

# Thèse de Doctorat

**Mathieu SIKORSKI**

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

**École doctorale :** *Biologie-Santé*

**Discipline :** *Biologie*

**Spécialité :** *Immuno-virologie*

**Unité de recherche :** *Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (UMR1064)*

**Soutenu le** 11/12/2017

**Thèse N° :** 119269

## De l'implication des cellules dendritiques myéloïdes humaines dans la physiopathologie de l'infection à polyomavirus BK

### JURY

Président du Jury :	<b>Antoine TOUZÉ</b> , Professeur, UMR INRA 1282-Infectiologie et Santé Publique, Tours
Rapporteurs :	<b>Nathalie JACOBS</b> , PhD, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire, Liège <b>Pierre-Gilles MERVILLE</b> , Professeur, CNRS UMR 5164 - CHU de Bordeaux, Bordeaux
Examineurs :	<b>Elodie SEGURA</b> , CR1, Institut Curie, Paris <b>Antoine TOUZÉ</b> , Professeur, UMR INRA 1282-Infectiologie et Santé Publique, Tours
Directeur de Thèse :	<b>Franck HALARY</b> , CR1, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, Nantes



# Remerciements

Je commencerai par remercier mon jury de thèse : les Dr Nathalie Jacobs, Elodie Segura, Pierre Merville et Mr le Pr Antoine Touzé. Merci à vous d'avoir accepté de faire partie de ce jury, d'évaluer cette thèse ainsi que ma soutenance. Vous serez parmi les premiers à poser les yeux sur ce manuscrit et avoir le plaisir de lire les remerciements à suivre, si le cœur vous en dit. Ces remerciements seront comme ma tribune libre, à ma sauce, avant d'entrer dans le vif et le sérieux du sujet. Remerciement spécial à Nathalie Jacobs et Antoine Touzé que j'ai eu l'occasion de rencontrer et côtoyer par deux reprises aux congrès de l'AFIPP lors mon doctorat.

Je poursuis ces remerciements en m'adressant aux deux directeurs du laboratoire qui ont été témoins de mon passage au CRTI, le Dr Ignacio Anegon et le Pr Régis Josien. Merci de m'avoir permis d'effectuer mon travail de thèse au sein de cette unité qui propose un cadre propice au travail dans des conditions matérielles agréables et dans une convivialité plus appréciée de jour en jour.

Ensuite je remercie le Dr Franck Halary, mon encadrant de M2 et de thèse. Merci Franck de m'avoir « pris sous ton aile » pendant cette aventure humaine, émotionnelle, personnelle et professionnelle qu'est le doctorat ! Merci de m'avoir encadré, conseillé, entendu et soutenu (et de temps en temps arrosé à quelques occasions, laissées à la discrétion de l'auteur de ce manuscrit...car le doctorat c'est aussi des bons moments passés avec son encadrant) !

Merci à tous les membres de l'équipe 1 avec qui nous avons échangé autour de sujets plus ou moins sérieux que ce soit lors de nos réunions mensuelles, puis bimensuelles, puis hebdomadaires ou lors de notre retraite, ou en pause ou autour d'un verre. La bonne humeur était tout le temps au rendez-vous et les conseils apportés toujours précieux. Merci à Maria-Christina Cuturi et Régis Josien, les co-directeurs de cette équipe qui m'a accueillie pendant ces trois années et demie.

Merci aux membres du Groupe de Recherche en Immunovirologie en Transplantation, qui a bien grandi depuis mon arrivée : Flora, Cécile, Céline, Janina, Dorian. Remerciement spécial pour Dorian qui m'enseignait les mécanismes de l'évolution en L1 à la fac. Tu m'as apprécié très vite (de part mes origines polonaises) ce qui m'a permis de te demander des contacts pour trouver mon stage de M2, et de rencontrer Franck et on connaît la suite.

Je remercie de manière plus large tous les membres du laboratoire, que j'ai tous côtoyé au moins une fois lors de mon passage au labo. Merci à tous pour les portes de bureau et de labo toujours ouvertes pour une question inopinée tombant au milieu d'une manip, ou moins inopinée

pour prévoir les manips, pour organiser les voyages en congrès, les contrats etc... ou juste pour discuter.

Je remercie Gaëlle Picarda et Coraline Chéneau, respectivement en post-doc et en doctorat dans l'équipe quand je suis arrivé. Merci pour les conseils et l'accompagnement lors des premières manips, les discussions, l'intégration et les soirées que nous avons passé ensemble.

Merci à Steven Nedellec, Philippe Hulin, Juliette Desfrancois et Nadège Marec avec qui j'ai beaucoup discuté pour bien préparer mes expériences de microscopie et de tri, pour m'avoir aidé pendant les longues acquisition d'images à MicroPicell (Philippe et Steven) et pour les analyses des résultats par la suite.

Merci à tous les collaborateurs nommés dans notre papier (même si pas encore publié) dont la contribution à l'étude à été appréciée et d'une grande aide.

Merci à tous les potos du labo (encore présent ou qui l'ont été) et ceux des autres labo : Alex, Sarah, Mel, Mel, Vaness, Chacha et Flo (les petiots), Aurore, Amédée, Max, Jérémy, Pierre et Alex et Malo et Julien (les branleurs), Ahmed, Jason, Justine, Eros, Diego, Camille, Raph, Lucas, Lola, Gaëlle, Aurélie, Dimitri, Angèle, Apo, Delphine, Bryan et Sylvain (les losers), PJ, Laetitia, Antoine, Mel, Léa, Amandine, Séverine, Laure, Pierre, Jacques, Thomas, Julie, Julie, Alice, Simon, Simon, Tiphaine, Elodie, PA, Nicoletta, Laetitia. Nous ne sommes pas tous très proches, mais quand on se retrouve autour d'un café ou d'un verre, on passe toujours des bons moments et c'est important pendant un doctorat! Gros big up à mon ptit groupe plus restreint du labo (il se reconnaîtra parmi la liste précédente) avec qui nous avons passé beaucoup de temps au labo, en dehors du labo, chez les uns, chez les autres, aux fléchettes...Merci à vous d'avoir été là depuis le début ou d'avoir accroché le wagon en route et de m'avoir accompagné et soutenu jusqu'à la fin, encore plus pendant les derniers mois et encore plus Alex ;-)! Vous voir tous les jours égaye chaque moments passés au labo :-D

Merci au COPCU (dont je suis aussi l'un des membres fondateurs) ! Le professionnalisme et le sérieux est toujours de mise quand il s'agit de manger, nous avons su fédérer autour de notre imagination débordante (comme du lait qui bout) et notre organisation parfaite (tel une pièce montée) un bon groupe de joyeux pâtissiers et chaque dégustation est une fête ! Et rien ne serait pareil s'il n'y avait pas la délectable prose de Sarah, notre chère responsable com. Longue vie au COPCU ! Mathieu, Président d'honneur du COPCU.

Merci aux potos pas du labo : Camille, Ronan, Nadège, Jérôme, Anaïs, Nico « No Chuck », Marie, Michaël, Simon « Boné », Briec, Chloé, Marc, Baptiste, Théo, Brice, Milan, pour s'être recroisé pendant mon doctorat, à des moments inattendus parfois mais qui tombaient à pic, ou pour



avoir passé de nombreuses soirées et moments ensemble. Vous avez suivi chaque étape, avancement dans mes recherches, moyennant une petite vulgarisation de ma part, qui était toujours appréciée !

Merci au groupe de capoeira Origem Negra et les amis de la capoeira : Aventura, Foguete, Mya, Marga, Pixote, Pezinho, Zoinho, Moinhos, Rhamzi, Paixão, Bisonte, Axé, Guerreiro, Cebolinha, Viva, Chicote, Letizia, Bibiche, Cafeina, Alexis, Benoit, Rambo, Leidson, Porreta, Alan, Martial, Splinter, Viuva, Grande, Pauline, Joaquina. Vous m'avez vu avancer dans la capoeira et mes études depuis le début (pour certains) puis la thèse avançant et quelques blessures arrivant, vous m'avez vu de moins en moins... On a passé de super moments à Nantes, à droite à gauche en France. La capoeira était un rêve que j'ai réalisé grâce à vous et que je ne vais pas lâcher si facilement non plus, elle est dans mon cœur et dans mon corps, et j'y reviendrai dans le futur. Viva Capoeira, Origem Negra é Axé !

Merci aux nouveaux amis du groupe de JDR pour l'évasion dans le monde horrifique mais fascinant du dieu calamar (qu'on voudrait bien passer à la casserole) : Pierre, Baptiste, Jacques et Jérémy (+ Nico déjà cité). Ces rencontres sont à chaque fois très appréciées et l'aventure ne fait que commencer, pour le meilleur mais surtout le pire...

Merci aux nouveaux amis du stream, le petit noyau dur des gens extrêmement cool qui viennent me voir en train de me prendre la tête et râler (pour être poli) sur le stun-lock, le skip de L'Ecaille, Troll-man et tous les autres bosses de ce superbe jeu qu'est Furi, et plus récemment sur d'autres avec une humaine emmené de force dans des limbes obscures, un petit technicien de surface qui saute partout et un gros dur sans visage qui « poutre des gueules » (fini la politesse, là y a pas d'autre expression^^) ! Xerxes, Pelote, Angelym, Dimi, Seth, Bobo, Janthe, Dirca, Leandraa. Certains sont là depuis le début, m'ont donné des conseils, d'autres depuis moins longtemps, en tout cas on se marre à chaque fois, et c'est ça qui donne envie de continuer ! J'en profite pour remercier Emeric Thoa, Audrey Leprince, Benjamin Le Moullec, avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger et discuter, et tous les autres de chez The Game Bakers : ma vie actuelle ne serait pas la même si je n'avais pas rencontré Furi il y a 1 an (sincèrement) !

Merci à ma famille : mes parents Isabelle et Henri, ma sœur Emilie, mon frère Thomas, mon frère de cœur Thomas « Michel ». C'était pas clair tous les jours quand on se retrouvait (non Maman, je ne bosse pas sur le VIH...) mais vous étiez là pour discuter de mon projet, de ses avancées, de la vie de thésard, de la vie tout court. Depuis le sud de la Bretagne, le sud de la Normandie, du haut de la montagne ou outre-atlantique dans ct'ostie d'tabarnak de pays (aucun québécois n'a été malmené

pendant l'écriture de cette phrase), on trouvait le temps pour se voir et se changer les idées (surtout moi^^) ! Merci.

Camille, le mot de la fin sera aussi pour toi. Notre histoire remonte à bien avant la thèse, on a commencé à se suivre en L1 (la 2ème L1 pour moi) et on a fait notre chemin ensemble jusqu'ici. Pas facile tous les jours, de la joie, des pleurs, de la fatigue, de la complicité, des moments inoubliables, des coups durs, du partage, du courage, de l'honnêteté...c'est tout ça qu'a été notre vie ensemble et qui nous a accompagné quand on s'est lancé dans le doctorat. Tout ne s'est pas passé comme prévu, la vie est venue mettre son grain de sable là-dedans, et avec le recul je pense qu'elle a eue raison. Ce petit paragraphe sera pour nous rendre hommage, et il sera bien rangé dans une étagère de la BU (ou sur un serveur sur le net), où les générations futures de doctorant viendront s'inspirer et se diront sûrement « Il s'est fait plaisir sur ses remerciements lui ! », et ils auront raison (c'est ça qu'est bon !) ^^ Je digresse, mais c'est moi, tu me connais. J'écris cela après ta soutenance, alors encore félicitations ! Le prochain sur la liste c'est moi. Merci d'avoir été là, tous les jours et tout au long de nos longues études, et, malgré tout, merci d'être encore là, en ce qui concerne le futur, l'avenir nous le dira :-). En tout cas, c'est l'heure de vivre maintenant !

Tous ces gens m'ont aidé, de près ou de moins près, volontairement ou sans le savoir, à réaliser ce doctorat.

Merci à ceux qui auront lu ces remerciements jusqu'au bout, et maintenant il est temps de passer aux choses sérieuses...

# Sommaire

Résumé .....	11
Abstract .....	12
Liste des abréviations .....	13
<b>INTRODUCTION</b> .....	19
<b>Les polyomavirus humains</b> .....	21
I. Historique des découvertes .....	21
II. Caractéristiques générales .....	22
III. La particule virale .....	23
IV. Le génome viral .....	25
1. La région précoce .....	25
2. La région tardive .....	25
3. Le NCCR .....	25
<b>Le polyomavirus BK</b> .....	27
I. Mise en contexte .....	27
II. Le cycle d'infection du virus .....	28
1. Interaction du virus avec son récepteur .....	28
2. Entrée dans la cellule cible .....	29
2.1 Introduction aux voies d'endocytose des cellules de mammifères .....	29
2.2 Internalisation du BKPyV .....	32
3. Cheminement intracellulaire .....	33
4. Production intranucléaire et libération des virions .....	34
III. PVAN et pathologies associées au BKPyV .....	35
1. La néphropathie associée au polyomavirus .....	36
2. La cystite hémorragique .....	38
3. BKPyV et cancer .....	38
IV. Réponses immunitaires anti-BKPyV .....	38
1. La réponse immunitaire innée .....	38
1.1 Les cellules dendritiques .....	38

1.2	Les cellules « <i>Natural Killer</i> » .....	39
2.	La réponse immunitaire adaptative .....	39
2.1	La réponse humorale.....	39
2.2	La réponse T .....	40
V.	Les solutions thérapeutiques .....	40
1.	Les immunoglobulines intraveineuses .....	41
2.	Le cidofovir .....	41
3.	Le leflunomide .....	41
4.	Les fluoroquinolones .....	42
5.	Injection de lymphocytes T spécifiques.....	42
	<b>Les cellules dendritiques humaines</b> .....	<b>43</b>
I.	Caractéristiques générales .....	43
II.	Les sous-populations de cellules dendritiques.....	44
III.	Les cellules dendritiques myéloïdes .....	45
1.	Localisation.....	45
2.	Propriétés .....	48
2.1	La présentation antigénique .....	48
2.2	Détection des signaux de danger .....	50
2.3	Maturation .....	51
2.4	Sécrétion de cytokines et immunomodulation .....	52
3.	Cellules dendritiques myéloïdes et virus.....	55
3.1	Transmission de virus via les mDC.....	55
3.2	Papillomavirus .....	55
3.3	Polyomavirus .....	56
4.	Les cellules dendritiques myéloïdes dans le rein .....	57
4.1	Rein hors infection à BKPyV .....	58
4.2	Le cas de la PVAN .....	58
	Hypothèse de travail .....	59
	<b>RESULTATS</b> .....	<b>61</b>

**CONCLUSION – PERSPECTIVES** ..... 133  
**REFERENCES** ..... 139  
**ANNEXE** ..... 165



## Résumé

Le polyomavirus BK (BKPyV) est un virus ubiquitaire humain infectant environ 80% de la population mondiale. La primo-infection conduit à une persistance du virus à bas bruit dans les épithélia rénaux-urinaire. Le virus peut rester ainsi tout au long de la vie de l'individu infecté sans causer de complications. C'est un virus de l'immunodéprimé : il est la première cause d'origine infectieuse de perte de greffon chez les patients transplantés rénaux, qui reçoivent un traitement immunosuppresseur pour diminuer les risques de rejet. Chez ces patients, il se réactive et se réplique activement, causant une maladie appelée néphropathie associée au polyomavirus (PVAN). Pendant des étapes précoces de cette pathologie, le virus est retrouvé dans le sang des patients, on parle de virémie. Son maintien est corrélé à un mauvais pronostic pour les patients. Le génome du BKPyV a été détecté dans les cellules immunitaires sanguines, sans pour autant identifier une population cellulaire particulière comme porteuse du génome.

