantillons de patients sont calculés par l'automate à partir de la courbe étalon. La figure 19 illustre une quantification effectuée sur 8 échantillons de patients à partir de 4 points de gamme. La figure 20 représente l'amplification du contrôle interne (IPC) détectée sur le canal 2. Le tableau 20 présente les valeurs calculées des charges virales.

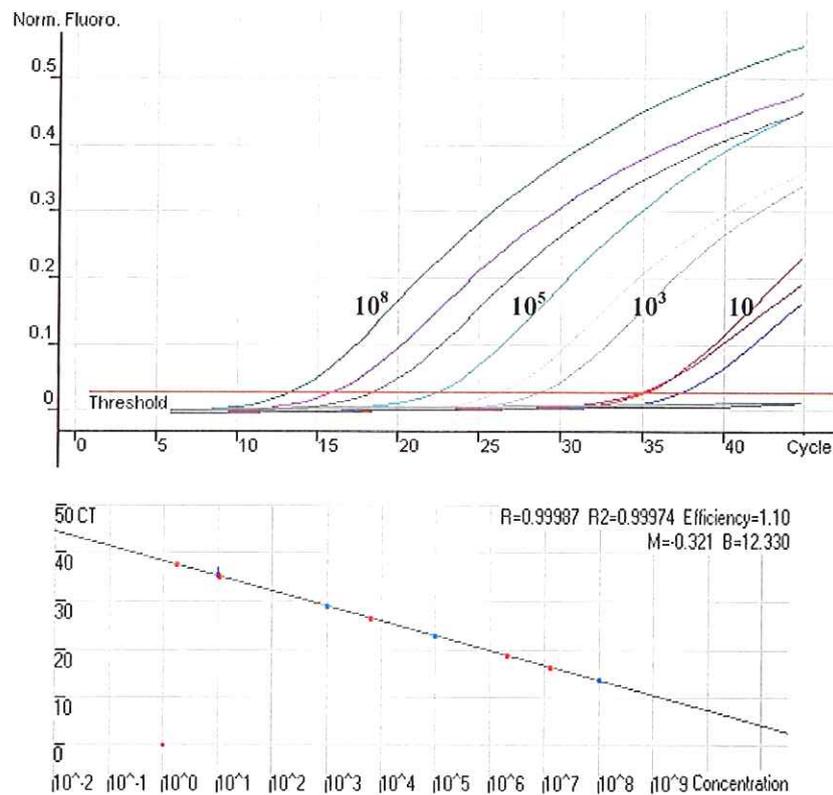


Figure 19: A: Courbes d'amplification de la gamme standard et de quelques échantillons de patient. B: Le report des Ct échantillons sur la pente calculée d'après la gamme standard permet de déterminer la quantité de génome présente dans l'échantillon. Les points correspondant à chaque dilution de standard sont représentés en bleu, ceux des échantillons patients en rouge.

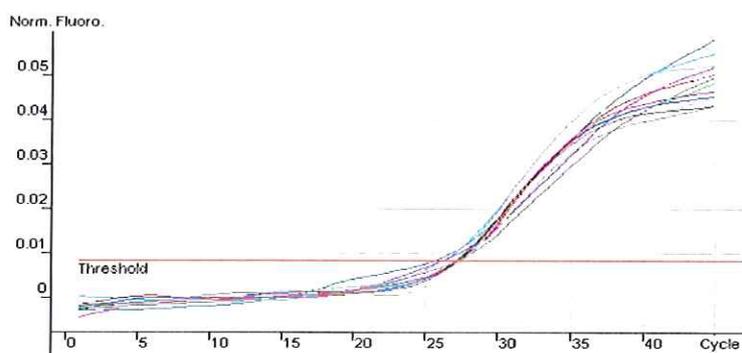


Figure 20: détection du signal d'amplification du contrôle interne sur le canal 2.

Tableau 10 Résultats de la quantification du BK virus dans des échantillons urinaires de patients.

	concentration théorique	concentration calculée	CV%	Ct échantillon	Ct IPC
std 10-4	100 000 000.0	91 642 091.9	8.36%	13.59	27.17
std 10-7	100 000.0	111 443.8	11.44%	22.66	25.81
std 10-9	1 000.0	1 084.3	8.43%	28.92	26.41
std 10-11	10.0	9.0	9.69%	35.39	26.98
patient 1		1.8		37.59	27.22
patient 2		13 086 697.8		16.22	27.45
patient 3		10.6		35.17	26.38
patient 4		6 695.2		26.46	27.57
patient 5					26.36
patient 6					27.67
patient 7		2 135 089.0		18.67	27.55
patient 8					27.37
t. ext					27.36

La réaction est validée sur l'absence d'amplification du témoin d'extraction et sur l'absence d'inhibiteur dans la réaction (Ct IPC<45).

La quantité de d'ADN BK virus dans chaque échantillon est calculée par l'automate en reportant les Ct sur la courbe étalon.

## D. RESULTATS OBTENUS AU COURS DU SUIVI LONGITUDINAL DES PATIENTS

Nous avons évalué de façon préliminaire les résultats obtenus après un an de recrutement de patients. La durée de suivi et le nombre de prélèvements varie donc entre les patients, seuls les premiers inclus ayant été surveillés sur une année. Les résultats présentés concernent tout d'abord les principales caractéristiques cliniques et biologiques des patients inclus, puis l'ensemble des données virologiques (PCR qualitatives et quantifications) analysées.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié un groupe de patients plus homogène ayant été prélevés au moins 3 fois au cours de l'année afin de rechercher d'éventuels facteurs de risques d'infection active à BK virus.

La troisième partie présente quelques cas cliniques, dont l'analyse rétrospective de 4 patients ayant développé une néphropathie à BK virus.

### *1. Caractéristiques générales de la population étudiée*

Parmi les patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale entre le 1er Décembre 2001 et le 1er Novembre 2002, 118 patients ont été prélevés au moins une fois en post transplantation dans le cadre de notre étude.

L'âge moyen des greffés est de  $47,8 \pm 14,2$  ans (médiane 49 ans). Le sexe ratio est de 2 hommes pour une femme (80/38).

Parmi les néphropathies causales ayant nécessité la transplantation, les plus fréquentes sont les glomérulonéphrites, les néphropathies vasculaires, et les néphropathies tubulo-interstitielles.

La durée de dialyse précédant la transplantation est variable, en moyenne 53 mois soit 4 ans 1/2 (médiane 2 ans).

La durée d'ischémie froide varie entre 1 et 48 heures (moyenne 23h, médiane 20h).

Le nombre d'identité HLA A, B, DR est en moyenne de  $2,8 \pm 1,6$ .

Au cours des premiers mois suivant la transplantation, sept patients ont présenté un épisode de rejet, vingt cinq ont eu au moins une infection urinaire basse, trois cas de pyélonéphrite aiguë et dix cas de complications urologiques ont été diagnostiqués.

Au cours de cette première année de suivi, aucun cas de néphropathie à BK virus n'a été diagnostiqué.

## 2. *Données virologiques*

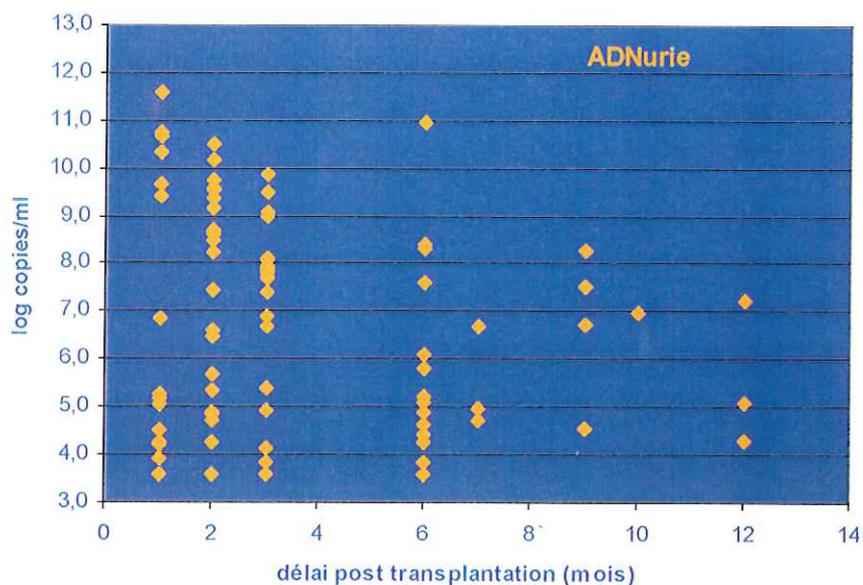
### a) Analyse globale des résultats

Au total, 298 prélèvements urinaires et 336 prélèvements plasmatiques ont été analysés. La PCR qualitative BK virus était positive pour 85 urines et 47 plasmas, qui ont été secondairement quantifiés.

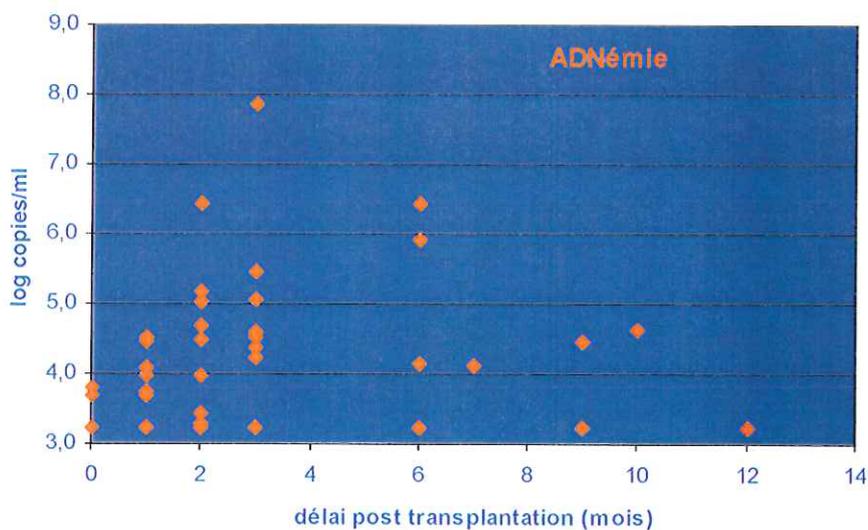
La charge virale urinaire est inférieure au seuil de détection de 4000 copies/ml pour 16 prélèvements. Pour les 69 autres, le nombre de copies de génome est compris entre 4000 et  $3,7.10^{11}$  par ml (moyenne  $7,9.10^9 \pm 4,2.10^{10}$ , médiane  $9.10^6$  copies/ml).

La charge virale plasmatique est inférieure au seuil de 1700 copies/ml pour 13 prélèvements, et varie entre 1700 et  $7,0.10^7$  copies/ml (moyenne  $2,8.10^5 \pm 7,3.10^5$ , médiane  $3.10^4$  copies/ml) pour les 34 autres.

Dans les deux types de prélèvement, l'amplitude des résultats est très importante; ceci est illustré par la différence importante observée entre la valeur moyenne et la valeur médiane. La distribution des résultats est représentée sur les figures 21 et 22.



**Figure 21** Distribution des charges virales urinaires en fonction du délai entre le prélèvement et la date de greffe.



**Figure 22** Distribution des charges virales plasmatiques en fonction du délai entre le prélèvement et la date de greffe.

La durée de suivi pour l'ensemble des patients transplantés s'échelonne entre 1 et 12 mois, avec une moyenne de 4,6 mois. Le nombre de prélèvements urinaires et plasmatiques est respectivement de 2,3 et 2,6 en moyenne par patient.

Les résultats préliminaires montrent que:

- **37 % (n=44) des patients ont eu au moins une PCR positive dans les urines.**

Pour dix neuf d'entre eux, la PCR BK urinaire n'a été positive qu'une seule fois.

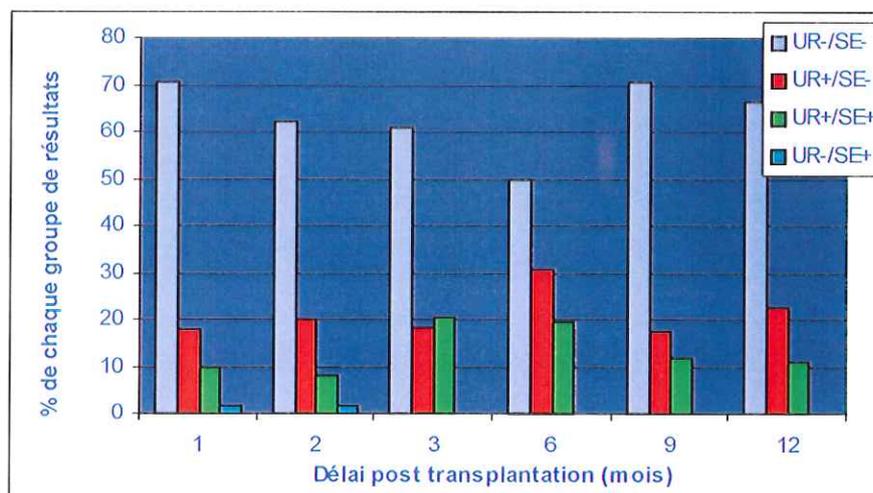
Parmi les 44 patients viruriques, 24 n'ont jamais été positifs dans le sang, et 20 ont eu une virémie associée à au moins un temps du suivi.

- **20% (n=24) des patients ont eu au moins une PCR plasmatique positive.**

Parmi ces derniers, 20 sur 24 avaient une virurie associée. Quatre patients ont présenté à une reprise une virémie isolée.

### **b) Distribution des résultats en fonction du délai post transplantation**

La répartition des résultats en fonction du délai entre le prélèvement et la date de greffe est représentée sur le tableau 11 et la figure 23. Les résultats des patients pour lesquels à une date donnée un seul prélèvement a été réalisé, soit urinaire, soit sanguin n'ont pas été pris en compte.



**Figure 23: résultats des PCR qualitatives des couples d'échantillons urines (UR) / plasma (SE) en fonction du délai entre le prélèvement et la date de greffe.**

**Tableau 11: Résultats des PCR qualitatives et quantitatives urinaires (UR) et plasmatiques (SE) pour le BK virus en fonction du délai post transplantation. Le nombre de patients prélevés à chaque temps est précisé. Les charges virales (virémie et virurie) sont exprimées en copies/ml. Le nombre de prélèvements positifs mais inférieurs au seuil de quantification est précisé (NQ).**

		Délai entre le prélèvement et la date de greffe					
		1 mois	2 mois	3 mois	6 mois	9 mois	12 mois
(SE-/UR+)	nb patients	12	20	11	11	3	2
	%	(18)	(26)	(18,5)	(30,5)	(17,5)	(22,5)
	virurie NQ	2	1	4	1	0	0
	moyenne	$6,9.10^8$	$2,3.10^9$	$3,2.10^8$	$5,9.10^7$	$1,1.10^7$	$8.10^6$
	médiane	$1,1.10^5$	$2,9.10^6$	$7,9.10^7$	$7,3.10^5$	$3,6.10^4$	
(SE+/UR+)	nb patients	7	8	12	7	2	1
	%	(10)	(10,5)	(20,3)	(19,5)	(12)	(11)
	virémie NQ	1	1	5	3	1	1
	moyenne	$1,5.10^4$	$3,7.10^5$	$7,7.10^4$	$8,9.10^5$	$2,2.10^4$	<1700
	médiane	$10^4$	$4.10^4$	$3,6.10^4$	$4,2.10^5$		
	virurie NQ	1	2	1	0	0	0
moyenne	$8,3.10^{10}$	$3,1.10^9$	$9,7.10^8$	$1,3.10^{10}$	$6,5.10^7$	$1,3.10^5$	
médiane	$3,3.10^{10}$	$1,5.10^9$	$2,5.10^7$	$6,3.10^5$	$9,1.10^6$		
(SE+/UR-)	nb patients	1	1	0	0	1	0
	%	(1,5)	(1,5)				
	virémie	<1700	$2,7.10^4$			$2,8.10^4$	
nb de patients total		68	76	59	36	17	9

Les 118 patients n'ont pas tous été prélevés à chaque date prévue, ce qui explique le nombre variable de résultats même à 1 ou 2 mois post transplantation.

Le pourcentage de patients viruriques augmente entre le 1er et le 6e mois (28 à 50%) puis diminue au 9e mois (33,5%). Il existe donc une augmentation du pourcentage de PCR BK virus positives au cours des 6 premiers mois.

La fréquence de virémie associée est maximale aux 3e et 6e mois post transplantation, dates auxquelles elle est détectée chez près de la moitié des patients viruriques.

Lorsque l'on étudie pour chaque patient la cinétique d'apparition de la virémie par rapport à la virurie, on constate que la virémie se positive soit en même temps que la virurie, soit secondairement. Par contre, elle se négative avant.

Le nombre moyen de PCR positives dans les urines et le plasma pour chaque patient varie avec la durée de suivi, et la date de la première PCR BK urinaire positive. Ces résultats sont résumés dans le tableau 12:

Tableau 12/ Comparaison du nombre de PCR BK urinaires positives en fonction du délai de positivité, de la durée de suivi, du nombre de PCR BK plasmatiques positives.

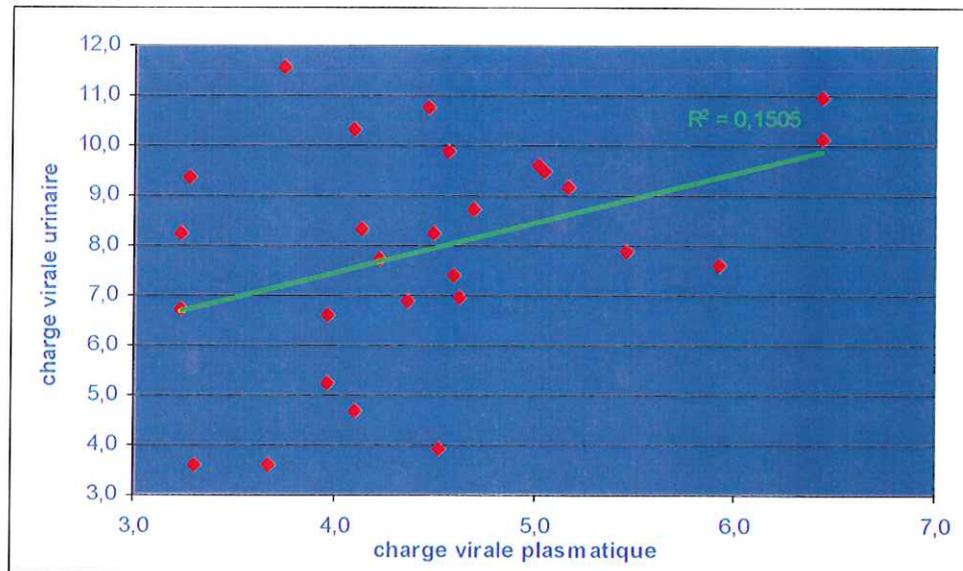
nombre de PCR BK ur + au cours du suivi d'un patient (nombre de patients)	1 (n=19)	2 (n=10)	3 (n=8)	4 (n=6)	6 (n=1)
1ere PCR BK UR + (en mois)	3 ± 2,5	2,2 ± 1,5	1,4 ± 0,7	1,6 ± 1	1
nombre moyen de PCR BK SE + (nombre de patients)	1 (n=7)	1,25 (n=4)	2 (n=5)	3 (n=4)	3 (n=1)
1ere PCR BK SE + (en mois)	2,5	2,7	2	1,5	6
durée moyenne de suivi (en mois)	5 ± 3	5 ± 3,2	6,7 ± 3,5	8 ± 3	12

Nous avons ainsi pu faire plusieurs observations:

- Un nombre de PCR urinaires positives  $\geq 3$  correspond à une durée de suivi de 6 à 12 mois. A l'inverse, lorsque le nombre d'épisodes d'ADNurie positive est inférieur à 3, la durée moyenne de suivi est de 5 mois.
- Les patients pour qui une ADNurie a été détectée positive à plusieurs reprises se positivent en moyenne plus tôt que ceux chez qui l'ADNurie ne s'est positivée qu'à une seule occasion: la date moyenne de survenue de la première PCR BK urinaire positive est de 2,4 mois post transplantation sur l'ensemble des résultats, mais elle est à 1,5 mois pour les patients ayant eu au moins 3 PCR positives dans les urines.
- Le nombre de PCR plasmatiques positives augmente avec le nombre de PCR urinaires positives.