Les cellules dendritiques myéloïdes (mDC), des acteurs primordiaux de l'induction et la polarisation des réponses immunes, ont été mises en évidence dans le rein, à proximité des sites de réactivation du BKPyV. Aussi, il a été montré que ces cellules infiltraient spécifiquement le rein lors d'une PVAN, sans pour autant qu'un rôle leur soit attribué. Enfin, elles ont été montrées comme étant détournées de leur fonction initiale par plusieurs virus pour aider leur infection. Basé sur ces arguments, nous avons posé la question d'une implication des mDC dans la sortie du virus du rein, conduisant *in fine* à l'établissement de la virémie. En testant cette hypothèse, nous avons mis en évidence la capacité des mDC humaines à fixer, internaliser et transmettre le BKPyV à des cellules permissives. Étonnamment, cette interaction ne conduit pas à la maturation des mDC immatures, posant la question d'un éventuel mécanisme d'échappement immunitaire lié au virus. Une étude plus approfondie chez des patients transplantés rénaux permettra de clarifier d'autant plus le rôle que peuvent avoir ces cellules dans cette infection.

## Abstract

The BK polyomavirus (BKPyV) is a ubiquitous human virus infecting 80% of the worldwide population. The primo-infection leads to a low-level and long-lasting persistence of the virus in the reno-urinary epithelia. The BKPyV reactivates in immunocompromised individuals like HIV-diseased patients or allograft recipients. It is the first infectious cause of graft loss in kidney transplanted (KTx) patients who receive immunosuppressive drugs to impair organ rejection. In KTx patients, the virus reactivates and replicates actively, leading to a disease called polyomavirus associated nephropathy (PVAN). During early steps of this pathology, the virus is found in the blood of patients, i.e. viremia. Long-lasting viremia is correlated with a poor outcome for patients. The BKPyV genome has been detected in blood immune cells, yet not identifying a particular cell population associated with the viral genome.

Myeloid dendritic cells (mDC), key players in the induction and polarization of immune responses, have been described in kidney, next to BKPyV reactivation sites. Also, it has been shown that these cells infiltrate specifically the kidney during PVAN. Finally, they have been shown to be hijacked from their original function by several viruses to help their infection. Based on these observations, we wondered if mDC could be involved in the viruria, i.e. virus in the urines, to viremia transition. By investigating this hypothesis, we have shown that human mDC can bind, internalize and transmit BKPyV to permissive cells. Surprisingly, this interaction does not lead to maturation of immature mDC, asking the question of a putative immune evasion mechanism of the virus. An extensive study in kidney transplant recipients will allow clarification of the role that mDC could have in this infection.



## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AP** : « *Activator Protein* », Protéine activatrice

**ARN** : Acide ribonucléique

**BCCA** : « *Blood Dendritic Cells Antigen* », Antigène des cellules dendritiques sanguines

**BKPyV** : Polyomavirus BK

**BSA** : « *Bovine Serum Albumin* », Albumine de sérum bovin

**Cav-1** : Cavéoline 1

**CCL** : « *C-C motif Ligand* », Ligand à motif C-C

**CCR** : « *C-C Chemokine Receptor* », Récepteur aux chimiokines C-C

**CD** : « *Cluster of Differentiation* », Cluster de différenciation

**CD40L** : « *CD40 Ligand* », Ligand du CD40

**CLIC/GEEC** : « *Clathrin-Independent Carrier/GPI-AP-enriched Early Endosomal Compartment* »

**CLR** : « *C-type Lectin Receptor* », Récepteur lectine de type C

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**CPA** : Cellules présentatrices d'antigènes

**CTL** : « *Cytotoxic T Lymphocyte* », Lymphocyte T cytotoxique

**CTxB** : « *Cholera Toxin B sub-unit* », Sous-unité B de la toxine cholérique

**CXCR** : « *C-X-C motif Chemokine Receptor* », Récepteur aux chimiokines à motif C-X-C

**DAMP** : « *Damage-Associated Molecular Pattern* », Motif moléculaire associé aux dommages

**DC** : « *Dendritic cells* », Cellules dendritiques

**DC-SIGN** : « *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* »

**EBV** : Virus Epstein-Barr

**EEA-1** : « *Early Endosome Antigen 1* », Antigène 1 des endosomes précoces

**EGFP** : « *Enhanced Green Fluorescent Protein* », Protéine fluorescente verte améliorée

**ERAD** : « *Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation* », Dégradation des protéines associée au réticulum endoplasmique

**GRAF-1** : « *GTPase Regulator Associated with Focal adhesion kinase-1* », GTPase régulatrice associée avec les kinases d'adhésion focale 1

**gRNA** : « *guide RNA* », ARN guide

**HaPyV** : Polyomavirus du hamster

**hCMV** : Cytomégalovirus humain

**HLA** : « *Human Leucocyte Antigen* », Antigène leucocytaire humain

**HPV** : Papillomavirus humain

**HPyV** : Polyomavirus humain

**hRPTEC** : « *Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells* », Cellules épithéliales tubulaires proximales rénales humaines

**HSV** : Virus *Herpes simplex*

**IFN $\gamma$**  : Interféron  $\gamma$

**Ig** : Immunoglobuline

**IL** : Interleukine

**infDC** : « *Inflammatory DC* », DC inflammatoires

**IRF** : « *Interferon Regulatory Factor* », Facteur régulateur de l'interféron

**IVIG** : « *Intravenous Immunoglobulin* », Immunoglobulines intraveineuses

**JCPyV** : Polyomavirus JC

**KIPyV** : Polyomavirus de la Karolinska Institute

**KIR** : « *Killer cell Ig-like Receptor* », Récepteur des cellules tueuses ressemblant aux Ig

**LB** : Lymphocytes B

**LC** : « *Langerhans Cells* », Cellules de Langerhans

**LGP2** : « *Laboratory of Genetics and Physiology 2* », Laboratoire de génétique et physiologie 2

**Lin** : Lignage

**LIPyV** : Polyomavirus Lyon IARC

**LT** : Lymphocytes T

**LTA<sub>g</sub>** : « *Large T antigen* », Grand antigène de tumeur

**MAPK** : « *Mitogen-Activated Protein Kinases* », Protéines kinases activées par les mitogènes

**MCPyV** : Polyomavirus à cellules de Merkel

**MDA-5** : « *Melanoma Differentiation-Associated protein 5* », Protéine 5 associée à la différenciation du mélanome

**mDC** : « *Myeloid Dendritic Cells* », Cellules dendritiques myéloïdes

**MDDC** : « *Monocyte Derived-Dendritic Cells* », Cellules dendritiques dérivées de monocyte

**ME** : Microscopie électronique

**MET** : Microscopie électronique à transmission

**MOI** : « *Multiplicity Of Infection* », Multiplicité d'infection

**MPyV** : Polyomavirus murin

**MWPyV** : Polyomavirus Malawi

**NCCR** : « *Non-Coding Control Region* », Région de contrôle non codante

**NFκB** : « *Nuclear Factor-Kappa B* », Facteur nucléaire kappa B

**NJPyV** : Polyomavirus du New Jersey

**NK** : « *Natural Killer* », Tueuses naturelles

**NLR** : « *Nod-Like Receptor* », Récepteur ressemblant à Nod

**NLS** : « *Nuclear Localisation Signal* », Signal de localisation nucléaire

**OL** : Organes lymphoïdes

**OLP** : Organes lymphoïdes primaires

**OLS** : Organes lymphoïdes secondaires

**ORF** : « *Open Reading Frame* », Cadre ouvert de lecture

**PAMP** : « *Pathogen-Associated Molecular Pattern* », Motif moléculaire associé au pathogène

**PBDC** : « *Peripheral Blood DC* », DC du sang périphérique

**PBMC** : « *Peripheral Blood Mononuclear cells* », cellules mononuclées du sang périphérique

**PBS** : « *Phosphate Buffer Saline* », Tampon phosphate salin

**PCR** : « *Polymerase Chain Reaction* », Réaction en chaîne de la polymérase

**pDC** : « *Plasmacytoid Dendritic Cells* », Cellules dendritiques plasmacytoïdes

**PFA** : Paraformaldéhyde

**PRR** : « *Pattern Recognition Receptor* », Récepteur de reconnaissance des motifs

**PSA** : « *Prostate Specific Antigen* », Antigène spécifique de la prostate

**PVAHC** : « *Polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis* », Cystite hémorragique associée au polyomavirus

**PVAN** : « *Polyomavirus-associated nephropathy* », Néphropathie associée au polyomavirus

**RE** : Réticulum endoplasmique

**rEGFP** : « *recombinant EGFP* », EGFP recombinante

**RER** : Réticulum endoplasmique rugueux

**RI** : Réponse immunitaire

**RIG-I** : « *Retinoic acid-Inducible Gene I* », Gène I inductible par l'acide rétinoïque

**RIR** : « *Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like Receptor* », Récepteur ressemblant au gène I inductible par l'acide rétinoïque

**rr-NCCR** : NCCR réarrangé

**RT** : « *Room Temperature* », Température ambiante

**SIDA** : Syndrome de l'immunodéficience acquise

**sTA<sub>g</sub>** : « *small T antigen* », Petit antigène de tumeur

**STLPyV** : Polyomavirus de Saint-Louis

**SV40** : Virus simien 40

**TCR** : « *T Cell Receptor* », Récepteur des cellules T

**T<sub>H</sub>** : Lymphocyte T « *helper* »

**TLR** : « *Toll-Like Receptor* », Récepteur ressemblant à Toll

**TNF** : « *Tumor Necrosis factor* », Facteur de nécrose des tumeurs

**TruncTA<sub>g</sub>** : « *Truncated T antigen* », Antigène de tumeur tronqué

**TSPyV** : Polyomavirus associé à la trichodysplasie spinuleuse

**ULBP** : « *UL16 Binding Protein* », Protéine fixant UL16

**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

**VLP** : « *Virus-Like Particles* », Pseudo-particules virales

**WGA** : « *Wheat Germ Agglutinin* », Agglutinine de germe de blé

**WUPyV** : Polyomavirus de la Washington University

**ww-NCCR** : NCCR archétypale

# **INTRODUCTION**





# Les polyomavirus humains

## I. Historique des découvertes

Les deux premiers polyomavirus humains à avoir été découverts sont les polyomavirus BK (BKPyV) et JC (JCPyV), nommés selon les initiales respectives des patients dont ils ont été isolés, en 1971. Le BKPyV a été découvert dans les urines d'un patient transplanté rénal (Gardner et al., 1971). Ce virus est responsable de la néphropathie associée au polyomavirus (PVAN) chez les patients transplantés rénaux (Nickeleit et al., 1999) et de cystites hémorragiques (PVAHC) chez les patients transplantés de cellule souches hématopoïétiques (Arthur et al., 1986). Le JCPyV a été découvert dans le liquide céphalo-rachidien d'un patient souffrant de leucoencéphalopathie multifocale progressive (Padgett et al., 1971), dont il est l'agent étiologique.

Ce n'est qu'une trentaine d'années plus tard, avec l'amélioration des techniques d'analyses de biologie moléculaire, que de nombreux autres polyomavirus humains ont été découverts et sont encore découverts aujourd'hui : les polyomavirus de la Washington University (WUPyV) et du Karolinska Institute (KIPyV) ont été isolés de patients souffrant d'infections aiguës du tractus respiratoire (Allander et al., 2007; Gaynor et al., 2007). Le polyomavirus à cellules de Merkel (MCPyV) a été identifié à partir de biopsies de carcinome à cellules de Merkel (Feng et al., 2008), un carcinome cutané agressif mais rare. C'est le premier polyomavirus humain associé directement à la survenue de cancer. En 2010, les polyomavirus humains 6 et 7 (HPyV6 et HPyV7) sont découverts sur des prélèvements de peau saine (Schowalter et al., 2010) et le polyomavirus associé à la trichodysplasie spinuleuse (TSPyV) a été isolé d'un patient transplanté cardiaque ayant développé cette manifestation cutanée rare (van der Meijden et al., 2010). Un an plus tard, le HPyV9 est découvert dans des échantillons de patients transplantés rénaux (Scuda et al., 2011) puis deux nouveaux polyomavirus, le polyomavirus Malawi (MWPyV) et le polyomavirus Saint-Louis (STLPyV), sont découverts au Malawi dans des selles de nourrissons et dans le microbiote intestinal d'enfant respectivement (Lim et al., 2013; Siebrasse et al., 2012). L'année suivante, le HPyV12 est isolé de prélèvements d'organes du tube digestif (foie, cæcum, rectum), à la fois sain et pathologique, et le polyomavirus du New Jersey (NJPyV) est identifié chez une patiente transplantée du pancréas et présentant une myopathie, une acuité visuelle en baisse et des lésions cutanées nécrosantes (Korup et al., 2013; Mishra et al., 2014). Enfin, le dernier polyomavirus humain découvert en date est le polyomavirus Lyon IARC (LIPyV) identifié sur des prélèvements de peau saine (Gheit et al., 2017). Les 14 polyomavirus humains et leurs caractéristiques sont résumés dans le tableau I.