### c) Relation virurie/virémie

Nous avons cherché une éventuelle corrélation entre virémie et virurie chez les patients pour lesquels les PCR sont positives et les charges virales quantifiables pour les deux prélèvements à la même date. Les résultats sont présentés sur la figure 24.



**Figure 24: Corrélation entre les charges virales urinaires et les charges virales plasmatiques (en log copies/ml).**

Le coefficient de corrélation R, calculé à 0,38, n'est pas significatif. La quantité d'ADN BK virus présente dans le sang n'est donc pas proportionnelle à la quantité d'ADN BK virus présente dans les urines.

Nous avons comparé les moyennes et les médianes des charges virales urinaires de trois groupes de patients en fonction de la virémie: négative, positive inférieure à 1700 copies/ml, positive supérieure à 1700 copies/ml. Ces résultats sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13: Moyenne, médiane et écart type de la virurie en fonction du caractère négatif, positif faible (<1700 copies/ml) ou positif (>1700 copies/ml) de la virémie.

	virurie (copies)/ml		
	virémie positive > 1700	virémie positive < 1700	virémie négative
Moyenne	$2,4 \cdot 10^{10}$	$4,5 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^9$
Médiane	$1,9 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^6$
Écart-type	$7,8 \cdot 10^{10}$	$1,4 \cdot 10^{10}$	$4,7 \cdot 10^9$
Minimum	8200	6800	15680
Maximum	$3,7 \cdot 10^{11}$	$4,5 \cdot 10^{10}$	$3,2 \cdot 10^{10}$

Le test de Student comparant les charges virales urinaires dans le groupe dont la virémie est supérieure à 1700 et les autres est significatif avec un  $p < 0,05$ .

Les moyennes et médianes des charges virales urinaires sont donc significativement plus élevées lorsque la virémie est supérieure au seuil de quantification, c'est à dire 1700 copies/ml.

### 3. Analyse restreinte au groupe suivi pendant au moins 3 mois

Nous avons étudié séparément les 52 patients pour lesquels les prélèvements ont été réalisés à au moins trois des dates prévues initialement. Parmi ces patients, 35 ont eu au moins un épisode d'ADNurie, associée pour 18 d'entre eux à une ADNémie. La virémie est soit concomitante de la virurie (13 patients), soit retardée de 1 mois (n=3), 2 mois (n=1) ou 6 mois (n=1).

#### a) Caractéristiques générales

Le sexe ratio, la moyenne d'âge, la durée de dialyse, la durée d'ischémie et le nombre d'identités HLA A, B, DR ont été analysés dans les groupes ayant présenté au moins un épisode d'ADNurie ou d'ADNémie et comparés au groupe de patients négatifs correspondant (tableau 14).

Tableau 14: Comparaison des moyennes: d'âge, de durée de dialyse et d'ischémie, du nombre d'identités HLA dans le groupe virurique ( $\geq 1$  BK UR +), le groupe virémique ( $\geq 1$  BK SE +), et les patients négatifs.

	$\geq 1$ BK UR+	BK UR neg	$\geq$ BK SE +	BK SE neg
sexe ratio M/F	26/10	12/4	13/6	25/8
âge moyen (médiane)	44 (46)	50,7 (52,5)	43,5 (46)	46,9 (50)
durée de dialyse moyenne (jours) (médiane)	942 (634)	1278 (784)	1004 (639)	1045 (714)
ischémie moyenne (minutes) (médiane)	1217 (1084)	1145 (1136)	1286 (1115)	1149 (1107)
nb d'identités moy HLA (A B DR) (médiane)	3,1 (3)	2,4 (2)	3,6 (4)	2,6 (3)

Les calculs des risques relatifs (sexe ratio) ou du test de Student (pour les paramètres quantitatifs) n'ont montré aucune différence significative entre les groupes.

## b) Traitement immunosuppresseur

Le traitement d'induction repose soit sur le Simulect (anti IL2), soit sur le sérum anti lymphocytaire.

Parmi les 18 patients traités par Simulect, 11 patients ont eu au moins une PCR BK VIRUS positive dans les urines (dont 5 avec virémie associée). Un seul a été traité par Néoral en post transplantation, les autres n'ont eu ni Néoral, ni tacrolimus.

Parmi les 33 patients ayant reçu du SAL, le BK virus a été mis en évidence dans les prélèvements urinaires de 22 d'entre eux, associé à une virémie pour 11 d'entre eux. Le traitement d'entretien comprenait soit du tacrolimus (n=13), soit du Néoral (n=8).

Nous avons cherché une relation entre la nature du traitement d'induction ou celle du traitement d'entretien et la survenue d'au moins une PCR BK virus urinaire ou plasmatique positive (tableau 15).

Tableau 15: Influence du traitement immunosuppresseur sur la présence d'une ADNurie ou d'une ADNémie.

	BK UR $\geq$ 1 / BK UR total	RR	p	BK SE + / BK SE total	RR	p
<b>Simulect versus SAL</b>						
Simulect	11/17	0,97	0,89	6/17	1,06	0,89
SAL	22/33			11/33		
<b>Néoral versus Tacrolimus (groupe SAL):</b>						
Néoral	9/18	1,73	0,028*	4/15	1,88	0,19
Tacrolimus	13/15			8/16		

\*  $RR = 1,73 [1,05-2,87]$ ;  $\chi^2 = 4,8$ ;  $p$  (test de Fisher)

Le groupe traité par tacrolimus présente un risque plus élevé de survenue d'ADNurie positive que le groupe traité par Néoral. Il existe une tendance similaire pour la survenue d'une ADNémie positive, mais qui est non significative.

### c) Co infections virales

Sur les 52 patients analysés, 7 ont présenté une infection active à CMV et 9 à Epstein Barr virus, objectivées par la mise en évidence de l'un des deux génomes viraux dans le sang par PCR. Nous avons recherché une relation entre ces épisodes et la positivité de l'ADNurie ou l'ADNémie BK virus à la même date.

Tableau 16: Influence des co infections virales CMV et EBV sur l'ADNurie et l'ADNémie BK virus.

	nb de PCR BK UR +	RR	p	nb de PCR BK SE +	RR	p
PCR CMV + (n=8)	4	1,06	1	1	0,66	1
PCR CMV - (n=137)	60			26		
PCR EBV + (n=13)	7	1,36	0,33	1	0,33	0,28
PCR EBV - (n=86)	34			20		

Ces résultats ne nous permettent pas de mettre en évidence de relation entre les épisodes respectifs d'infection active à BK virus et à CMV, ou à BK virus et à EBV.

### d) Rejet cellulaire

Un seul patient a présenté un épisode de rejet, dont la date de survenue n'est pas précisée. Les PCR BK virus plasmatiques et urinaires se sont positivées de façon transitoire au 2<sup>e</sup> mois, puis sont restées négatives.

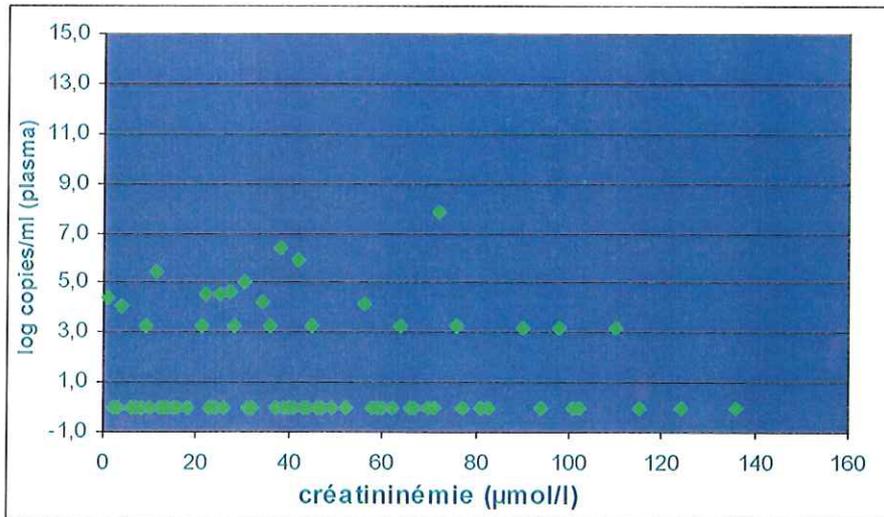
### e) Complications infectieuses ou urologiques

Aucune relation n'a été mise en évidence entre la survenue d'une complication infectieuse (n=12) et la positivité des PCR BK virus.