**Tableau I. Découverte des 14 polyomavirus humains connus actuellement**

Nom	Abréviation	Année de découverte	Tissu/origine de l'isolement	Pathologies associées	Références
Polyomavirus BK	BKPyV	1971	Urines	PVAN, cystite hémorragique	Gardner et al., 1971
Polyomavirus JC	JCPyV	1971	Liquide céphalo-rachidien	Leucoencéphalopathie multifocale progressive	Padgett et al., 1971
Polyomavirus de la Washington Institute	WUPyV	2007	Tractus respiratoire	-	Gaynor et al., 2007
Polyomavirus du Karolinska Institute	KIPyV	2007	Tractus respiratoire	-	Allander et al., 2007
Polyomavirus à cellules de Merkel	MCPyV	2008	Peau	Carcinome à cellules de Merkel	Feng et al., 2008
Polyomavirus humain 6	HPyV6	2010	Peau	-	Schwalter et al., 2010
Polyomavirus humain 7	HPyV7	2010	Peau	-	Schwalter et al., 2010
Polyomavirus associé à la trichodysplasie spinuleuse	TSPyV	2010	Peau	Trichodysplasie spinuleuse	van der Meijden et al., 2010
Polyomavirus humain 9	HPyV9	2011	Sang, urines	-	Scuda et al., 2011
Polyomavirus Malawi	MWPyV	2012	Selles	-	Siebrasse et al., 2012
Polyomavirus de Saint-Louis	STLPyV	2012	Selles	-	Lim et al., 2012
Polyomavirus humain 12	HPyV12	2013	Foie, cæcum, rectum	-	Korup et al., 2013
Polyomavirus du New Jersey	NJPyV	2013	Biceps	Lésions cutanées nécrosantes	Mishra et al., 2014
Polyomavirus Lyon IARC	LIPyV	2017	Peau	-	Gheit et al., 2017

## II. Caractéristiques générales

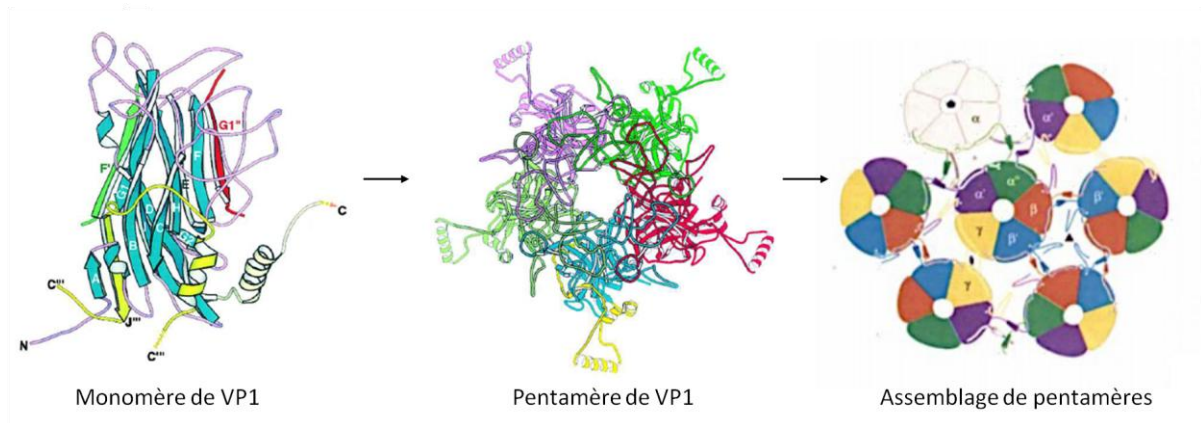
Les polyomavirus sont des virus ubiquitaires qui infectent leur hôte de manière asymptomatique (Knowles, 2006). La primo-infection a lieu durant l'enfance et leur voie d'entrée dans l'organisme n'est pas identifiée mais semble très probablement impliquer les voies aériennes (Goudsmit et al., 1982; Hirsch and Steiger, 2003). Suite à la primo-infection ces virus atteignent leurs organes cibles (rein, cerveau, moelle osseuse...) et entrent en phase dite latente, même si on observe pour certains polyomavirus, BK et JC notamment, des épisodes de réplication chez l'individu immunocompétent avec élimination des virus dans les urines, sans complications associées (Doerries, 2006; Knowles, 2006; Polo et al., 2004). Ils appartiennent à la famille des *Polyomaviridae* (Johne et al., 2011), une famille de petits virus (environ 45nm de diamètre) caractérisés par une capsidie icosaédrique non enveloppée renfermant un génome ADN double brin d'environ 5 kilobases (Cubitt, 2006; Takemoto and Mullarkey, 1973). Ce sont des virus de l'immunodéprimé, les manifestations cliniques et complications qui leur sont associées n'apparaissent que chez des individus recevant un traitement immunosuppresseur pour cause de greffe ou chez les individus séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Burger-Calderon et al., 2013). Ces patients ont un système immunitaire globalement affaibli mais particulièrement les acteurs de l'immunité adaptative, cruciale dans la défense contre les virus, sont affectés. Les polyomavirus sont

donc considérés comme des virus opportunistes. Dans ce contexte d'immunosuppression, le virus va entrer en réplication active et devenir pathologique si elle n'est pas contrôlée. On parle de réactivation des polyomavirus (Ahsan and Shah, 2006).

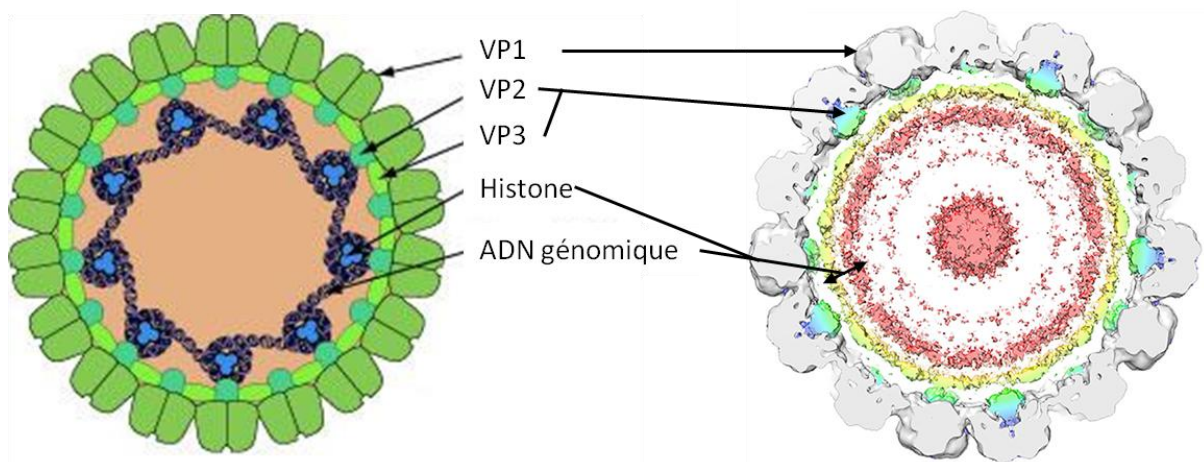
### III. La particule virale

La capsid virale est composée de 72 capsomères, chacun comptant cinq exemplaires de la protéine majeure de capsid VP1 qui s'auto-assemblent pour former ces pentamères (Chen et al., 2000; Liddington et al., 1991), qui représentent la face externe de la capsid. Une représentation de l'auto-assemblage de la capsid est présenté en figure 1A, basée sur des données d'étude structurale. Chaque pentamère est associé à l'une des deux protéines mineures de capsid VP2 ou VP3 (Chen et al., 1998; Griffith et al., 1992), que l'on retrouve donc en face interne de la capsid, selon une stœchiométrie précise de une protéine mineure par pentamère de VP1. Protégé dans la capsid et en interaction avec la protéine VP2, se trouve le génome ADN double brin du virus, associé aux histones cellulaires H2A, H2B, H3 et H4 qui sont encapsidées pendant la réplication virale (Pagano, 1984). Une vue de la structure interne du virus est représentée en figure 1B.

A



B



**Figure 1 : Auto-assemblage de la capside et structure interne schématisés des polyomavirus. (A)** Structure du monomère de VP1 avec un « noyau » central en feuillet  $\beta$ , ces feuilletts entrent en contact pour former les pentamères avec les bras C-terminaux de chaque VP1 tournés vers l'extérieur de la structure permettant l'association entre plusieurs capsomères (adapté de Liddington et al., 1991 et Chen et al., 2000) . **(B)** La structure interne en coupe de la particule virale représentant les protéines de capside en interaction entre elles et avec le génome empaqueté avec les histones est schématisée à gauche (Swiss Institute of Bioinformatics) et la même coupe issue de résultats de structuralisme est présentée à droite (Hurdiss et al., 2016).

## IV. Le génome viral

Le génome des polyomavirus est un ADN bicaténaire circulaire divisé en trois régions (Cole, 1996) : la région précoce (« *early* »), la région tardive (« *late* ») et la région de contrôle non codante (NCCR). Les régions précoces et tardives sont séparées par le NCCR et sont encodées en sens opposés. La figure 2 présente un schéma de la structure du génome des polyomavirus, résumant les informations à suivre.

### 1. La région précoce

Elle code pour les protéines régulant la réplication du génome : le grand antigène de tumeur (LTA<sub>g</sub>), le petit antigène de tumeur (sTA<sub>g</sub>) et l'antigène de tumeur tronqué (TruncTA<sub>g</sub>) (Abend et al., 2009). La protéine LTA<sub>g</sub> est indispensable à la réplication du génome (Pipas, 1992), alors que la fonction des deux autres protéines reste indéterminée à ce jour. De plus, la région précoce code pour un micro-ARN qui inhibe l'expression de la protéine LTA<sub>g</sub> et jouerait un rôle dans l'échappement au système immunitaire : il s'associe avec l'ARN messager de la protéine ULBP3, induite par un stress cellulaire, pour réduire sa traduction et ainsi l'expression de la protéine ULBP3, un régulateur important de la réponse immunitaire (RI) des cellules « *Natural Killer* » (NK) (Bauman et al., 2011).

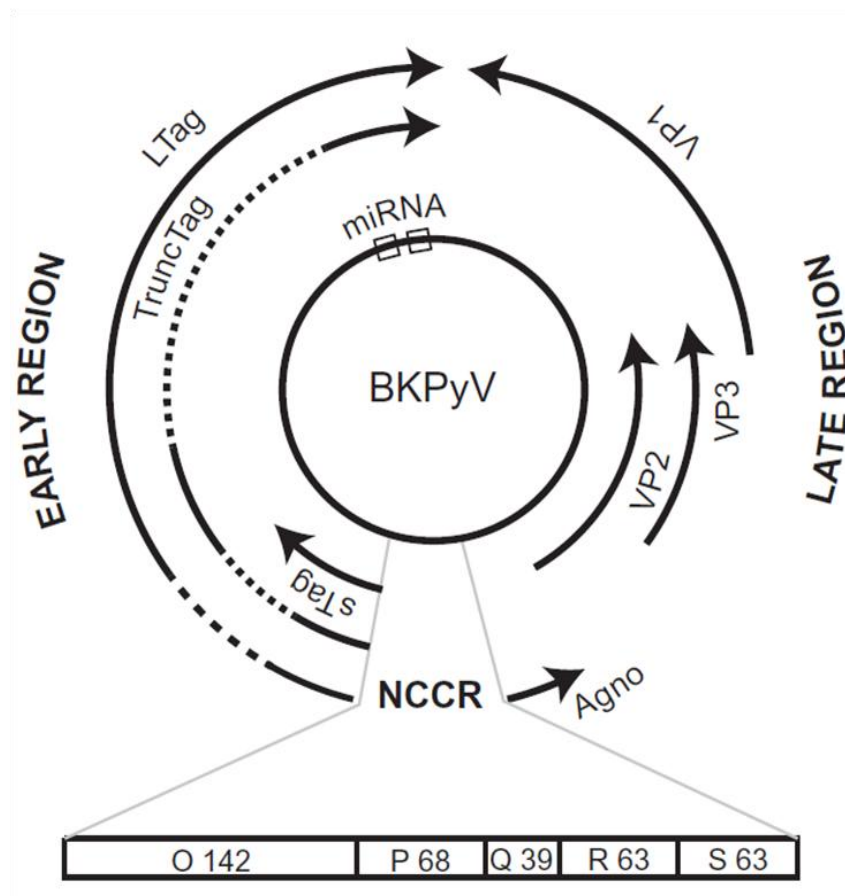
### 2. La région tardive

Elle code pour les trois protéines structurales VP1, VP2 et VP3 ainsi que pour une protéine dont la fonction est mal connue, l'agnoprotéine. Les protéines VP2 et VP3 présentent toutes deux une séquence signal de localisation nucléaire (NLS), ainsi elles participent à l'entrée du génome viral dans le noyau de sa cellules cible (Bennett et al., 2015). Il a été proposé que l'agnoprotéine ait un rôle inhibiteur de la réplication virale dans les dernières phases du cycle de réplication, lors de la synthèse des protéines de capsid puis de l'encapsidation (Gerits et al., 2015).

### 3. Le NCCR

C'est la région de contrôle de la réplication et de l'expression du génome. Il contient tous les éléments nécessaires à l'expression du génome viral : l'origine de réplication et un promoteur bidirectionnel contenant les sites de fixation des facteurs de transcriptions. Il a été arbitrairement découpé en cinq blocs O, P, Q, R et S. Le nombre et l'arrangement de ces segments géniques varient et conduit à distinguer deux types de NCCR différents : le NCCR archétypal (ww-NCCR), qui a la structure classique OPQRS, et le NCCR réarrangé (rr-NCCR), dans lequel on retrouve des insertions, délétions ou duplications de ces régions. Le ww-NCCR est retrouvé majoritairement dans les virus

présents dans les urines des individus sains ou patients en début de réactivation, le rr-NCCR est retrouvé dans le virus des patients souffrant de maladies causées par les polyomavirus, donc plus tardivement après réactivation. En effet, la présence de rr-NCCR a été corrélée à une augmentation de la capacité répliquative, des effets cytopathogènes accrus et à des aggravations des symptômes de la néphropathie à BKPyV (virurie, virémie, atrophie tubulaire rénale) (Gosert et al., 2008) et ont été retrouvés chez des patients atteints de sclérose en plaque infectés par le JCPyV par exemple (Pietro Paolo et al., 2015).



**Figure 2 : Schéma du génome du BKPyV.** Les cadres ouverts de lecture (ORF) des différents gènes du génome du BKPyV sont représentés, avec le NCCR possédant le promoteur bidirectionnel séparant les deux régions. Les régions O, P, Q, R et S sont indiquées avec le nombre de nucléotides qu'elles comptent. Les protéines TAg, ainsi que VP2 et VP3, sont issues du même transcrit qui est épissé différemment (Rinaldo et al., 2013).

# Le polyomavirus BK

## I. Mise en contexte

Le BKPyV infecte de manière asymptomatique environ 80% de la population mondiale (Knowles, 2006). Son lieu de latence suite à la primo-infection chez les individus immunocompétents est les épithélia rénaux-urinaires, notamment les cellules épithéliales tubulaires rénales (Heritage et al., 1981). Suite à sa réactivation en contexte d'immunosuppression, il est responsable du développement de PVAN chez les patients transplantés rénaux, une néphropathie évolutive pouvant conduire à la perte de fonction du greffon, de PVAHC chez les patients transplantés de moelle osseuse et il a été mis en évidence la réplication active du BKPyV dans les glandes salivaires de patients séropositifs pour le VIH développant la maladie des glandes salivaires associée au VIH (Burger-Calderon et al., 2013), renforçant par la même l'hypothèse d'une primo-infection impliquant les voies aériennes supérieures (Hirsch and Steiger, 2003).