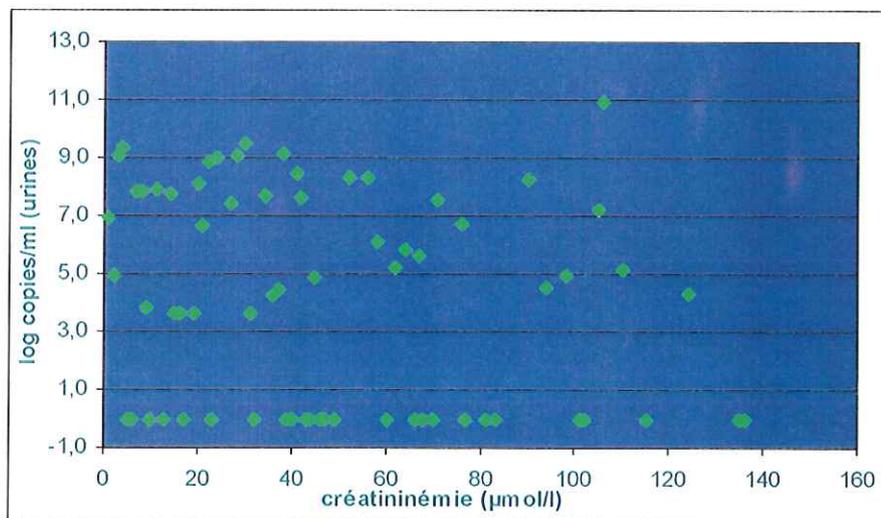
Aucun cas de pyélonéphrite aiguë n'a été diagnostiqué. Trois patients ont présenté une complication urologique. La faible fréquence de survenue de ces deux derniers événements ne nous permettent pas de faire des calculs statistiques.

### f) Charge virale et créatininémie

Nous avons étudié la distribution des valeurs d'ADNurie et d'ADNémie en fonction des taux de créatinine plasmatique mesurés à la même date. Les figures 25 et 26 présentent les résultats des patients positifs mais aussi des patients négatifs pour le BK virus.



**Figure 25: Distribution des valeurs d'ADNémie en fonction de la créatininémie.**



**Figure 26: Distribution de l'ADNurie en fonction de la créatininémie**

Il n'existe aucune corrélation entre les taux de créatinine plasmatiques et les charges virales plasmatiques ou urinaires mesurées au même temps lorsqu'elles sont positives.

### **g) Recherche de Decoy cells**

La présence de Decoy cells n'a pas été réalisée systématiquement au cours du suivi des 52 patients. Leur présence a été mise en évidence chez 4 patients sur les 20 chez qui elles ont été recherchées.

Les 4 patients positifs avaient une ADNurie positive avant ou au moment du prélèvement. Les charges virales mesurées dans le dernier prélèvement précédant la mise en évidence des Decoy cells variaient de  $2.10^4$  à  $5,4.10^7$  (médiane  $2,5.10^5$  copies/ml).

L'ADNémie est restée négative pour le patient n°1. Les trois autres ont eu au moins une PCR BK plasmatique positive, les charges virales variant de  $<1700$  à  $3,6.10^4$  copies/ml.

Parmi les seize patients négatifs en decoy cells, 7 avaient une ADNurie positive et 2 une ADNémie associée dans le dernier prélèvement précédant la mise en évidence des Decoy cells. La médiane de charge virale urinaire était de  $4.10^5$  copies/ml (variant de  $<4000$  à  $1,6.10^7$  copies/ml), les virémies étaient respectivement à  $<1700$  copies/ml et de 1714 copies/ml.

Les données cliniques et biologiques des 4 patients positifs, chez qui la présence de Decoy cells associée à des PCR plasmatiques ou urinaires positives a été diagnostiquée sont présentées dans le tableau 17:

Tableau 17: Données cliniques et biologiques des 4 patients positifs en Decoy cells

		patient 1 (Me Col.)	patient 2 (Mr Fr.)	patient 3 (Mr Le.)	patient 4 (Le B.)
date de greffe		19/03/2002	09/06/2002	10/12/2001	28/10/2002
âge		66	23	31	23
maladie initiale		Néphropathie aux analgésiques	Uropathie obstructive	Diabète Insulino Dépendant	Hyalinose Sclérosante Focale
durée dialyse (jours)		3003	1778	634	255
durée ischémie (minutes)		2013	900	653	707
nombre d'identités HLA		4	6	4	?
rejet		0	0	0	0
infection		1	0	0	0
pyélonéphrite aigüe		0	0	0	0
complication urologique		0	0	0	0
induction		SAL lapin	SAL lapin	SAL lapin	Simulect
entretien/ cyclosporine		tacrolimus	Néoral	NON	NON
corticothérapie (mg)		2,5 (3 mois)	?	0	0
durée suivi (mois)		9	3	12	3
PCR BK UR + (copies/ml)	1 mois	$7,1 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^{11}$		
	2 mois	$5,5 \cdot 10^9$	$2,9 \cdot 10^6$		$6,8 \cdot 10^4$
	3 mois	$6,5 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$	$7,3 \cdot 10^9$	$4,7 \cdot 10^6$
	6 mois	$1,2 \cdot 10^3$		$2 \cdot 10^8$	
	9 mois			$1,8 \cdot 10^8$	
	12 mois			$2 \cdot 10^4$	
PCR BK SE + (copies/ml)	1 mois	0	$5,5 \cdot 10^3$		
	2 mois	0	0		0
	3 mois	0	0	$3,6 \cdot 10^4$	< 1700
	6 mois	0		$1,6 \cdot 10^4$	
	9 mois			$1,1 \cdot 10^3$	
	12 mois			0	
PCR EBV +		0	0	1 (2 mois)	0
PCR CMV +		0	0	0	0
créatininémie ( $\mu\text{mol/l}$ )	3 mois	136	214	190	
	6 mois	134	244	134	
	9 mois	145		124	
	12 mois			132	
date decoy cells + post greffe		9 mois	4 mois	12 mois	2 mois

---

On observe par ailleurs que:

- trois patients ont eu un traitement d'induction par SAL de lapin, un seul par Simulect.
- la recherche de Decoy cells n'a été effectuée qu'une seule fois pour chacun des patients, après la mise en évidence du BK virus par PCR. Nous n'avons donc pas d'indication sur la valeur prédictive éventuelle de la PCR sur l'excrétion de Decoy cells urinaires.
- Les médianes de créatininémie des 52 patients étudiés à 3, 6, 9 et 12 mois sont mesurées respectivement à 115, 120, 122, et 125  $\mu\text{mol/l}$ . Les valeurs de créatininémie des patients positifs en Decoy cells sont, à chaque date, supérieures à la médiane de l'ensemble du groupe. Cependant, cette différence n'est pas significative avec le test de Student.

#### 4. Cas cliniques

##### a) Exemple d'une infection active à BK virus chez une patiente suivie sur un an au cours de l'étude

Mme C. est une patiente de 69 ans dialysée depuis le 16 mars 2000. La maladie initiale n'est pas connue (insuffisance rénale terminale non étiquetée). Elle a bénéficié d'une transplantation rénale le 01 janvier 2002. L'ischémie froide du greffon a duré 17 heures, le nombre d'identités HLA est de 5. Elle a bénéficié d'un traitement d'induction par SAL et d'un traitement d'entretien par tacrolimus en association avec la corticothérapie. En post transplantation, elle a présenté deux épisodes d'infection urinaire basse, et une complication urologique. Les prélèvements des trois premiers mois ont permis de détecter une excrétion urinaire importante de BK virus qui est restée positive jusqu'à maintenant. Au 6e mois, la virémie se positive et diminue progressivement jusqu'à devenir inférieure au seuil de quantification à 12 mois. Parallèlement, les charges virales urinaires ont diminué. La recherche de Decoy cells à 4 mois et 8 mois post transplantation est négative. La créatininémie, élevée jusqu'au 3e mois, s'est stabilisée. Les résultats sont présentés sur le tableau 18 et la figure 26.

**Tableau 18: Evolution comparée de la virémie, virurie, créatininémie, protéinurie au cours du suivi de Mme C.**

	Délai entre la transplantation et la date de prélèvement (mois)							
	1	2	3	6	7	9	10	12
virémie(copies/ml)	N	N	N	$8,2.10^5$	$1,3.10^4$	$1,7.10^3$	$4,2.10^4$	<1700
virurie (copies/ml)	$2,5.10^9$	$3,2.10^{10}$	$8,9.10^7$	$3,9.10^7$	$5,0.10^4$	$5,2.10^6$	$9,1.10^6$	$1,3.10^5$
créatininémie ( $\mu\text{mol/l}$ )	271	127	165	134	123	124	127	132
protéinurie(g/l)			0,72	0				
PCR EBV		Positive						