Bien qu'il ait été découvert en 1971, c'est une trentaine d'années plus tard que le BKPyV émerge comme un problème de santé publique, principalement chez les patients transplantés rénaux qui vont développer une PVAN après réactivation du virus, suite à l'utilisation en clinique de nouveaux immunosuppresseurs : la cyclosporine A, un inhibiteur de la calcineurine empêchant la production de cytokines par les lymphocytes T (LT) et bloquant ainsi leurs actions, était utilisée à partir des années 80 et les patients transplantés traités à la cyclosporine A ne montraient aucun signe de néphropathie (Binet et al., 1999). Vers 1995, le tacrolimus et le mycophénolate mofetil font leur apparition en clinique. Le tacrolimus fait partie de la famille des inhibiteurs de la calcineurine, il a donc la même action que la cyclosporine A, et le mycophénolate mofetil est un inhibiteur de la biosynthèse des purines particulièrement efficace pour inhiber la prolifération des LT et des lymphocytes B (LB). A partir de ce moment, les cas de PVAN se sont multipliés (Purighalla et al., 1995; Ramos et al., 2002) et, aujourd'hui encore, le BKPyV est considéré comme la première cause infectieuse de perte de greffon (Hirsch et al., 2002; Randhawa et al., 1999). Le groupe du Pr Hirsch, spécialiste du BKPyV et de sa réactivation chez les patients transplantés rénaux, a montré récemment par des études *in vitro* l'effet inhibiteur de la cyclosporine A et du sirolimus (un autre immunosuppresseur empêchant la synthèse des anticorps par les LB, sans altérer la production de cytokines comme le font le tacrolimus ou la cyclosporine A) sur la réplication du BKPyV dans les cellules épithéliales tubulaires proximales rénales humaines (hRPTEC), les cellules cibles physiologiques du virus. Ils y démontrent surtout l'effet activateur du tacrolimus sur cette réplication



(Hirsch et al., 2015), ouvrant la voie vers une adaptation des protocoles cliniques pour réduire l'utilisation du tacrolimus.

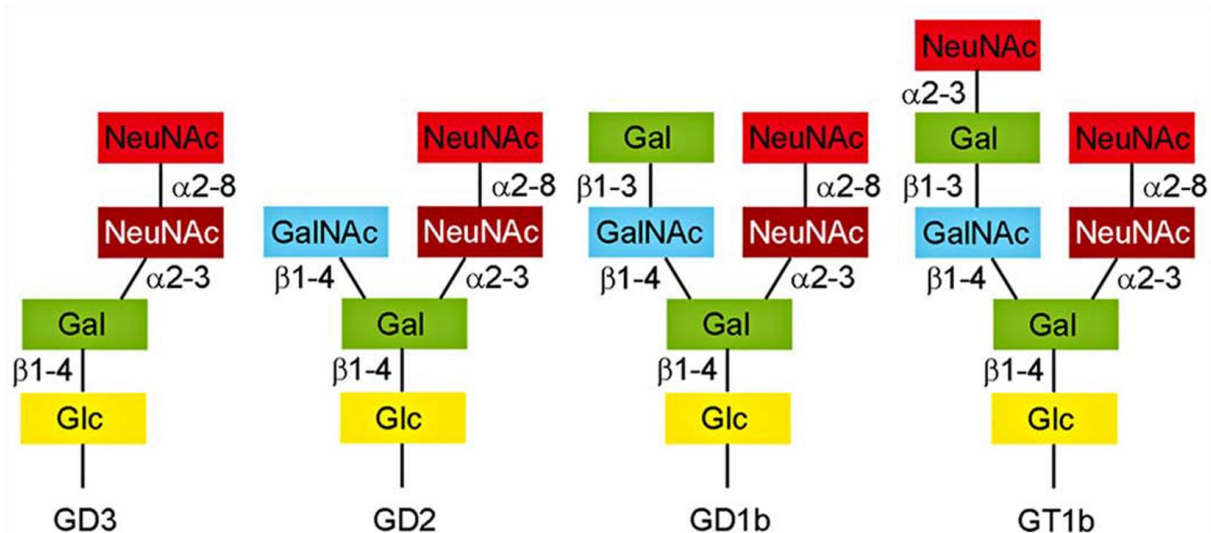
## II. Le cycle d'infection du virus

Le cycle d'infection du virus n'est que partiellement élucidé aujourd'hui. Néanmoins, basé sur des études menées directement sur le BKPyV et sur les similitudes entre les *Polyomaviridae*, il est possible de proposer un cycle d'infection pour ce virus, récapitulé figure 5.

### 1. Interaction du virus avec son récepteur membranaire

Le BKPyV étant un virus non enveloppé, son entrée dans la cellule cible se fait par internalisation dépendante de l'interaction avec un récepteur membranaire à la surface de la cellule cible. Les récepteurs décrits aujourd'hui sont les gangliosides de la série b GT1b et GD1b, leur ajout à la surface de cellules LNCaP, une lignée cellulaire de carcinome de la prostate non susceptible à l'infection par le BKPyV, permettant leur infection par le virus (Low et al., 2006). Les gangliosides sont des glycosphingolipides qui portent au moins un acide sialique sur l'une de leur branche glucidique. Ce sont ces acides sialiques, et l'orientation de leur liaison avec les résidus sucrés, qui sont primordiaux et qui permettent l'infection des cellules cibles par le BKPyV : il a d'abord été décrit que le récepteur portait une liaison  $\alpha$ 2-3, le traitement de cellules VERO, une lignée cellulaire de rein de singe permissive à l'infection par le BKPyV, avec une neuraminidase et la sialidase S qui vont couper les acides sialiques liés en  $\alpha$ 2-3 inhibant leur infection (Dugan et al., 2005). Puis la liaison  $\alpha$ 2-8 entre les deux acides sialiques a été identifiée comme indispensable à l'infection par le BKPyV par des expériences utilisant des pentamères VP1 mutés dans les sites de fixations aux acides sialiques en  $\alpha$ 2-8, montrant que ces pentamères ne pouvaient plus se fixer à ces acides sialiques. Cette étude a aussi montré que tous les gangliosides de la série b permettaient l'infection par le BKPyV des cellules VERO complémentées avec ces gangliosides, soulevant la question de l'existence d'autres récepteurs potentiels pour le BKPyV, autre que GT1b et GD1b (Neu et al., 2013). La figure 3 représente un schéma des gangliosides de la série b.





**Figure 3 : Structure schématique de la chaîne glucidique des gangliosides de la série b.** Les liaisons entre les résidus sucrés portés par les gangliosides de la série b sont représentées. On y identifie les liaisons, à la fois  $\alpha 2-3$  et  $\alpha 2-8$ , nécessaires à l'infection (Neu et al., 2013).

## 2. Entrée dans la cellule cible

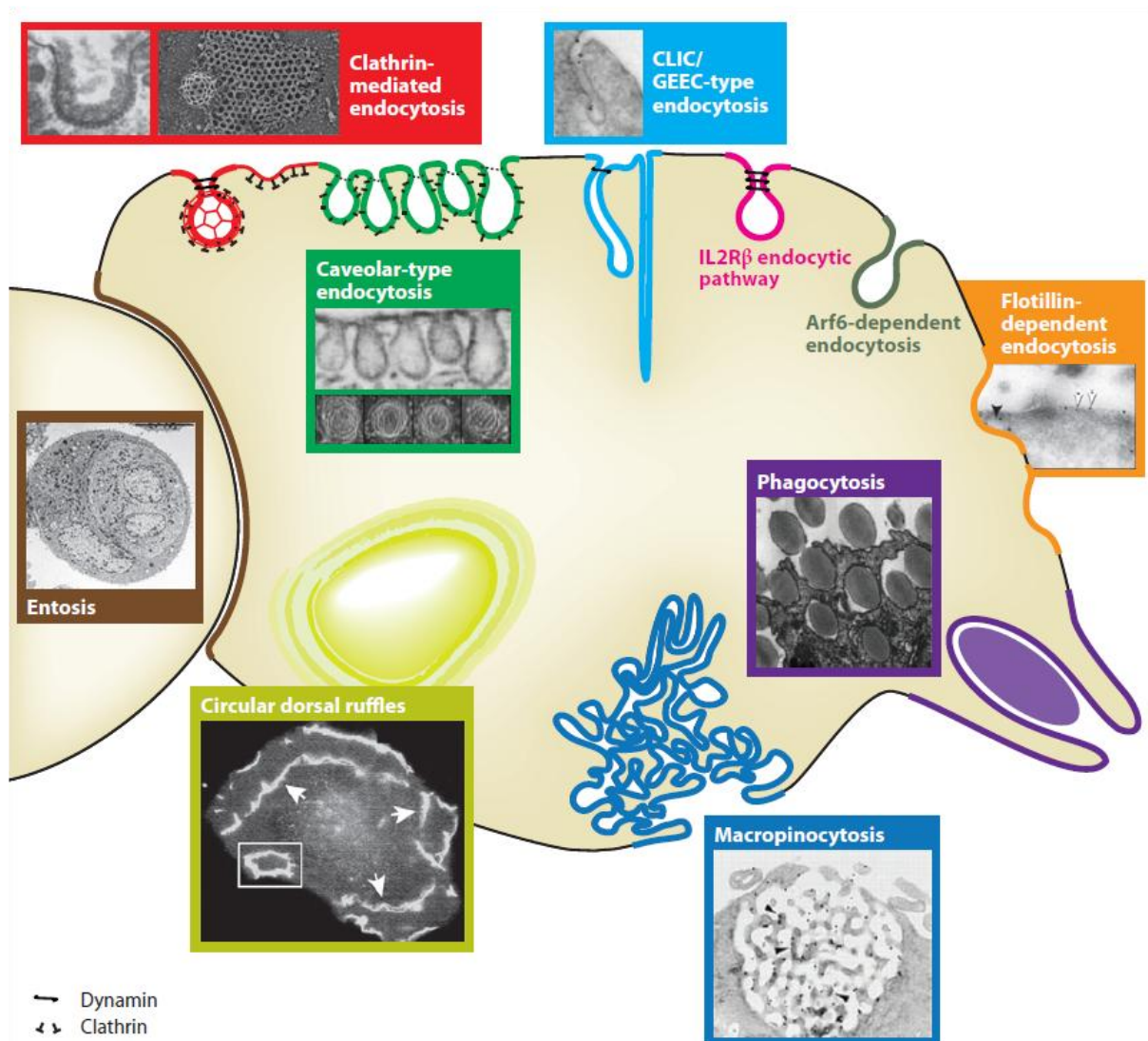
### 2.1 Introduction aux voies d'endocytose des cellules de mammifères

L'endocytose est la seule voie de communication entre les cellules et leur milieu extérieur leur permettant d'internaliser des composants extérieurs variés (appelés cargos) : ce mécanisme permet de renouveler les composants membranaires (comme les différents récepteurs exprimés à la surface cellulaire ou les lipides membranaires) ou d'internaliser les corps apoptotiques par les cellules phagocytaires par exemple, mais c'est aussi un mécanisme privilégié par de nombreux agents pathogènes (virus, toxines bactériennes) pour entrer dans les cellules (Doherty and McMahon, 2009; Mercer et al., 2010). La voie d'endocytose la plus décrite, et longtemps considérée comme la voie privilégiée d'internalisation de molécules dans les cellules car facilement identifiable par microscopie électronique (ME), est l'endocytose dans les vésicules à clathrine (Schmid and McMahon, 2007; Sorkin, 2004). La clathrine est une protéine qui va se polymériser autour d'une zone membranaire destinée à être internalisée. Cela forme un « manteau » autour de la vésicule, qui va la rigidifier et ainsi apparaitre dense aux électrons en ME (Roth and Porter, 1964). Cette voie est notamment empruntée par le JCPyV (Pho et al., 2000). Dans les dernières décennies, de nombreuses voies d'endocytose indépendantes de la clathrine ont été décrites, remettant en cause le modèle de la voie quasi-exclusive de l'endocytose clathrine-dépendante. La morphologie des vésicules de ces voies est présentée en figure 4. Seules trois voies indépendantes de la clathrine, d'intérêt dans les études

menées sur les polyomavirus et dans notre étude, seront décrites dans cette introduction : la voie des cavéoles, la voie « *Clathrin-Independent Carrier/GPI-AP-enriched Early Endosomal Compartment* » (CLIC/GEEC) et la macropinocytose:

- **La voie des cavéoles :** la protéine majoritaire impliquée dans la formation des cavéoles est la cavéoline 1 (Cav-1). Cette protéine va venir s'associer à la queue d'acide gras des glycosphingolipides membranaires présents au niveau des radeaux lipidiques riches en cholestérol (Monier et al., 1996). Elle interagit notamment avec le ganglioside GM1 et le globoside Gb3, qui sont respectivement les récepteurs de la sous-unité B de la toxine cholérique (CTxB)/du polyomavirus SV40 et de la Shiga toxine. Ces interactions participent à courber la membrane et entraînent l'internalisation des cargos susnommés (Eash et al., 2006; Fra et al., 1995; Marzook and Newsome, 2016). Cette internalisation met en jeu plusieurs kinases et phosphatases cellulaires, telles que les tyrosines kinases, mais l'ordre dans lequel les événements de phosphorylation et d'internalisation interviennent n'est pas clairement élucidé (Lamaze et al., 2017). Les cavéoles chargées avec leurs cargos sont ensuite dirigées vers le réseau des vésicules endosomales précoces puis tardives et *in fine* vers le réticulum endoplasmique (RE) (Mercer et al., 2010).
- **La voie CLIC/GEEC :** elle est, elle aussi, dépendante des micro-domaines membranaires riches en lipides, comme le cholestérol (Sabharanjak et al., 2002). Cette voie d'endocytose est caractérisée par la formation de vésicules tubulaires qui sont structurées par la protéine GTPase régulatrice associée avec les kinases d'adhésion focale 1 (GRAF-1) (Lundmark et al., 2008). Cette voie a aussi été associée à l'internalisation de la CTxB et des gangliosides GM1 (Doherty and Lundmark, 2009). Il a aussi été montré l'internalisation indépendante de la clathrine/cavéoline du virus SV40 (Damm et al., 2005). Pour ce virus, l'implication de la voie CLIC/GEEC reste à être déterminée. À l'heure actuelle, cette voie a été associée uniquement à l'endocytose du virus adéno-associé de sérotype 2 (Nonnenmacher and Weber, 2011). La destination intracellulaire des cargos endocytés par la voie CLIC/GEEC semble varier en fonction des types cellulaires, incluant les lysosomes ou les compartiments de recyclage notamment (Fivaz et al., 2002; Sabharanjak et al., 2002)
- **La macropinocytose :** cette voie d'endocytose est caractérisée par l'extension de prolongements cytoplasmiques vers l'extérieur de la cellule pour former une « poche »

permettant l'internalisation d'éléments extracellulaires variés (fluides, corps apoptotiques, virus...). La vésicule d'endocytose, appelée macropinosome, se forme à l'intérieur de la cellule quand le prolongement retourne vers et fusionne avec la membrane plasmique. Les macropinosomes sont de grosses vésicules, pouvant faire jusqu'à 10µm de diamètre (Lim and Gleeson, 2011; Marzook and Newsome, 2016; Mercer et al., 2010). Une fois formés, les macropinosomes peuvent être recyclés vers la surface cellulaire ou entrer dans le réseau d'endosomes précoces/tardifs/lysosomes (Hewlett et al., 1994; Racoosin and Swanson, 1993). L'exemple le mieux décrit de virus empruntant les macropinosomes pour son infection est le virus de la vaccine (Mercer and Helenius, 2008). Aussi, il a été montré par notre équipe l'infection dépendante des macropinosomes de cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC) par le cytomégalovirus humain (hCMV) (Haspot et al., 2012), ainsi que l'infection de fibroblastes primaires humains (Hetzenecker et al., 2016).