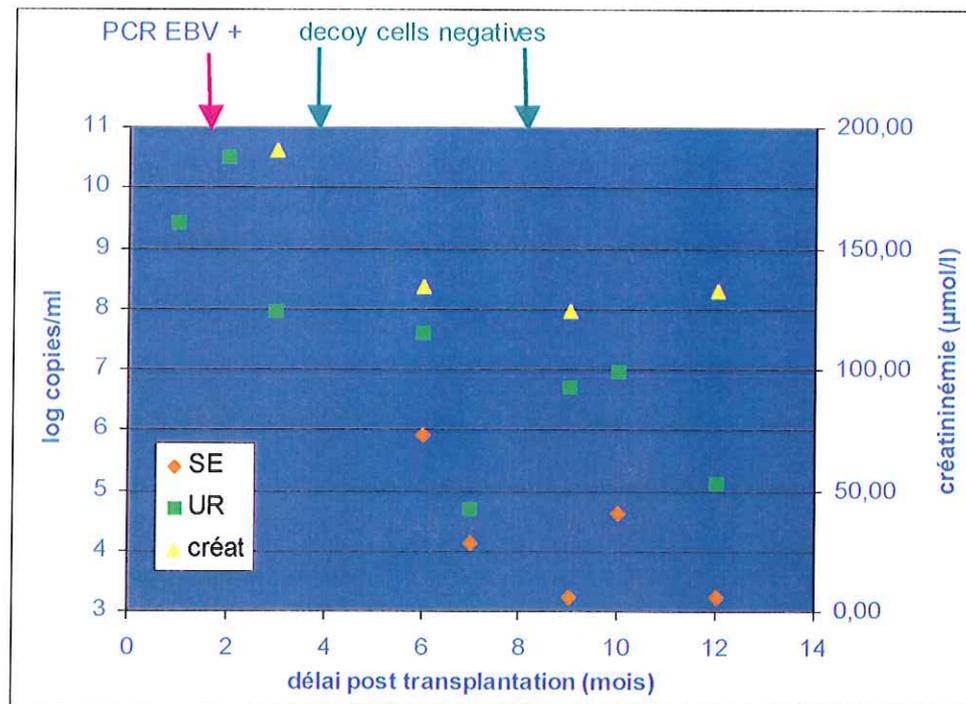
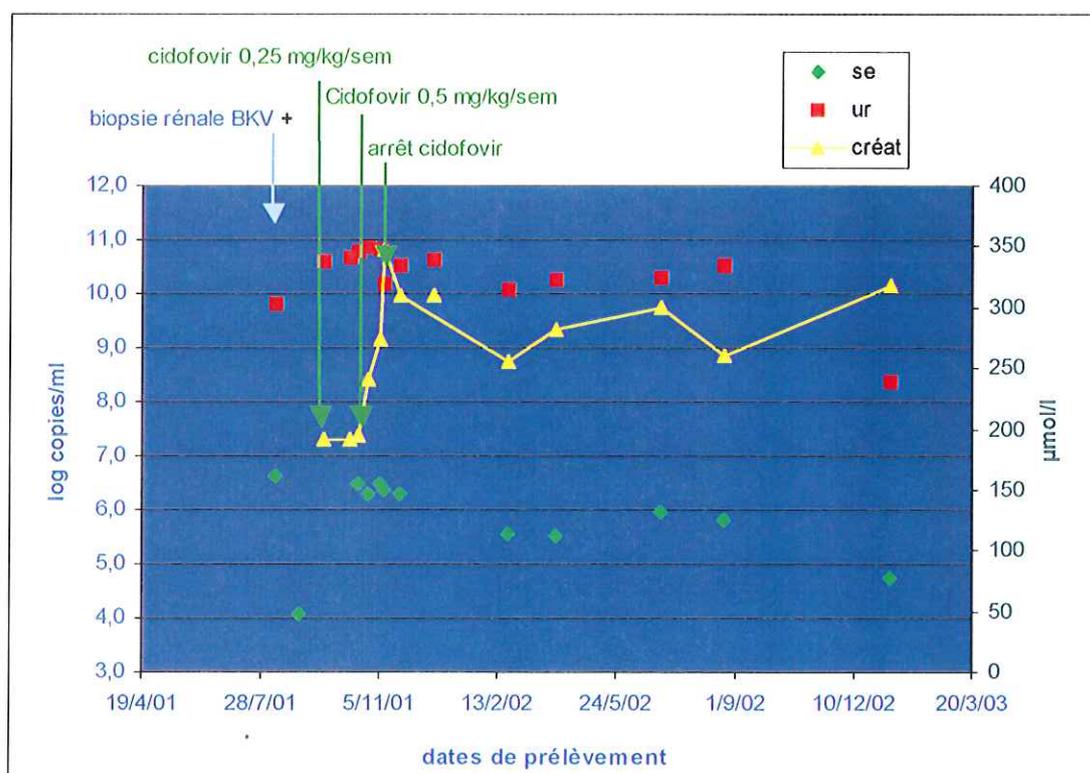


Figure 27: Evolution de la créatininémie, des charges virales urinaires et plasmatiques (en copies/ml) au cours des 12 mois suivant la transplantation rénale pour Me C.

**b) Suivi de néphropathie à BK virus: analyse retrospective de 4 cas**

Le premier cas est celui d'une patiente de 51 ans, ayant bénéficié d'une troisième transplantation rénale en Octobre 1999 et suivie à Nantes. Le traitement immunosuppresseur post opératoire a consisté en une quadrithérapie séquentielle d'induction comprenant 10 jours de SAL relayé par du tacrolimus, puis un traitement d'entretien associant tacrolimus et mycophénolate-mofétil. Au bout de 18 mois post greffe, la fonction rénale a commencé à se dégrader et la clairance de la créatinine est passée de 40 à 22 ml/mn. Une biopsie du greffon a été réalisée cinq mois plus tard, mettant en évidence une néphropathie chronique à BK virus. Au diagnostic histologique s'associait par ailleurs la mise en évidence de decoy cells en grandes quantité dans les urines, et des PCR qualitatives positives dans le sang et les urines. Le traitement immunosuppresseur a alors été réduit au tacrolimus seul, associé à une dose hebdomadaire de 0,25 mg/kg IV de Cidofovir. Après trois semaines de traitement, les PCR

BK virus restait positives dans le sang et les urines, et de nombreuses Decoy cells étaient toujours présentes, sans évolution de la créatininémie. Le traitement antiviral a alors été augmenté à deux fois 0,25 mg/kg par semaine. Au bout de quatre injections, les taux de créatinine plasmatique ont augmenté jusqu'à 250  $\mu\text{mol/l}$  (clairance 15 ml/mn), entraînant l'arrêt du traitement. L'ADN viral est toujours resté détectable dans les urines pendant et après le traitement antiviral. Dans le sang, une seule PCR s'est révélée négative. Les PCR quantitatives réalisées à posteriori ont mis en évidence des charges virales élevées. Les moyennes respectives d'ADNémie et d'ADNurie sont de  $1,7 \cdot 10^6$  et  $3,7 \cdot 10^{10}$  copies/ml. La recherche de Decoy cells est restée positive pendant le suivi, bien qu'elles soient moins nombreuses sur les derniers prélèvements. Le dernier prélèvement en date (début Janvier 2003, soit 73 mois après le diagnostic) retrouve une importante réaction inflammatoire urinaire sans véritables Decoy cells. Les charges virales urinaire et plasmatique, mesurées respectivement à  $2,3 \cdot 10^8$  et  $5,5 \cdot 10^4$  copies/ml, ont diminué (figure 27).



**Figure 28: Evolution comparée des charges virales plasmatique, urinaires et de la créatinine plasmatique chez une patiente présentant une néphropathie à BK virus histologiquement prouvée.**

Les trois autres patients ont été suivis dans le service de néphrologie de Brest. Une néphrite interstitielle attribuée au BK virus a été diagnostiquée chez chacun d'entre eux à l'occasion d'une dégradation de la fonction rénale.

Au moment du diagnostic, le patient 1 était à quatre mois post transplantation et avait un traitement immunosuppresseur associant Prograf-Cellcept-corticothérapie. Les patients 2 et 3 étaient respectivement à 15 et 25 mois post greffe, sous Néoral-Rapamune. Au moment du diagnostic, les trois ont été mis sous Sirolimus, et les autres traitement ont été arrêtés. Les résultats initiaux et au bout de six mois de suivi, mettent en évidence une persistance de la détection d'ADN, malgré une diminution des charges virales urinaires et plasmatiques mais une disparition des Decoy cells: les patients 1 et 2 ont des charges virales urinaires et plasmatiques élevées, qui persistent au bout de 6 mois. Le patient 3 est positif faible mais inférieur au seuil de quantification dans les urines et le plasma.

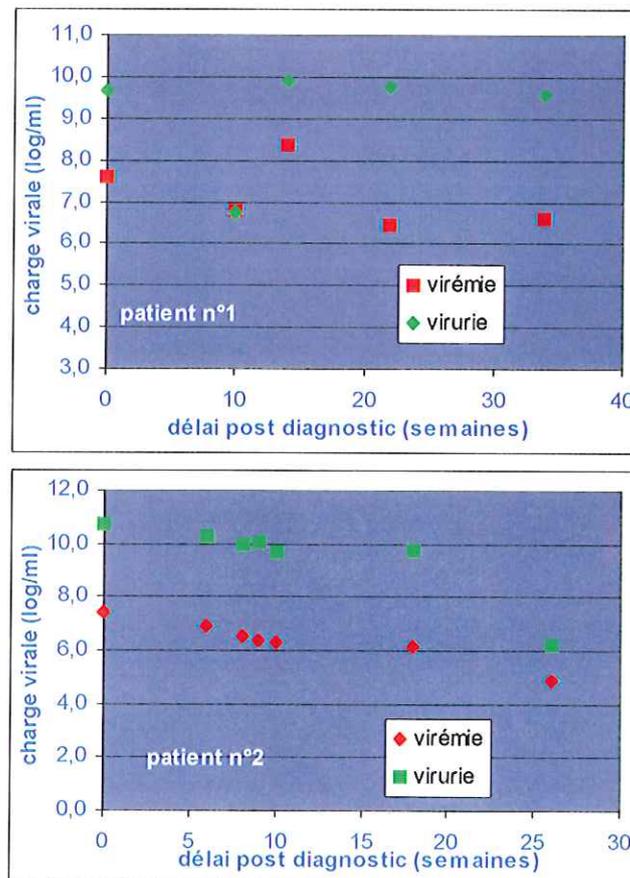


Figure 29: Evolutions comparées de l'ADNémie et de l'ADNurie (exprimées en log copies/ml) chez les patients 1 et 2.

## DISCUSSION

Malgré les fréquentes réactivations du BK virus dans les suites d'une transplantation rénale, l'incidence des néphropathies tubulo-interstitielles secondaires reste faible. Cependant, cette complication est susceptible de compromettre la survie du greffon, d'autant plus que le diagnostic histologique est souvent fait à un stade avancé, la biopsie du greffon étant motivée par la dégradation de la fonction rénale. Notre démarche visait à mettre au point une méthode non invasive de diagnostic et de suivi des réactivations à BK virus. L'objectif était de développer une technique de quantification du BK virus par PCR en temps réel et de l'appliquer au suivi prospectif d'une cohorte de patients transplantés rénaux.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une PCR en temps réel par technologie TaqMan pour la détection et la quantification du BK virus dans le plasma et les urines. La séquence amplifiée est une zone conservée du génome située au sein de la région précoce, mesurant 86 pb. Nous avons initialement intégré ce fragment amplifié par PCR au sein d'un plasmide, afin de disposer d'un standard externe. Une gamme de dilutions de concentrations connues de la solution mère du standard a ensuite été analysée par la PCR temps réel après optimisation des conditions opératoires. La technique de quantification a été validée en terme de sensibilité, le seuil de détection étant de 10 copies/réaction, et de spécificité (par rapport à d'autres virus à ADN, en particulier le JC virus). Les coefficients de variation obtenus à l'issue des tests de répétabilité et de reproductibilité sont inférieurs à 5% avec une linéarité de la gamme standard qui s'étend de  $10^{10}$  à 10 copies/réaction. Cette technique possède donc une bonne sensibilité, est spécifique, reproductible, et rapide puisqu'elle permet d'obtenir un résultat en deux heures.

Les techniques de quantification du BK virus mises au point par d'autres équipes sont de développement récent et reposent-elles aussi en majorité sur la technologie TaqMan. La

séquence sélectionnée pour l'amplification est située soit sur le gène codant pour la protéine de capsid VP1 (46, 47), soit au niveau de la région précoce (54). Les seuils de sensibilité publiés varient de 1 copie/réaction (45) à 10 copies/réaction (47, 49). La linéarité est en général étendue sur 7 log, ce qui permet de couvrir la grande amplitude des charges virales observées, en particulier dans les urines.

Les performances de notre technique sont comparables voire supérieures aux autres PCR en temps réel développées pour la quantification. En effet, les coefficients de variation que nous obtenons lors des tests de variabilité intra et inter essai sont inférieurs à 5%, alors que ceux rapportés dans la littérature sont souvent plus élevés, de l'ordre de 15 à 20% (45, 47).

Nous avons utilisé deux traitements pré-analytiques différents pour les échantillons biologiques. Le plasma est extrait à l'aide d'un kit utilisé en routine (Qiagen). Ce dernier est le plus fréquemment utilisé pour l'extraction de l'ADN viral (46) (44). Afin de limiter les risques de contamination inter échantillon, nous avons par contre chauffé, centrifugé et déposées telles quelles les urines dans le mélange réactionnel. Cette procédure a été validée après vérification de sa corrélation avec l'extraction Qiagen. Cette méthodologie avait déjà été utilisée par Biel lors de la mise au point d'une technique de quantification des polyomavirus humain dans les urines de patients greffés de moelle (42).

Dans un second temps, nous avons appliqué cette technique à la surveillance prospective d'une cohorte de 118 transplantés rénaux. Il existe assez peu de données dans la littérature concernant les charges virales urinaires et plasmatiques BK virus chez les transplantés rénaux en dehors d'un contexte de néphropathie associée.

L'analyse longitudinale de notre cohorte confirme la fréquence importante de l'ADNurie et souligne celle de l'ADNémie BK virus en post transplantation rénale. En effet, au cours de notre étude, 37% des patients ont été positifs au moins une fois en PCR BKV

urinaire et 21 % au moins une fois dans le plasma. Après restriction de l'analyse à 52 patients suivis sur au moins 3 mois, 67% ont une ADNurie positive associée dans 50% des cas à une ADNémie. Au cours du suivi de 33 transplantés rénaux par PCR qualitative classique, Cirocco a observé des incidences assez proches, respectivement de 39 et 9% (44). La recherche d'une ADNurie par nested PCR au cours de l'étude prospective de Piftakis sur 170 transplantés entre 1995 et 1998 était positive pour seulement 7% des patients, mais le nombre de prélèvements par patients et le délai post transplantation ne sont pas précisés (35). Dans l'étude de Leung portant sur 44 transplantés, la recherche du BKV par PCR temps réel était positive chez 100% des patients dans le plasma, associée pour 34 d'entre eux à une virurie. Cependant, dans ce travail, chaque patient n'a été prélevé qu'une seule fois, avec un délai entre le prélèvement et la transplantation non précisé (46). Cette forte incidence de la virémie n'était pas retrouvée dans les travaux de Hirsch, portant sur 78 patients suivis prospectivement sur une durée médiane de 85 semaines après la transplantation. En effet, dans cette étude l'incidence d'ADNémie était évaluée à 13% (43). La plus grande fréquence observée dans notre série peut être liée à un nombre de prélèvements plus important par patient au cours des 6 premiers mois.

La date de positivité de la première PCR urinaire varie entre le premier mois et le neuvième mois post transplantation, la médiane se situant à 2 mois. La virurie est d'autant plus prolongée qu'elle apparaît tôt en post greffe. Lorsqu'une virémie est associée à une virurie, elle est soit concomitante, soit postérieure à celle-ci. La médiane de positivité de la virémie dans notre étude est de 2 mois. Par rapport à l'étude de Hirsch, où l'ADNémie se positive dans un délai médian de 23 semaines post transplantation, la mise en évidence du BK virus dans le plasma en post transplantation est plus fréquente et plus précoce (43).

Les Decoy cells n'ayant pas été recherchées systématiquement dans notre étude, la fréquence de leur présence en post transplantation n'a pu être évaluée. Sur les 32 patients dépistés, 5 étaient positifs, dans un délai variant de 2 à 9 mois post transplantation. Pour 4 des 5 patients, l'ADN viral avait précédemment été mis en évidence à la fois dans les urines et le plasma au moins une fois pendant le suivi. Nous ne disposons donc pas de données suffisantes pour la recherche d'une corrélation ADNémie/decoy cells ou ADNurie/decoy cells. Au cours de l'étude de Hirsch, la virurie n'a pas été mesurée par PCR, mais recherchée par la mise en évidence de Decoy cells. Elles ont été détectées chez 29% des patients dans un délai médian de 16 semaines post transplantation (43). Les Decoy cells sont considérées par certains comme un meilleur marqueur de répllication virale que l'ADNurie, mais cet examen présente l'inconvénient d'être très opérateur dépendant et les différentes études sont contradictoires sur leur valeur prédictive sur le développement d'une néphropathie à BK virus (38, 43).

Les résultats obtenus au cours de notre travail ont permis de mettre évidence la grande variabilité inter-patient des charges virales mesurées dans les urines ainsi que pour un même patient au cours du temps. Elles peuvent être extrêmement élevées, celles qui sont supérieures au seuil de quantification étant comprises entre  $4.10^3$  et  $3,8.10^{11}$  (médiane  $4.10^6$  copies/ml). En suivi systématique post transplantation, seul Leung avait déjà mesuré l'ADNurie BK virus. Dans ce travail, l'ADNurie variait entre  $2.10^3$  et  $5.10^9$  copies/ml (46). Les charges virales plasmatiques sont moins élevées que celles observées dans les urines. Elles varient entre <1700 (inférieures au seuil de détection) et  $7.10^7$  copies/ml (médiane  $3.10^4$  copies/ml). Dans l'étude de Hirsch, les médianes de virémies observées varient de  $2.10^3$  à  $2,8.10^5$  copies/ml, les plus élevées étant observées chez les patients qui développeront une néphropathie associée au BK virus(43).

Nous n'avons pas trouvé de relation linéaire entre la virémie et la virurie, mais les ADNuries associées à une ADNémie supérieure à 1700 copies/ml sont significativement plus élevées que celles associées à une ADNémie inférieure à 1700 copies /ml ou négative. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Leung. Dans cette étude, les patients ont été différenciés en fonction de l'ADNémie: la charge virale est inférieure à 1000copies/ml (médiane 270) pour 35 patients sur 44 et supérieure à 1000 copies/ml (médiane  $5.10^4$ ) pour 9 d'entre eux. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre virémie et virurie (46).

La réactivation virale est donc vraisemblablement en partie indépendante dans le sang et les urines, à la différence des réactivations du CMV pour lequel il existe une corrélation entre virémie et virurie. Cependant, la virémie disparaît si une transplantectomie est réalisée sur une néphropathie à BK virus, ce qui est un argument en faveur d'un passage du virus dans le sang à partir de l'épithélium tubulaire du greffon (45).

Nous n'avons pas, à partir des données dont nous disposons, mis en évidence de corrélation entre l'intensité de la virurie ou de la virémie et la créatininémie. Ces résultats sont en accord avec ceux de Leung (46), mais vont à l'encontre d'autres travaux. En effet, Cirocco a trouvé des taux de créatinine significativement plus élevés chez les patients ayant une ADNémie BK virus positive associée à une ADNurie (44).