**Figure 4 : Les voies d'endocytose des cellules de mammifères.** La morphologie des vésicules des différentes voies d'endocytose décrites, clathrine-dépendantes et indépendantes, sont schématisées et imagées par des photos prises en ME à transmission (MET). On y retrouve notamment les voies des cavéoles et CLIC/GEEC (Doherty and McMahon, 2009).

## 2.2 Internalisation du BKPyV

La voie d'entrée du virus dans ses cellules permissives n'est pas complètement élucidée. Elle se fait par l'intermédiaire de vésicules d'endocytose dont la nature est sujette, encore aujourd'hui, à controverse. Des études menées sur l'entrée du BKPyV dans les cellules VERO et hRPTEC ont montré une internalisation dépendante des cavéoles. L'infection de cellules VERO transfectées avec un mutant de la protéine Cav-1 empêchant la formation des cavéoles est fortement réduite. D'autre part, il a été observé dans cette même étude une colocalisation entre des pseudo-particules virales (VLP) fluorescentes et la CTxB, toxine qui emprunte les cavéoles pour être internalisée (Eash et al.,

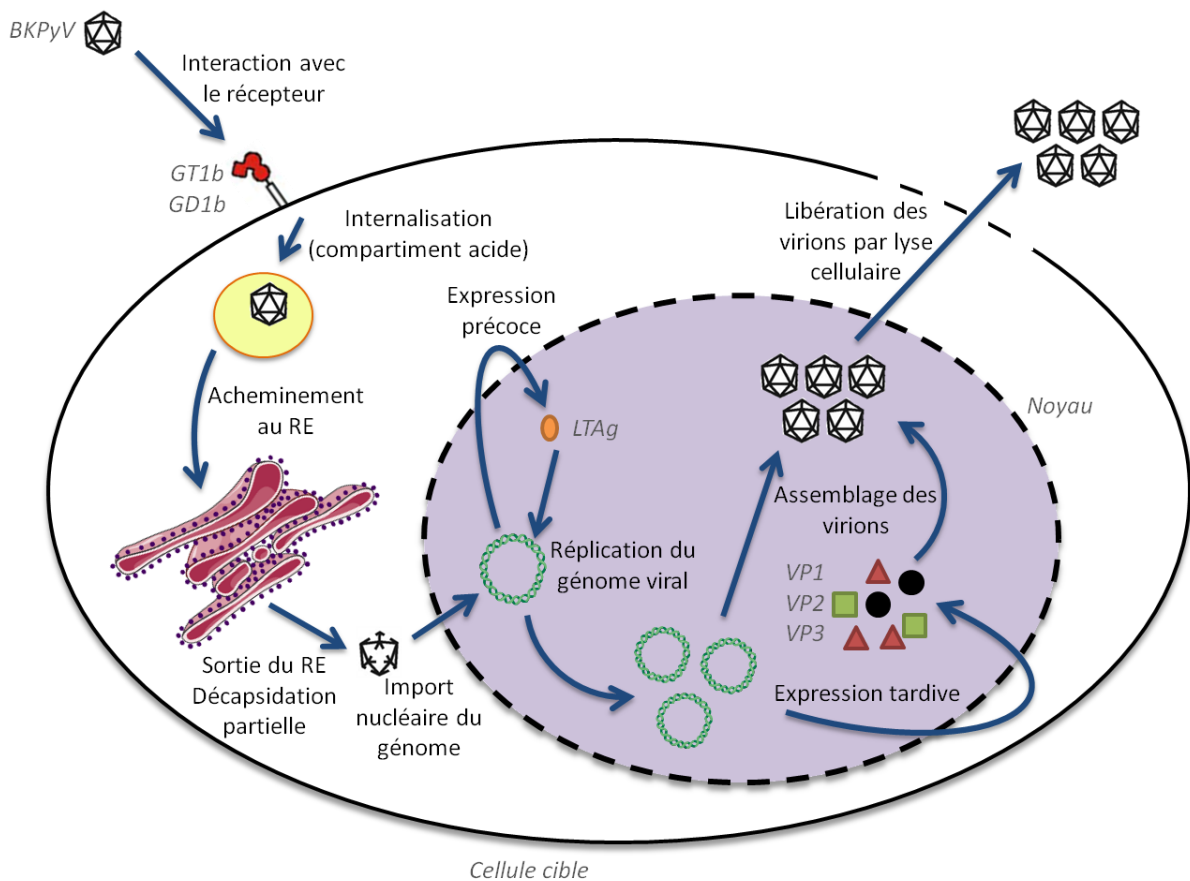
2004). L'infection des hRPTEC dont Cav-1 a été déplétée par interférence ARN est aussi fortement diminuée (Moriyama et al., 2007). Ces deux études montrent aussi l'indépendance d'endocytose impliquant la clathrine. Il a aussi été identifié que cette entrée, et l'infection qui en découle, implique un compartiment acide permettant une première étape de décapsidation, à la fois dans les cellules VERO et hRPTEC (Eash et al., 2004; Jiang et al., 2008). Cependant une étude récente vient contredire ces observations d'internalisation dépendante des cavéoles dans les hRPTEC : le Pr Imperiale, un autre spécialiste du BKPyV, et son équipe ont réalisé des expériences d'interférence ARN ciblant les protéines Cav-1 et Cav-2 impliquées dans la formation des cavéoles et ils n'observent pas de différence dans la production du LTA<sub>g</sub> dans les cellules transfectées ou non. Ils testent aussi l'effet de l'interférence ARN sur les vésicules à clathrine et confirment l'indépendance déjà documentée. Leur conclusion est donc que l'endocytose du BKPyV dans ses cellules hôtes physiologiques, les hRPTEC, est indépendante de la clathrine et de la cavéoline, soulevant l'hypothèse de l'utilisation d'une voie d'endocytose encore non décrite (Zhao et al., 2016) et faisant donc très probablement partie des nombreuses voies d'endocytose indépendantes de la clathrine/cavéoline décrites au paragraphe précédent. Ces études ne permettent donc pas de conclure quant à une voie d'endocytose précise utilisée par le BKPyV pour infecter ses cellules cibles.

### **3. Cheminement intracellulaire**

Le virus est ensuite acheminé vers le RE via les microtubules. Dans le RE, la capsidie continue sa dégradation, rendant ainsi accessible au contenu du compartiment les protéines VP2 et VP3. Le virus interagit ensuite avec la protéine Derlin-1 via la protéine VP1. L'implication du protéasome dans l'infection du BKPyV a aussi été mise en évidence, son inhibition par la lactacystine induisant une forte baisse de la production du LTA<sub>g</sub>. Derlin-1 étant impliquée dans le système de dégradation des protéines associé au RE (ERAD) par le protéasome, il semble donc que la sortie du virus du RE puisse se faire par l'acheminement du virus vers le protéasome via Derlin-1. L'étape précise où le protéasome est impliqué dans l'infection par le BKPyV reste encore à être identifiée mais pourrait aider l'acheminement au noyau, comme ça a déjà été montré pour les herpesvirus ou le virus de la grippe (Bennett et al., 2013; Delboy et al., 2008; Jiang et al., 2008; Khor et al., 2003). A ce stade le virus se trouverait partiellement décapsidé et le génome, associé aux protéines VP2 et VP3, est acheminé dans le noyau grâce à l'interaction des séquences NLS de VP2 et VP3 avec l'importine  $\beta$ , une protéine adaptatrice se fixant aux séquences NLS et impliquée dans la machinerie d'import nucléaire (Bennett et al., 2015). Ces résultats ont été obtenus sur des cellules hRPTEC.

#### 4. Production intranucléaire et libération des virions

Une fois le génome délivré dans le noyau, la région précoce est exprimée. La protéine LTA<sub>g</sub> a pour rôle « d'activer » la cellule en s'associant aux protéines de la famille du rétinoblastome, ce qui stimule le passage en phase S et évite l'apoptose en s'associant à p53 (Harris et al., 1996). Elle joue aussi le rôle de transactivateur en initiant la réplication du génome viral via sa fixation sur l'origine de réplication. Ceci conduit localement au débobinage de la double-hélice d'ADN grâce à son activité hélicase et en recrutant la machinerie cellulaire de réplication de l'ADN : ADN polymérase,  $\alpha$ -primase, topoisomérase I et la protéine de réplication A (Cuesta et al., 2010). Après que la réplication du génome viral a eu lieu, la région tardive est exprimée, produisant ainsi les trois protéines de capsidite qui s'auto-assemblent pour former la capsidite renfermant le génome viral, associé aux histones cellulaires, et formant ainsi les nouveaux virions qui seront libérés par nécrose de la cellule infectée (Drachenberg et al., 2003; Seemayer et al., 2008).



**Figure 5 : Schéma récapitulatif du cycle d'infection du BKPyV.** Au regard des informations précédentes, le cycle d'infection du BKPyV est représenté de l'interaction avec son récepteur (représenté par GT1b et GD1b ici) jusqu'à la sortie par nécrose de la cellule infectée.

### III.PVAN et pathologies associées au BKPyV

Comme évoqué précédemment, la PVAN chez les patients transplantés rénaux est la principale pathologie dont le BKPyV est responsable. La réactivation du virus dans les épithélia rénaux-urinaires est observée, sous forme de génome dans les urines, chez 30 à 50% des patients greffés (Brennan et al., 2005; Bressollette-Bodin et al., 2005), 5 à 10% de ces patients développent une PVAN et 50% évoluent vers une perte totale de fonction du greffon (Drachenberg et al., 2004). Le BKPyV est aussi responsable de PVAHC chez les patients transplantés de cellules souches hématopoïétiques et il a été associé, en une moindre mesure, à des cancers. Ce dernier point ne fait pas consensus aujourd'hui, le seul polyomavirus ayant été directement associé au développement de cancer chez l'Homme étant le MCPyV.

La réactivation du virus est tout d'abord marquée par une virurie, c'est-à-dire que le virus se retrouve et est évacué de l'organisme dans les urines des patients (Nickeleit et al., 1999), représentée par la détection d'environ  $10^5$  à  $10^7$  copies de génome/mL (Hirsch et al., 2002). L'étude des régions génomiques de VP1, du LTA<sub>g</sub> et du NCCR entre le donneur et le receveur du greffon a montré que c'est le virus du donneur qui se réactive chez le receveur (Schmitt et al., 2014). La première manière, et la technique historique, de diagnostiquer la réactivation du BKPyV est donc de doser le virus par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) quantitative (Butel et al., 1999). Dans les urines le virus dosé est majoritairement issu de cellules épithéliales réno-urinaires infectées, remplies de virus, qui se sont détachées de la lame basale et qui sont donc éliminées dans les urines, elles sont appelées « *Decoy cells* ». Cela permet aussi des analyses cytologiques pour détecter ces cellules et diagnostiquer et suivre les patients (Ranzi et al., 2012). Une étape déterminante dans la physiopathologie de l'infection est le passage du virus dans le sang, on parle de virémie : à un moment donné de l'infection, le virus est retrouvé dans le sang et l'établissement et le maintien de cette virémie est signe d'une forte réplication du virus dans le système réno-urinaire et donc de l'endommagement des organes qui le compose. La virémie représente ainsi un deuxième élément diagnostic, toujours en dosant l'ADN viral par PCR quantitative, qui implique un examen plus approfondi par biopsie dans le rein pour détecter la présence du virus en réplication active (Hirsch and Randhawa, 2013). Aujourd'hui il n'existe pas d'explication définitive à l'établissement de cette virémie, la seule mention à ma connaissance d'une hypothèse clairement formulée apparaissant dans une étude du Pr Hirsch. Il y est rapidement évoqué que le détachement des cellules infectées dans les tubules réno-urinaires pourrait induire une fragilisation et une lésion de la lame basale, donnant l'accès aux fluides riches en virus à l'interstitium rénal où le virus se retrouverait proche des capillaires sanguins irriguant le rein et permettant son passage dans le sang (Nickeleit et al., 2000). Il

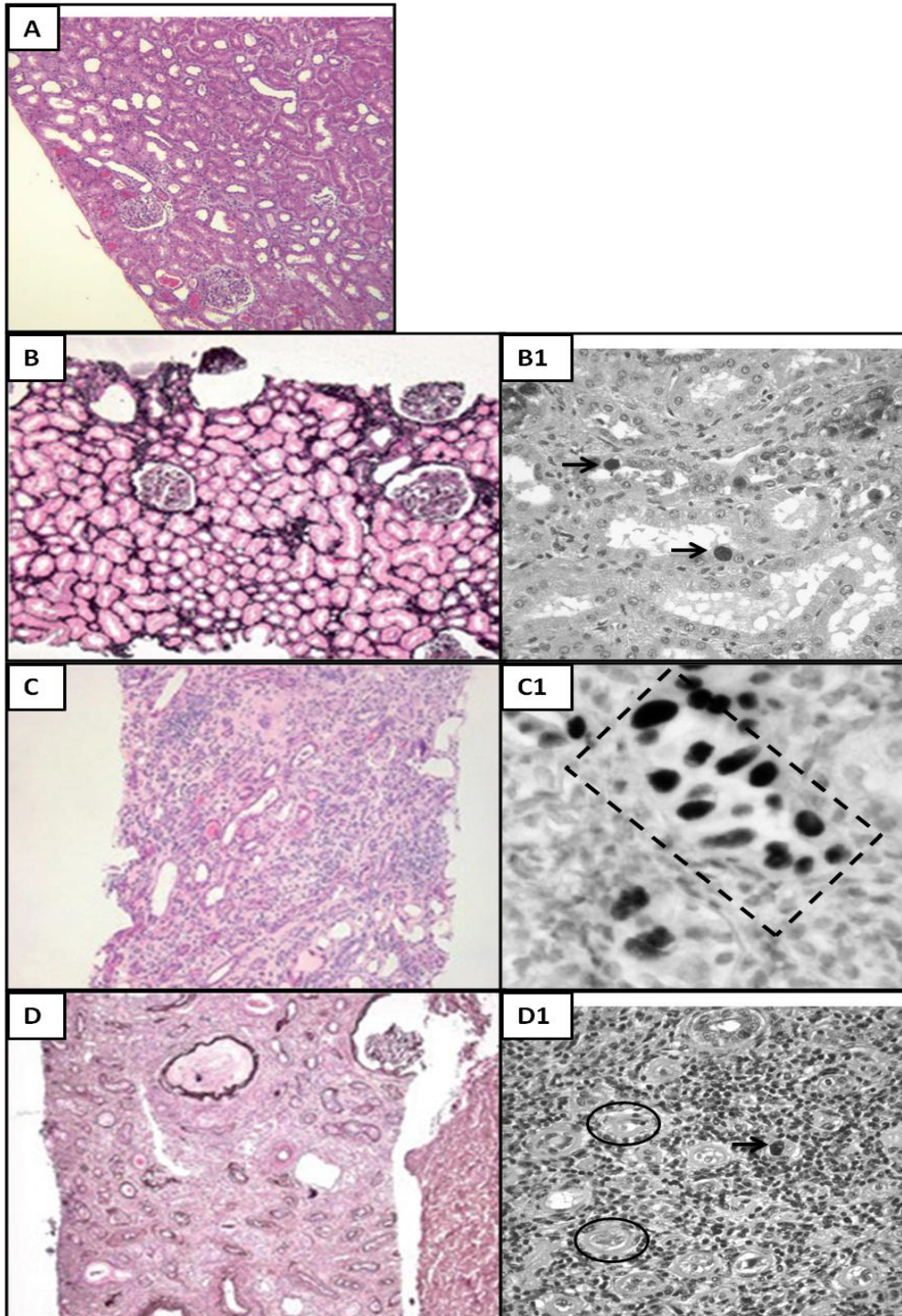
est difficile de séparer clairement des étapes chronologiques dans la physiopathologie de cette maladie car souvent, quand les biopsies sont faites suite à la détection de la virémie, les organes sont déjà atteints. On ne peut donc pas conclure sur une priorité de la virémie par rapport à l'atteinte des organes, et inversement.

## 1. La néphropathie associée au polyomavirus

La PVAN représente la première cause de perte de greffon d'origine infectieuse. Son diagnostic nécessite un examen histo-pathologique qui, en fonction de l'atteinte des tissus rénaux (pourcentage du tissu positif pour un marquage du LTA<sub>g</sub>) et de caractéristiques immunologiques (tel que la présence d'un infiltrat lymphocytaire inflammatoire), va permettre de classer la PVAN selon un système de grade proposé par le Dr Drachenberg et imagé en figure 6 (Drachenberg et al., 2003; Kuypers, 2012) :

- **PVAN-A** : caractérisée par un effet cytopathogène modéré avec un(e) faible infiltrat interstitiel, fibrose et atrophie tubulaire estimé à moins de 25% de la surface de la biopsie.
- **PVAN-B** : l'effet cytopathogène est plus étendu, de 11 à 50% de la surface de la biopsie, avec un infiltrat inflammatoire léger (11-25%), moyen (26-50%) ou sévère (plus de 50%) et une atrophie tubulaire minimum, légère (11-25%) ou modérée (26-50%) qui vont définir des sous-groupes de la PVAN B, les sous-groupes B1, B2 et B3 respectivement.
- **PVAN-C** : une sévère fibrose interstitielle et atrophie tubulaire, qui recouvre plus de 50% de la surface de la biopsie, sont indicatives de dommages irréversibles faits au rein, associées à un infiltrat inflammatoire et un effet cytopathogène résiduel.





**Figure 6 : Coupes histologiques montrant les différents grades de PVAN.** Les champs larges des colorations en hématoxyline-éosine (**A, C**) et à la méthénamine d'argent (**B, D**) permettent d'apprécier la morphologie générale du tissu où **A, B, C** et **D** représentent respectivement un tissu sain, la PVAN-A, PVAN-B et PVAN-C. Sur les champs rapprochés des grades respectifs, on voit clairement les noyaux positifs pour le marquage LTAg ( **→**), les tubules atrophiés ( **○**) et l'infiltrat inflammatoire interstitiel (**C1** et **D1**). La zone pointillée (**C1**) délimite un tubule atrophié où l'on retrouve des noyaux LTAg positifs (modifiés de Drachenberg et al., 2003 ; Gosert et al., 2008 et Kuypers, 2012).

## **2. La cystite hémorragique**

La PVAHC a une forte morbidité chez les patients. Les méthodes utilisées pour le diagnostic sont les méthodes classiques de PCR et de biopsies, aucune méthode spécifique à cette pathologie conduisant à un diagnostic définitif n'existant aujourd'hui. Ici encore, l'établissement de la maladie n'est pas totalement élucidé : la prise de médicaments immunosuppresseurs en amont de la greffe, tel que le cyclophosphamide, comme protocole de conditionnement pré-greffe fragilise la muqueuse de la vessie. S'ensuit une phase aplasique durant laquelle le BKPyV se réplique activement et de manière incontrôlée, ce qui dénude cette muqueuse endommagée. Enfin l'inflammation se met en place quand la greffe de cellules souches hématopoïétiques est effective (Hirsch and Steiger, 2003).

## **3. BKPyV et cancer**

Le lien de causalité entre le BKPyV et certains cancers n'a pas été directement établi. Plusieurs rapports de cas cliniques mentionnent la détection du LTA<sub>g</sub> dans des tumeurs primaires et secondaires de cancers de la vessie (Dalianis and Hirsch, 2011) et en 2012 il est classé comme agent « potentiellement cancérigène pour l'Homme » par l'Organisation Mondiale de la Santé (Bouvard et al., 2012). Même si l'infection par le BKPyV n'est pas forcément à l'origine du développement de cancer chez les individus immunosupprimés, sa détection dans ces tumeurs des voies réno-urinaires reste inquiétante et mérite une vigilance particulière, ces cancers pouvant représenter une problématique clinique à ne pas négliger dans les années à venir (Papadimitriou et al., 2016).

# **IV. Réponses immunitaires anti-BKPyV**

## **1. La réponse immunitaire innée**

Il existe peu d'études s'intéressant à l'interaction directe du BKPyV avec les cellules de l'immunité innée et leur rôle dans le contrôle de l'infection, la grande majorité des études faisant état de données cliniques obtenues sur des cohortes de patients transplantés rénaux ayant réactivé leur BKPyV ou souffrant de PVAN.

### **1.1 Les cellules dendritiques**

Une implication des cellules dendritiques (DC) a été suggérée, plusieurs études démontrant un niveau de DC sanguin qui diminue grandement après transplantation rénale ainsi qu'une corrélation entre le niveau de DC pré-transplantation et un risque accru de développer une PVAN

(Womer et al., 2010; Womer et al., 2005). Il a été montré dans un modèle murin de PVAN, qu'un nombre élevé de DC était corrélé avec une augmentation du nombre de lymphocytes T exprimant le cluster de différenciation (CD) 8 spécifique du virus. Cela suggère que les DC dans un organisme infecté par un polyomavirus jouent un rôle déterminant dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative contre ce virus (Drake III et al., 2001). Cependant une étude *in vitro* sur l'activation des DC humaines en contact avec des VLP, uniquement composées de la protéine de capsid VP1, de différents polyomavirus a montrée une faible réponse et activation des DC en présence des VLP de BKPyV (Gedvilaite et al., 2006). Ainsi, le rôle des DC dans la réponse immunitaire anti-BKPyV chez les patients transplantés rénaux, autant dans la capture du virus que dans la présentation des antigènes pour initier la réponse immunitaire adaptative, n'est pas clairement mis en évidence aujourd'hui et mérite des études plus approfondies.

## **1.2 Les cellules « *Natural Killer* »**

Il semble que les cellules NK soient aussi des acteurs de la défense contre le BKPyV. Il a été montré que les patients souffrant de PVAN ont moins de récepteur de cellules NK, les « *Killer cell Ig-like receptor* » (KIR), activateurs (tel que KIR3DS1) sur leurs cellules NK que les patients contrôles transplantés rénaux sans signe de PVAN (Trydzenskaya et al., 2013). Le BKPyV produit des micro ARN supprimant l'expression d'ULBP3, un ligand du récepteur activateur NKG2D, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'action cytotoxique des cellules NK (Bauman et al., 2011).

## **2. La réponse immunitaire adaptative**

### **2.1 La réponse humorale**

La réponse humorale anti-BKPyV est très efficace. En effet, l'infection par le BKPyV pendant l'enfance induit une production d'anticorps neutralisant et une étude menée sur des individus sains a montré une présence d'anticorps spécifiques du BKPyV chez 87% des jeunes individus (20-29 ans) et 71% des individus plus âgés (50-59 ans)(Egli et al., 2009). Chez les patients transplantés rénaux, la présence d'anticorps neutralisants dirigés contre le virus réactivé diminue le risque d'évolution vers la virémie (Solis et al., 2017). Malgré cette production d'anticorps neutralisants spécifiques, jouant un rôle dans la neutralisation du virus circulant, ils ne sont pas suffisants pour contrôler la réactivation et les maladies associées au BKPyV chez les patients immunodéprimés (Comoli et al., 2013).

## 2.2 La réponse T

Les lymphocytes T, avec leur capacité de cellules mémoires, vont être les plus à même de contrôler et réagir efficacement à la réactivation d'un virus latent dans l'organisme. Chez les patients transplantés rénaux, la reconstitution du compartiment T spécifique du BKPyV est associée à un meilleur contrôle de la virurie et de la virémie (Schachtner et al., 2011). Ce contrôle est assuré à la fois par les LT CD4 et CD8 spécifiques du virus (Renner et al., 2013), et principalement spécifiques des protéines VP1 et LTA<sub>g</sub> (Blyth et al., 2011), bien qu'une réponse T existe à la fois chez les individus sains et les patients transplantés rénaux contre les cinq protéines virales (Binggeli et al., 2007; Hammer et al., 2006; Mueller et al., 2011; Zhou et al., 2007). Cependant, il a été proposé que la réponse T était majoritairement CD4 (Trydzenskaya et al., 2011), qui ont un effet de contrôle direct sur la réplication virale par la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), le facteur de nécrose des tumeurs (TNF) et de la molécule cytolytique Granzyme B. De plus, il a été montré par des expériences de tri et de re-stimulation *in vitro* de pool de LT que les LT CD4 spécifiques pouvaient, à eux seuls, contrôler la réactivation virale et avoir une activité cytolytique sur les cellules infectées (Weist et al., 2014). De manière intéressante, plusieurs études menées sur l'identification des épitopes immunodominants induisant une réponse T CD8 anti-BKPyV ont abouti à l'identification de trente-neuf épitopes dérivés des gènes précoces du BKPyV, dont certains partagent une forte homologie avec le JCPyV (responsable de leucoencéphalopathie multifocale progressive), relevant l'hypothèse que la RI dirigée contre l'un des deux virus peut aussi être dirigée contre l'autre (Cioni et al., 2016; Sahoo et al., 2015). L'analyse par séquençage nouvelle-génération de la répartition des LT dans l'infiltrat inflammatoire rénal de biopsies, comparé aux cellules sanguines, chez des patients souffrant de PVAN a montré la présence de clones T spécifiques du BKPyV. Cependant, sept à huit fois plus de clones T alloréactifs sont détectés dans ces biopsies, suggérant que les dommages rénaux subis lors de la PVAN sont majoritairement dus à l'influx de LT dépendant de l'immunité alloréactive (Zeng et al., 2016).

## V. Les solutions thérapeutiques

Du fait que le BKPyV utilise la machinerie cellulaire pour se répliquer et produire ses protéines, aucune thérapie antivirale spécifique des protéines du virus n'existe aujourd'hui, comme c'est le cas avec les traitements anti-herpétiques majeurs. La principale, et la plus efficace, intervention thérapeutique est donc de moduler le niveau d'immunosuppression du patient en changeant les doses de son traitement ou en changeant d'immunosuppresseur, couplé avec un suivi

régulier des charges virales urinaire et sanguine, pour récupérer un contrôle immunitaire sur le virus (Hirsch et al., 2014; Weiss et al., 2008). Cette stratégie induit cependant un risque accru de rejet du greffon.

## **1. Les immunoglobulines intraveineuses**

La prise d'immunoglobulines intraveineuses (IVIg) a été testée comme thérapie contre la PVAN. Il a ainsi été mis en évidence la présence d'immunoglobulines neutralisant le BKPyV dans ces préparations et l'utilisation de ces IVIg a été recensée dans plusieurs cas cliniques (Randhawa et al., 2015; Vu et al., 2015). C'est un cocktail d'immunoglobulines (Ig) humaines dirigé potentiellement contre de nombreux pathogènes différents car la composition en Ig n'est pas entièrement connue. Leur efficacité a notamment déjà été montrée contre le hCMV ou le virus Epstein-Barr (EBV) (Radha et al., 2004). L'utilisation d'IVIg participerait donc de manière passive à l'immunité anti-BKPyV et, dû à leur effet immunomodulateur, pourrait prévenir le risque de rejet lié à la diminution de l'immunosuppression (Gelfand, 2012).

## **2. Le cidofovir**

C'est un analogue nucléotidique de la déoxycytidine monophosphate indiqué dans le traitement des rétinites à hCMV chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Dans les années 2000, il a été utilisé avec succès dans le traitement de la PVAHC (Held et al., 2000) d'abord, puis de la PVAN (Bjorang et al., 2002). L'inconvénient de cette drogue est qu'elle est néphrotoxique, il est donc difficile de conclure que l'effet observé sur la résolution d'infections à BKPyV est dû à une action antivirale directe plus qu'à un effet cytotoxique et cytostatique décrit sur les cellules cibles du BKPyV (Izzedine et al., 2005). Une prodrogue composée de cidofovir couplé à un lipide, le brincidofovir (CMX001), a fait l'objet d'une étude clinique de phase III dans le cadre de l'infection à Adenovirus. Des études *in vitro* ont montré moins de néphrotoxicité et un effet inhibiteur de la réplication du BKPyV plus important (Rinaldo et al., 2010).

## **3. Le leflunomide**

C'est un inhibiteur de la synthèse des pyrimidines, soit les bases azotées thymidine, cytosine et uracile. Cela affecte particulièrement les lymphocytes T et B, ce qui en fait un agent immunosuppresseur. Il a aussi été utilisé comme agent antiviral dans les infections à hCMV et le virus *Herpes Simplex* (HSV)-1. Il est préféré au cidofovir car il n'est pas néphrotoxique. Il est souvent utilisé

pour changer d'immunosuppresseur lors du diagnostic d'une PVAN et est toujours préconisé aujourd'hui car ayant une incidence positive sur la résolution des pathologies pour un certain nombre de patients (Josephson et al., 2006; Jung et al., 2012; Williams et al., 2005). Son effet inhibiteur sur la réplication virale a été étudié *in vitro* et, comme le cidofovir, est fortement associé à l'effet cytostatique de la drogue sur les cellules cibles plus qu'à une action antivirale directe (Bernhoff et al., 2010).