La plupart des travaux publiés sur la quantification du BK virus concernent des patients pour lesquels une néphropathie à BK virus a été prouvée histologiquement (29, 45). Or, dans notre étude, aucun cas de néphropathie à BK virus n'a été diagnostiquée pendant cette première année, alors que l'incidence de la néphropathie à BK virus dans les différentes séries publiées varie de 2 à 5% ((32, 38) (31, 34),(55)). Le délai moyen entre la transplantation et le diagnostic histologique de diagnostic de la néphropathie à BK est

d'environ trois mois d'après Randhawa (47), plus long dans l'étude prospective de Hirsch, où une néphropathie à BK a été diagnostiquée chez 5 des 78 patients suivis (6,5%), entre la 8<sup>e</sup> et la 86<sup>e</sup> semaine post transplantation (médiane 23 semaines, i.e 6 mois) (43).

La valeur prédictive de l'ADNémie a d'abord été évaluée au cours d'études rétrospectives dans des séries comprenant des néphropathies à BK virus. Dans notre expérience, les virémies et les viruries mesurées au cours du suivi de néphropathies associées au BK virus sont variables en fonction des patients. Mis à part un des patients de Brest, les trois autres ont toujours eu des ADNémies supérieures à  $10^4$  copies/ml et des ADNuries supérieures à  $10^6$  copies/ml. L'étude de Nickeleit a mis en évidence la présence de l'ADN BKV dans le plasma par PCR qualitative soit avant (16 à 33 semaines), soit au moment du diagnostic histologique (29). Dans l'étude de Limaye, les 4 patients présentant une néphropathie à BK virus étaient positifs dans le sérum avant le diagnostic histologique, alors que l'ADNémie était indétectable chez les 16 patients contrôle (45). Les travaux de Hirsch ont retrouvé chez tous les patients ayant développé une néphropathie à BK virus une ADNémie supérieure à 7700 copies/ml (détectée dans un délai médian de 23 semaines post greffe), alors qu'elle restait inférieure à ce seuil ou négative chez les patients sans lésions histologiques (43).

L'absence de néphropathie à BK virus dans notre série ne nous a pas permis d'évaluer la valeur prédictive éventuelle de la quantification urinaire ou plasmatique. L'intensité des charges virales mesurées à la fois dans le sang et les urines est illustrée par l'exemple de Me C., sans qu'une altération de la fonction du greffon ne soit observée à ce jour. L'absence fréquente de conséquences sur la fonction rénale est étonnante. Cette constatation peut amener à penser qu'il existe, outre un facteur de risque principal qui est vraisemblablement le degré d'immunosuppression, une susceptibilité individuelle à la réactivation et peut être une virulence différente des souches.

Une autre approche a été développée par Randhawa: la charge virale a été mesurée dans les biopsies de greffons présentant des signes histologiques de néphropathie à BK virus. Après normalisation à l'échelle cellulaire à l'aide du gène domestique ACY, le nombre moyen de génomes viraux BK virus détectés par cellule est de 6063 copies (médiane 1705) dans les greffons qui développeront à terme une néphropathie, alors qu'il reste inférieur à 10 copies/cellule dans les greffons qui resteront négatifs pour le BK virus en immunohistochimie. La détection de l'ADN viral en dehors de tout contexte de néphropathie à BK virus correspond vraisemblablement à la détection du virus à l'état latent, alors que l'accumulation de milliers de particules au sein des cellules épithéliales peut être détectée avant l'apparition des lésions histologiques évocatrices de néphropathie à BK virus. Cependant, l'application de la PCR temps réel à la mesure des charges virales BK virus dans les biopsies rénales n'a pas d'intérêt en pratique courante, puisqu'elle nécessite un geste invasif qui ne peut être répété régulièrement.

Dans le but de rechercher d'éventuels facteurs de risque associés à l'infection active à BK virus, nous avons recueilli les données démographiques, cliniques et thérapeutiques des patients de la cohorte. L'hétérogénéité de la durée du suivi à un an, et donc le nombre variable de prélèvements par patient ne nous permet pas pour l'instant de présenter de statistiques sur l'ensemble de la cohorte. Cependant, la restriction de l'analyse à 52 patients nous a permis de mettre en évidence une relation significative entre tacrolimus et ADNurie. En effet, parmi ceux ayant eu un traitement d'induction par SAL relayé par un traitement d'entretien comprenant un inhibiteur des calcineurines, le groupe traité par tacrolimus présente un nombre plus élevé d'épisodes d'ADNurie que le groupe traité par Néoral. Cette relation n'est pas retrouvée avec l'ADNémie.

Nous n'avons pas montré de risque relatif significatif lié au sexe, à la durée d'ischémie froide du greffon, au traitement immunosuppresseur d'induction (SAL versus Simulect), ou à la survenue de co infections virales (CMV, EBV) dans ce groupe de patients.

L'étude de Hirsch a permis de mettre en évidence une relation significative entre le nombre de bolus de corticoïdes administrés pour un épisode de rejet et la positivité de la virémie, de la recherche de Decoy cells et la survenue d'une néphropathie. Aucun autre facteur (sexe, age, traitement immunosuppresseur d'induction ou d'entretien) ne semble constituer un facteur de risque d'infection active à BK virus (43). Il faut souligner que dans notre cohorte, l'incidence des épisodes de rejet est faible, puisque seuls 6% des patients ont présenté un ou plusieurs épisodes de rejet à un an. Or, l'incidence du rejet dans d'autres séries est souvent plus importante, nécessitant une augmentation du traitement immunosuppresseur (32, 35, 43). L'étude prospective de Priftakis et al portant sur 170 patients n'a montré aucune corrélation entre la mise en évidence du BK virus dans les urines par nested PCR et la durée d'ischémie froide ou la survenue d'épisodes de rejet (35).

Une application de la mesure de la charge virale BK virus au laboratoire pourrait être le suivi des néphropathies à BK virus. La prise en charge des patients atteints d'une néphropathie à BK virus débute initialement par la diminution du traitement immunosuppresseur, et éventuellement la mise en place d'un traitement spécifique anti viral par le Cidofovir. La mesure des charges virales plasmatiques et urinaires de façon rétrospective chez une patiente ayant développé une néphropathie à BK virus nous a permis de suivre l'évolution virologique sous Cidofovir, traitement qui a du être interrompu en raison d'une toxicité rénale. Randhawa a suivi les charges virales urinaires et plasmatiques de 4 cas de néphropathies à BK virus traitées par Cidofovir (56). Sous traitement à doses réduites (5 à 20% des posologies habituelles), l'ADNémie s'est négativée avant l'ADNurie pour les 4

patients et la créatininémie a diminué. L'ADNurie, après s'être négativée, a été détectée de nouveau chez deux des 4 patients mais les taux de créatinine sont restés stables.

Pour les 3 patients suivis à Brest, aucune thérapeutique antivirale n'a été mise en oeuvre, mais le traitement immunosuppresseur a été remplacé par du sirolimus en monothérapie. L'ADN BK virus est devenu indétectable dans le sang et les charges virales ont diminué dans les urines. Dans le même temps la détection des Decoy cells s'est négativée.

Un cas de néphropathie à BK virus sous sirolimus a été décrit par Hirsch, et suivi par la mesure de l'ADNémie. Les charges virales mesurées au moment du diagnostic de la néphropathie étaient de l'ordre de  $3.10^6$  copies/ml. Après l'arrêt du sirolimus, l'ADNémie s'est négativée en 4 mois et la créatininémie a baissé (49).

La mesure de la charge virale plasmatique a donc un intérêt pour le suivi des néphropathies à BK virus et le monitoring des traitements antiviraux. En effet, elle se négative plus tôt que la virurie qui peut rester positive longtemps, même après la disparition des Decoy cells dans les urines. Le suivi de la charge virale plasmatique devrait permettre d'optimiser la durée du traitement, afin d'éviter la survenue d'une toxicité rénale.

Au total, la néphropathie à BK virus est vraisemblablement d'origine multifactorielle. Il existe une répllication virale importante chez certains transplantés rénaux, illustrée par les résultats obtenus au cours de notre étude. Cependant, à ce jour, nous n'avons pas mis en évidence d'atteinte fonctionnelle du greffon en rapport avec cette répllication chez les patients de notre cohorte. Peut on parler de flore virale? Existe t'il un seuil au-dessus duquel un déséquilibre se créé entraînant une répllication virale intense avec pour conséquence un effet cytopathogène important et un retentissement tissulaire? Ces questions, encore ouvertes, devraient être résolues à la lumière des résultats obtenus par la poursuite de notre étude chez les patients de la cohorte, et par d'autres études prospectives.