#### **4. Les fluoroquinolones**

Ce sont des antibiotiques à spectre large qui ciblent les topoisomérases bactériennes. Une étude rétrospective faite sur un essai clinique consistant à administrer des fluoroquinolones comme traitement prophylactique au moment de la transplantation rénale a montré que les patients ayant reçu les antibiotiques développaient moins de virémie, suggérant un rôle de ces antibiotiques dans cet effet (Wojciechowski et al., 2012). Cependant, les résultats d'une méta-analyse faite sur les données recueillies par de nombreux groupes et huit essais cliniques montrent que leur utilisation en post-greffe n'a montrée aucune efficacité (Song et al., 2016).

#### **5. L'injection de lymphocytes T spécifiques**

Le statut d'immunosuppression des patients transplantés rénaux est déterminant dans la réactivation du virus, impactant fortement la mise en place des réponses immunitaires spécifiques et notamment la réponse T mémoire, importante pour contrôler l'infection. Ainsi, le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques, stimulés et amplifiés *in vitro*, pour contrôler et *a fortiori* traiter les complications liées au BKPyV a été testé (Blyth et al., 2011; Gerdemann et al., 2012). Une étude pilote de 2014 destinée à évaluer l'efficacité de l'injection de clones T spécifiques de plusieurs virus, dont le BKPyV, à des patients transplantés de moelle osseuse démontre une réaction positive chez 94% des patients, avec une quantité de lymphocyte T qui reste maintenue et la disparition des charges virales à long terme (Papadopoulou et al., 2014). Cette étude a conduit à la réalisation d'un essai clinique de phase II avec des résultats très prometteurs, pour tous les virus concernés (dont le hCMV, l'EBV et le HSV-6) (Tzannou et al., 2017). L'extension de cette stratégie à la transplantation d'organes solides doit être étudiée.

# Les cellules dendritiques humaines

## I. Caractéristiques générales

Les DC ont été décrites pour la première fois par Paul Langerhans en 1868 comme des cellules étoilées dans l'épiderme avec de longs prolongements cytoplasmiques, qu'il nomme neurones intradermiques en raison de leur morphologie caractéristique. Cent ans plus tard, en 1970, Ralph Steinman et Zanvil Cohn identifient une nouvelle population cellulaire dans une préparation cellulaire issue d'organes lymphoïdes secondaires (OLS) de la souris. Leur morphologie et leur comportement *in vitro* les mènent à la conclusion qu'elles représentent bien un type cellulaire unique, qu'ils nomment cellules dendritiques (Steinman and Cohn, 1973, 1974).

Ce sont des cellules spécialisées dans la capture et la présentation d'antigènes, à la fois du soi et du non-soi, aux LT afin d'initier la RI adaptative ou de participer à la tolérance (centrale, périphérique et de greffons). Cette présentation de peptides antigéniques se fait sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I pour les LT CD8 et de classe II pour les LT CD4. Les molécules du CMH chez l'Homme sont appelées « Antigènes leucocytaires humains », ou HLA, et il en existe trois différentes par type de CMH : les HLA-A, B et C pour le CMH-I et les HLA-DP, DQ et DR pour le CMH-II. Les DC font donc partie des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Leur grande capacité à migrer des tissus et organes périphériques vers les OL, via le sang et la lymphe, à la recherche d'antigènes à présenter aux LT leur vaut aussi le surnom de « sentinelles de l'immunité ». Recrutées rapidement au niveau des sites d'infections notamment, elles font partie des premières cellules qui rencontrent les pathogènes afin de rapidement les capturer, les dégrader et présenter leurs antigènes pour une RI efficace. Ces cellules font physiquement le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative en permettant, via l'activation des LT, la mise en place de la réponse mémoire, indispensable à une protection efficace du corps humain. Bien que toutes les DC aient ce rôle de CPA, elles représentent en réalité une population hétérogène de cellules d'origine, de localisation et de spécialisation fonctionnelle très variées (Boltjes and van Wijk, 2014).



## II. Les sous-populations de cellules dendritiques

Comme toutes les cellules immunitaires humaines, les DC sont issues de cellules précurseurs générées dans la moelle osseuse qui passent ensuite par le sang et vont entamer leur différenciation. Comme mentionné précédemment, le compartiment des DC est très hétérogène et un même type de DC peut être présent dans différents organes où leur fonction ne sera pas exactement similaire (Dzionek et al., 2000; Lindstedt et al., 2005; McIlroy et al., 2001; Segura et al., 2012). Cependant, basé principalement sur différents marqueurs phénotypiques, il est possible de faire ressortir plusieurs populations différentes de DC.

Une première distinction est faite en fonction de leur localisation : le passage dans le sang des précurseurs de DC va leur permettre d'aller se localiser dans des tissus spécifiques où elles termineront leur différenciation *in situ*. Les DC peuvent être retrouvées dans les OL, où elles vont avoir pour rôle de capter des antigènes qui arrivent directement du sang et de la lymphe pour les présenter aux LT présent dans ces tissus ; on parle de DC résidentes. Elles vont être distinguées des DC qui vont aller prendre place dans tous les autres types d'organes et de tissus qui ne sont pas lymphoïdes, on parle de DC migratoires. Ces DC vont avoir pour rôle de récupérer des antigènes dérivés de leur tissu respectif qu'elles vont ensuite aller présenter aux LT dans les OL les plus proches (Boltjes and van Wijk, 2014). Toutes les DC expriment la molécule du CMH HLA-DR et n'expriment pas de marqueurs de lignage (Lin) telles que le CD3, le CD19 ou CD20 ou encore le CD56. Ainsi dans le compartiment de cellules HLA-DR<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>, à l'état basal (non inflammatoire), on distingue trois populations principales de DC (Collin et al., 2013; Harrison et al., 2011; Ziegler-Heitbrock et al., 2010):

- Les DC myéloïdes (mDC) exprimant les antigènes myéloïdes CD11b, CD11c, CD13 et CD33. Trois populations ressortent dans ces mDC : les mDC CD1c<sup>+</sup>/antigène des cellules dendritiques sanguines (BDCA)-1<sup>+</sup>, les mDC CD141<sup>+</sup>/BDCA-3<sup>+</sup> et les mDC CD14<sup>+</sup>.
- Les DC plasmacytoïdes (pDC) caractérisées par l'expression des marqueurs CD123, CD303 et CD304. Equipées de détecteurs des acides nucléiques viraux, elles ont comme action principale la sécrétion d'IFN de type I en réponse aux infections virales (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999).
- Les cellules de Langerhans (LC) exprimant la langérine (CD207) et le CD1a. La langérine est une protéine impliquée dans la formation d'une structure spécialisée dans la présentation antigénique, restreinte à ces cellules, les granules de Birbeck. Ces cellules sont résidentes des



muqueuses et de la peau, au niveau de l'épiderme, et s'auto-renouvellent à partir de progéniteurs résidents eux aussi (Merad et al., 2008; Merad et al., 2002).

En conditions inflammatoires, le contenu cellulaire des tissus et OL est grandement modifié par le recrutement de nombreuses cellules immunitaires. Dans ces infiltrats et fluides inflammatoires, une population de DC, les DC inflammatoires (infDC), se démarque des autres DC (Segura et al., 2013). Elles expriment les marqueurs de surface CD1c et CD1a et ont été montrées comme stimulant les réponses  $T_H17$  *in vitro*. On retrouve enrichie dans cette population la signature génétique des MDDC : ces MDDC sont un modèle *in vitro* de DC bien décrit, obtenue à partir de monocytes différenciés en culture avec un cocktail de cytokine interleukine (IL)-4 et GM-CSF (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Ce modèle est au cœur de mon travail de thèse car je l'ai beaucoup utilisé comme un moyen rapide et reproductible d'obtenir un grand nombre de DC. L'origine monocytaire des infDC *in vivo* chez l'Homme reste à déterminer, mais ces données apportent un indice supplémentaire dans ce sens.

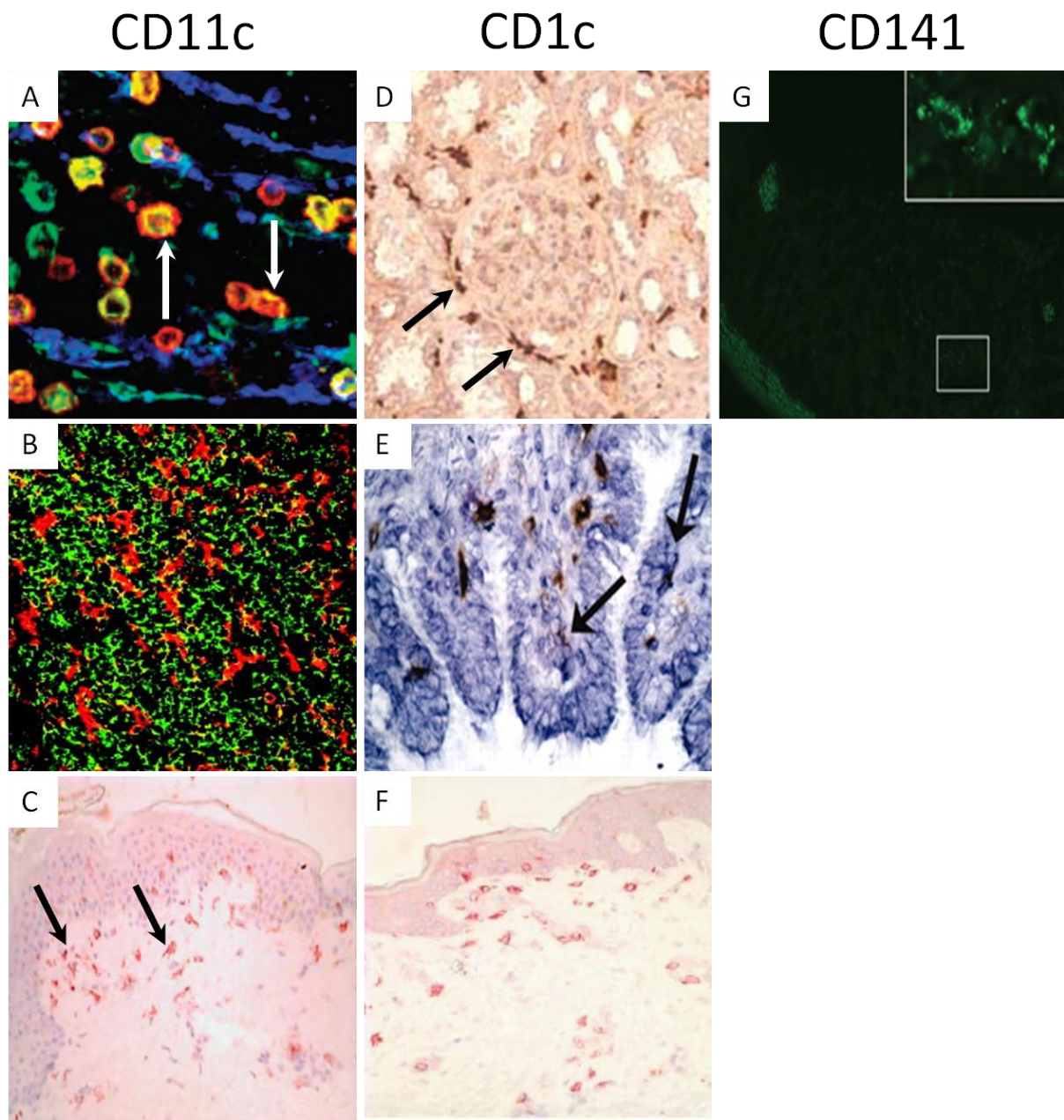
Les pDC et LC ne faisant pas partie du cadre de mon étude, elles ne seront pas plus détaillées dans la suite de mon manuscrit.

### III. Les cellules dendritiques myéloïdes

#### 1. Localisation

Les mDC sont retrouvées dans de nombreux tissus et organes, à la fois en tant que DC résidentes et migratoires. En tant que DC migratoires, les mDC CD1c<sup>+</sup> et CD141<sup>+</sup> (pas les CD14<sup>+</sup>) sont présentes dans le sang, en différentes proportions : la population CD141<sup>+</sup> représente 5-10% des mDC du sang, la population CD1c<sup>+</sup> est la population de mDC majoritaire, représentant environ 45% des mDC et 1% des cellules mononuclées du sang, le reste des DC sanguines sont des pDC (MacDonald et al., 2002). Les mDC ont été détectées dans le derme grâce aux marqueurs de surfaces HLA-DR et CD1a (Lenz et al., 1993; Nestle et al., 1993), mais aussi dans différents organes tel que le foie, les poumons, les intestins ou le rein (Haniffa et al., 2012; Schlitzer et al., 2013; Woltman et al., 2007). En tant que DC résidentes, elles sont retrouvées dans plusieurs OL comme les ganglions lymphatiques, la rate et les amygdales (Lindstedt et al., 2005; Velásquez-Lopera et al., 2008). Ici encore, les DC CD14<sup>+</sup> font exceptions : ces cellules ont été décrites originellement comme des « DC interstitielles/dermales », migrants à partir de la peau (Lenz et al., 1993; Nestle et al., 1993). Elles peuvent dérivées des monocytes, d'où l'expression du CD14, et ont en commun avec les DC le marqueur « *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* » (DC-

SIGN ; CD209) et avec les macrophages le marqueur FXIIIA et le CD163 (Haniffa et al., 2009; Ochoa et al., 2008). Aussi, ces cellules n'ont pas été décrites dans les OLS et leur capacité à y migrer semble réduite car n'exprimant que de faibles niveaux de récepteur aux chimiokines C-C (CCR) 7 (Angel et al., 2006). La plupart de ces observations dérivent d'analyses par cytométrie en flux, certaines de l'analyse de marquages immunohistologiques et sont reportées dans la figure 7 (Hornell et al., 2006; Masten et al., 2006; Ochoa et al., 2008; Wang et al., 2014; Woltman et al., 2007).