## CONCLUSION

Nous avons mis au point une technique de détection et de quantification de l'ADN du BK virus rapide, sensible et reproductible dans les urines et le plasma. L'évaluation préliminaire des résultats obtenus au bout d'une année à partir d'une cohorte de patients transplantés rénaux met en évidence une forte incidence de l'ADNurie, et de l'ADNémie BK virus dans les 6 premiers mois suivant transplantation rénale. Bien que les charges virales mesurées aient parfois été très importantes, aucun cas de néphropathie à BK virus n'a été diagnostiqué au cours des douze premiers mois du suivi. Une évaluation ultérieure des résultats sera nécessaire afin d'une part de confirmer le rôle du traitement immunosuppresseur en tant que facteur de risque individuel de réactivation, et d'autre part de mettre en évidence d'autres facteurs de risque éventuels. La survenue de néphropathies associées au BK virus pourrait nous fournir des informations intéressantes. Néanmoins, la quantification virale semble d'ores et déjà trouver sa place dans le suivi de ces néphropathies afin d'optimiser le traitement immunosuppresseur ou anti viral.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Gardner SD, Field AM, Coleman DV, B. H.** New Human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1971;1:1253-1257.
2. **Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM.** Cultivation of papova like virus from human brain with progressive multifocale leukoencephalopathie. *Lancet*. 1971;1:1257-1260.
3. **Cole CN, D. CS.** Polyomaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 4th ed. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:2141-2174.
4. **Greenlee JE, O'Neill FJ.** Polyomaviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. 2nd ed. Vol. 1. Washington: ASM press; 2002:537-556.
5. **Major EO.** Human Polyomavirus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 4th ed. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:2175-2196.
6. **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*. 2001;21(1):1-7.
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(3):353-62.
8. **Marechal V, Piolot T.** Oncogenèse et cycle biologique. *Virologie*. 1999;3(1):297-308.
9. **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(6):411-6.
10. **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(Pt 8):1967-73.
11. **Fishman JA.** BK virus nephropathy--polyomavirus adding insult to injury. *N Engl J Med*. 2002;347(7):527-30.
12. **Johnsen JI, Seřernes OM, Johansen T, Moens U, Mantyjarvi R, Traavik T.** Subpopulations of non-coding control region variants within a cell culture-passaged stock of BK virus: sequence comparisons and biological characteristics. *J Gen Virol*. 1995;76 ( Pt 7):1571-81.
13. **Chen CH, Wen MC, Wang M, et al.** A regulatory region rearranged BK virus is associated with tubulointerstitial nephritis in a rejected renal allograft. *J Med Virol*. 2001;64(1):82-8.
14. **Barbanti-Brodano G, Martini F, De Mattei M, Lazzarin L, Corallini A, Tognon M.** BK and JC human polyomaviruses and simian virus 40: natural history of infection in humans, experimental oncogenicity, and association with human tumors. *Adv Virus Res*. 1998;50:69-99.
15. **Harris KF, Chang E, Christensen JB, Imperiale MJ.** BK virus as a potential co-factor in human cancer. *Dev Biol Stand*. 1998;94:81-91.
16. **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*. 1996;70(4):2378-86.
17. **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(1):238-45.

18. **Pietropaolo V, Di Taranto C, Degener AM, et al.** Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol.* 1998;56(4):372-6.
19. **Replogue MD, Storch GA, Clifford DB.** Bk virus: a clinical review. *Clin Infect Dis.* 2001;33(2):191-202.
20. **Jin L.** Molecular methods for identification and genotyping of BK virus. *Methods Mol Biol.* 2001;165:33-48.
21. **Sundsfjord A, Osei A, Rosenqvist H, et al.** BK and JC viruses in patients with systemic lupus erythematosus: prevalent and persistent BK viremia, sequence stability of the viral regulatory regions, and nondetectable viremia. *J Infect Dis.* 1999;180(1):1-9.
22. **Mylonakis E, Goes N, Rubin RH, Cosimi AB, Colvin RB, Fishman JA.** BK virus in solid organ transplant recipients: an emerging syndrome. *Transplantation.* 2001;72(10):1587-92.
23. **Rice SJ, Bishop JA, Apperley J, Gardner SD.** BK virus as cause of haemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. *Lancet.* 1985;2(8459):844-5.
24. **Vallbracht A, Lohler J, Gossmann J, et al.** Disseminated BK type polyomavirus infection in an AIDS patient associated with central nervous system disease. *Am J Pathol.* 1993;143(1):29-39.
25. **Bachman DM.** BK virus retinitis. *Ophthalmology.* 1999;106(12):2232.
26. **Gardner SD, MacKenzie EF, Smith C, Porter AA.** Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J Clin Pathol.* 1984;37(5):578-86.
27. **Binet I, Nicleleit V, Hirsch HH, et al.** Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation.* 1999;67(6):918-22.
28. **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(8):2145-51.
29. **Nicleleit V, Klimkait T, Binet IF, et al.** Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med.* 2000;342(18):1309-15.
30. **Vats A, Shapiro R, Singh Randhawa P, et al.** Quantitative viral load monitoring and cidofovir therapy for the management of BK virus-associated nephropathy in children and adults. *Transplantation.* 2003;75(1):105-12.
31. **Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, et al.** Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation.* 1999;67(1):103-9.
32. **Barri YM, Ahmad I, Ketel BL, et al.** Polyoma viral infection in renal transplantation: the role of immunosuppressive therapy. *Clin Transplant.* 2001;15(4):240-6.
33. **Randhawa PS, Demetris AJ.** Nephropathy due to polyomavirus type BK. *N Engl J Med.* 2000;342(18):1361-3.
34. **Howell DN, Smith SR, Butterly DW, et al.** Diagnosis and management of BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Transplantation.* 1999;68(9):1279-88.
35. **Priftakis P, Bogdanovic G, Tyden G, Dalianis T.** Polyomaviruria in renal transplant patients is not correlated to the cold ischemia period or to rejection episodes. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):406-7.
36. **Nochy D, Antoine C, Fontaniere B, Tabone E, Mainardi JL, Glotz D.** [Urinary cytology during kidney transplantation]. *Ann Pathol.* 2000;20 Suppl:S79-81.

37. **Nickeleit V, Hirsch HH, Zeiler M, et al.** BK-virus nephropathy in renal transplants-tubular necrosis, MHC-class II expression and rejection in a puzzling game. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(3):324-32.
38. **Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al.** Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *Am J Transplant.* 2001;1(4):373-81.
39. **Whiley DM, Mackay IM, Sloots TP.** Detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4357-61.
40. **Kwak EJ, Vilchez RA, Randhawa P, Shapiro R, Butel JS, Kusne S.** Pathogenesis and management of polyomavirus infection in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;35(9):1081-7.
41. **Leung AY, Suen CK, Lie AK, Liang RH, Yuen KY, Kwong YL.** Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Blood.* 2001;98(6):1971-8.
42. **Biel SS, Held TK, Landt O, et al.** Rapid quantification and differentiation of human polyomavirus DNA in undiluted urine from patients after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol.* 2000;38(10):3689-95.
43. **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(7):488-96.
44. **Cirocco R, Markou M, Rosen A, et al.** Polyomavirus PCR monitoring in renal transplant recipients: detection in blood is associated with higher creatinine values. *Transplant Proc.* 2001;33(1-2):1805-7.
45. **Limaye AP, Jerome KR, Kuhr CS, et al.** Quantitation of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *J Infect Dis.* 2001;183(11):1669-72.
46. **Leung AY, Chan M, Tang SC, Liang R, Kwong YL.** Real-time quantitative analysis of polyoma BK viremia and viruria in renal allograft recipients. *J Virol Methods.* 2002;103(1):51-6.
47. **Randhawa PS, Vats A, Zygmunt D, et al.** Quantitation of viral DNA in renal allograft tissue from patients with BK virus nephropathy. *Transplantation.* 2002;74(4):485-8.
48. **Andrei G, Snoeck R, Vandeputte M, De Clercq E.** Activities of various compounds against murine and primate polyomaviruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):587-93.
49. **Hirsch HH, Mohaupt M, Klimkait T.** Prospective monitoring of BK virus load after discontinuing sirolimus treatment in a renal transplant patient with BK virus nephropathy. *J Infect Dis.* 2001;184(11):1494-5; author reply 1495-6.
50. **Monpoeho SDM.** Quantification génomique de deux virus entériques (Entérovirus et HAV) dans les boues de station d'épuration. Estimation de l'impact sanitaire lié à leur valorisation agricole. [Thèse de doctorat]. Faculté de pharmacie de Nantes; 2001.
51. **Dehee A, Asselot C, Piolot T, et al.** Quantification of Epstein-Barr virus load in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients using real-time PCR. *J Med Virol.* 2001;65(3):543-52.
52. **Ryncarz AJ, Goddard J, Wald A, Huang ML, Roizman B, Corey L.** Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1941-7.
53. **Collot C, Alain S, Denis F, Ranger-Rogez S.** Quantification par PCR temps réel, technologie TaqMan et applications en virologie. *Virologie.* 2001;5(1):439-448.

- 
54. **Priftakis P, Bogdanovic G, Kokhaei P, Mellstedt H, Dalianis T.** BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of hemorrhagic cystitis, although wide individual variations exist. *J Clin Virol.* 2003;26(1):71-77.
  55. **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(5):1080-9.
  56. **Vats A.** Viral load monitoring in BK virus-associated nephropathy. *Nephrol News Issues.* 2002;Suppl:S17-9.

Nom - Prénom: **BODIN-BRESSOLLETTE Céline**

Titre de la thèse: **Développement d'une PCR en temps réel pour la quantification du BK virus. Application au suivi d'une cohorte de transplantés rénaux.**

---

**Résumé:**

Le polyomavirus humain BK, virus ubiquitaire dont la séroprévalence est élevée, ne s'exprime cliniquement que dans un contexte d'immunosuppression. L'incidence des néphropathies à BK virus en transplantation rénale a augmenté depuis le milieu des années 90. Nous avons mis au point une PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN viral. Disposant ainsi d'un outil sensible, spécifique et reproductible, nous avons suivi prospectivement une cohorte de patients transplantés depuis Décembre 2001. Nos résultats montrent une incidence élevée de l'ADNurie et de l'ADNémie BK virus. Aucun cas de néphropathie associée n'a été diagnostiqué au cours des 12 premiers mois. Nos travaux suggèrent le rôle favorisant du traitement immunosuppresseur sur la réactivation du BK virus, et soulignent l'intérêt de la mesure de la charge virale plasmatique pour le suivi des néphropathies à BK virus et l'adaptation du traitement.

---

**Mots clé:** BK virus - Néphropathie à BK virus - PCR en temps réel - Quantification virale