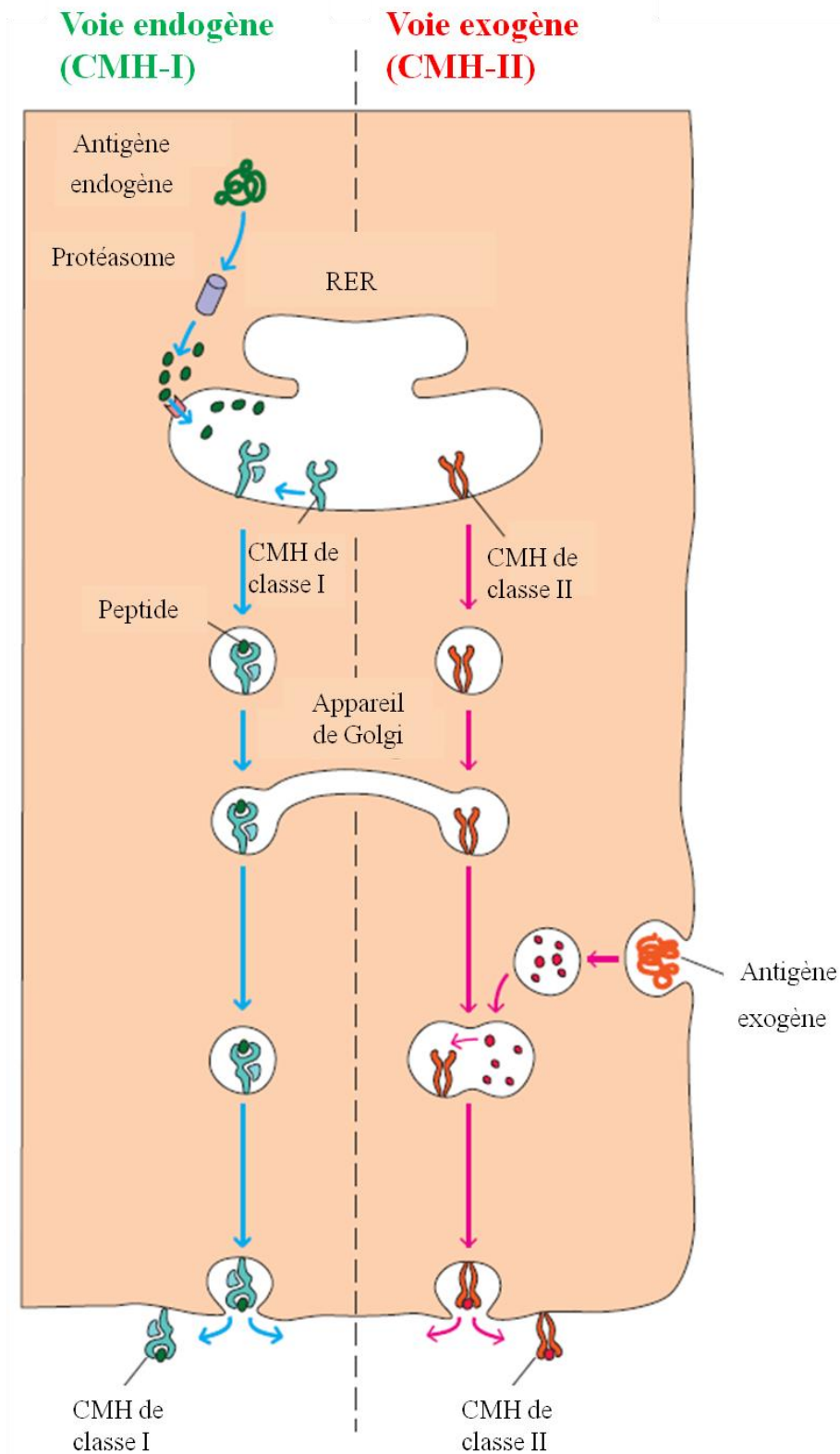
**Figure 7: Marquages immunohistologiques des mDC dans différents organes humains.** Les antigènes de surface du lignage myéloïde ont été détectés sur des coupes de tissus humains sains par immunohistochemie ou immunohistofluorescence. Marquages CD11c (rouge) et HLA-DR (vert) sur une coupe de derme (A), d'amygdales (CD1c rouge et HLA-DO vert ; B) et sur une coupe de peau (C). Marquage CD1c sur une coupe de rein (D), de poumon (E) et de peau (F). Marquage CD141 sur une coupe de rate (G). Les flèches indiquent un marquage représentatif (modifié de Hornell et al., 2006; Masten et al., 2006; Ochoa et al., 2008; Wang et al., 2014; Woltman et al., 2007).

## 2. Propriétés

### 2.1 La présentation antigénique

La fonction primordiale des mDC, et des CPA en générale, est de capturer, dégrader et présenter des molécules antigéniques sur leurs molécules du CMH grâce à leurs capacités protéolytique et d'endocytose (McCurley and Mellman, 2010). Ces antigènes sont présentés aux LT CD4 ou CD8 afin d'initier et polariser la RI adaptative, engageant les LT dans une voie de différenciation leur conférant des propriétés spécifiques en fonction de la situation et permettant aussi la génération de lymphocytes mémoires (Amigorena, 1999; Jongbloed et al., 2010). Il existe trois voies d'apprêtement :

- **La voie endogène** : elle concerne les protéines intracellulaires, autant du soi que celles produites par les agents infectieux infectant la DC. Ces protéines sont dégradées dans le cytosol par le protéasome et s'associent aux molécules de CMH dans le RE rugueux (RER). C'est la voie d'apprêtement sur les molécules de CMH-I, destinée à la présentation aux LT CD8 (figure 8) (Rock et al., 2004).
- **La voie exogène**: elle concerne les antigènes trouvés dans le milieu extérieur, issus de la matrice extracellulaire, d'agents pathogènes présents dans le milieu ou de débris cellulaires. Les mDC endocytent ces protéines qui vont être clivées dans les lysosomes et ces lysosomes fusionnent avec les vésicules d'exocytose issues de l'appareil de Golgi dans lesquelles se trouvent les molécules de CMH-II. L'apprêtement se fait dans ces vésicules d'exocytose, qui envoient ensuite la molécule de CMH-II chargée en surface pour la présentation aux LT CD4 (figure 8)(Yaneva et al., 2009).
- **La présentation croisée** : c'est le fait que les DC présentent aux LT CD8 des antigènes exogènes sur leurs molécules de CMH-I. Ils peuvent notamment être originaires de virus infectant d'autres cellules alentours ou de tumeurs. Cette voie de présentation implique l'endocytose de l'antigène exogène (comme dans la voie exogène) et sa sortie dans le cytosol pour être clivé par le protéasome et être ensuite apprêté sur la molécule de CMH-I dans le RE (comme dans la voie endogène). Cette voie de présentation est essentielle à l'initiation de réponses T CD8 cytotoxiques spécifiques du non-soi (Amigorena and Savina, 2010). Toutes les DC sont capables de faire de la présentation croisée, cependant, les mDC CD141<sup>+</sup> ont été décrites comme étant les plus efficaces (Jongbloed et al., 2010).



**Figure 8 : Schéma des voies de présentation des antigènes endogènes et exogènes.** Les deux voies de présentation des antigènes sont représentées avec la voie endogène qui permet l'apprêtement de peptides dégradés par le protéasome sur les molécules de CMH-I dans le RER et la voie exogène qui permet l'apprêtement de peptides dégradés dans les lysosomes sur les molécules de CMH-II (modifié du livre « Kuby Immunology, Seventh Edition », de Owen, Punt et Stranford, 2013).

## 2.2 Détection des signaux de danger

Les mDC sont équipées de nombreux récepteurs qui servent à détecter les signaux de dangers qui les entourent. Ces signaux de dangers peuvent être des composants très conservés des membranes, capsides ou enveloppes des pathogènes, ainsi que des acides nucléiques, appelés des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP). Ils peuvent aussi dériver de cellules mourantes qui libèrent leur contenu cytoplasmique et des débris cellulaires dans le milieu extérieur ; ces signaux de dangers, dits « stériles » en raison de l'absence de pathogènes impliqués, sont appelés motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP). Ces signaux sont détectés par les récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR). Il existe de nombreux PRR détectant spécifiquement certains types de signaux, ils peuvent être membranaires ou solubles, intracytoplasmiques ou extracellulaires. Les PRR représentent une grande famille de récepteurs qui vont, pour la plupart, conduire à la transduction de signaux intracellulaires, activant des voies de signalisations telle que la voie des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) conduisant à l'activation de facteurs de transcriptions comme le facteur nucléaire kappa B (NFκB), facteur de régulation de l'IFN (IRF) 3 et 7 ou la protéine activatrice (AP)-1 et à la production de protéines inflammatoires (IFN, cytokines) et antimicrobiennes (peptides antimicrobiens) ou à la phagocytose des agents infectieux (Bowie and Unterholzner, 2008; Froy, 2005; Fukata et al., 2009). On compte dans cette famille :

- **Les récepteurs ressemblant à Toll (TLR) :** c'est la première famille de PRR à avoir été découverte. Il en existe treize chez l'Homme et détectent de nombreux PAMP différents, autant des génomes viraux que des composants de la paroi bactérienne (Kawai and Akira, 2010). Par exemple le TLR4 détecte le lipopolysaccharide, un composant des parois bactériennes, les TLR7 et 8 détectent les ARN simple brin.
- **Les récepteurs lectines de type C (CLR) :** il en existe quinze chez l'Homme et ce sont des récepteurs spécifiques de motifs sucrés (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Par exemple le CLR DC-SIGN, exprimé par certaines DC, est impliqué dans la reconnaissance de différents virus enveloppés comme le VIH-1 ou le hCMV.
- **Les récepteurs ressemblant au gène I inductible par l'acide rétinoïque (RLR) :** trois sont connus chez l'Homme (le gène I inductible par l'acide rétinoïque (RIG-I), la protéine 5 associée à la différenciation du mélanome (MDA5) et la protéine laboratoire de génétique et physiologie 2 (LGP2)). Ce sont des PRR solubles, présents dans le cytoplasme de nombreuses cellules, qui sont cruciaux dans la détection des

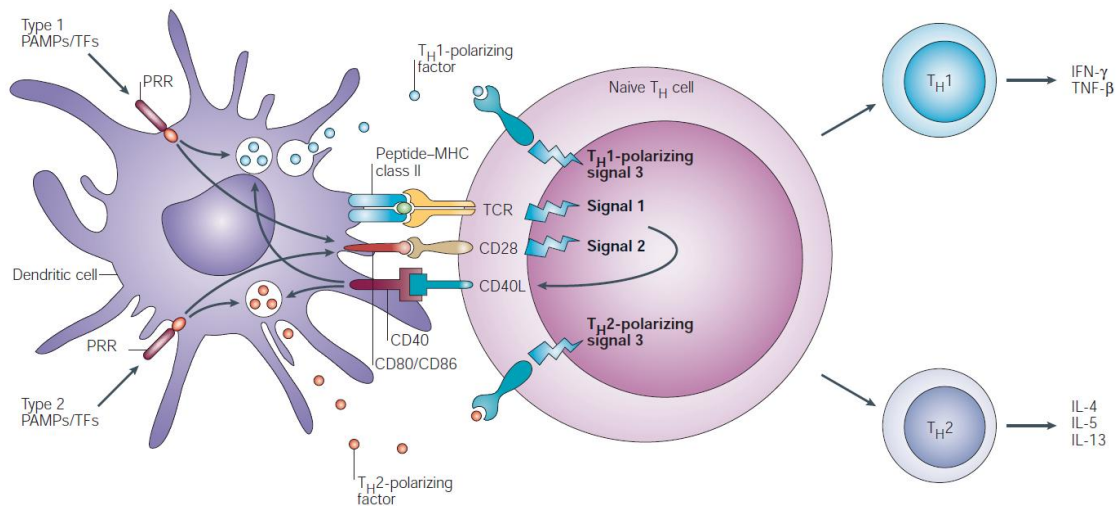
ARN viraux double brin comme ceux du virus Influenza ou le virus Ebola (Loo and Gale, 2011).

- **Les récepteurs ressemblant à Nod (NLR)** : ce sont des PRR cytosoliques activés par les PAMP et DAMP intracellulaires. Certains de ces NLR, au lieu d'avoir une action sur le programme transcriptionnel de la cellule, vont activer des protéases responsables de la conversion de procytokines en cytokines actives qui, une fois sécrétée, vont jouer un rôle dans la mise en place de l'inflammation (Davis et al., 2011).

### 2.3 Maturation

Suite à la détection des signaux de dangers ou à la phagocytose des agents infectieux, les mDC vont passer d'un état immature - caractérisé par des capacités de phago/endocytose, de dégradation et d'apprêtement des molécules antigéniques - à un état mature, spécialisé dans la présentation des antigènes apprêtés et la stimulation des LT. Cet état mature induit donc un changement du programme transcriptionnel et de la morphologie des mDC (Dalod et al., 2014). Elles vont activer la production des molécules du CMH pour l'apprêtement, des molécules de co-stimulation B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) et le CD40, qui servent à amorcer la différenciation des LT en trouvant à leur surface leurs ligands respectifs : les molécules du CMH interagissent avec le récepteur des cellules T (TCR ; appelé signal 1), le couple CD80/CD86 se lie au CD28, le CD40 se lie au ligand du CD40 (CD40L), induisant un signal activateur et de survie chez les LT (appelé signal 2). Cette rencontre avec les LT est appelée le « *priming* » des LT. Pour aller rencontrer les LT dans les OLS, les mDC expriment fortement le CCR7, le récepteur aux chimiokines ligand à motif C-C (CCL)-19 et 21 produites dans les ganglions lymphatiques, et qui permet la migration des mDC du lieu de rencontre avec l'antigène aux OLS. Les mDC permettent d'induire la différenciation des LT CD4 et CD8 en un type de LT appelé « *helper* » ( $T_H$ ) et en lymphocytes cytotoxiques (CTL), respectivement. Il existe plusieurs types de  $T_H$ , dont les mieux décrits sont les  $T_H1$  et les  $T_H2$ . Ces lymphocytes ont comme action d'influencer l'activité de différents types cellulaires tel que les LB, les macrophages et d'autres LT, par la sécrétion de cytokines. Les  $T_H1$  ont une activité pro-inflammatoire alors que les  $T_H2$  ont une activité anti-inflammatoire. Un autre type de  $T_H$ , les  $T_H17$ , a été décrit. Ces cellules ont des actions pro-inflammatoires et protègent contre les infections fongiques et bactériennes (Korn et al., 2009). Les CTL vont quitter les OLS et se rendre aux sites d'infections pour y détruire les cellules infectées. Le « *priming* » des LT est un mécanisme complexe qui met en jeu à la fois la DC présentant l'antigène et le LT lui-même quand stimulé par la DC : la maturation de la DC et le contact entre le LT et la DC

induit chez ces cellules la production et la sécrétion de nombreuses cytokines indispensables à un bon « *priming* » car dispensant le 3<sup>ème</sup> signal de différenciation aux LT (Jongbloed et al., 2010; Kaiko et al., 2008; Kapsenberg, 2003; Manh et al., 2013). La figure 9 résume ce phénomène de « *priming* » des LT en prenant l'exemple d'un LT CD4 stimulé par les molécules de CMH-II.



**Figure 9 : Schéma du « *priming* » et de la polarisation d'un LT CD4 en TH1 ou TH2.** Les mDC activées par la détection de PAMP ou de facteurs inflammatoires dans les tissus (TF) mûrissent et produisent les molécules de CMH-II, dispensant le signal 1 en interagissant avec le TCR, les molécules de co-stimulation CD80/86 et CD40, dispensant le signal 2 en interagissant avec leurs ligands respectifs à la surface du LT, et la production de cytokines polarisantes, dispensant le signal 3 en se liant à leurs récepteurs sur le LT (Kapsenberg, 2003).

## 2.4 Sécrétion de cytokines et immunomodulation

Comme mentionné précédemment, les mDC vont sécréter un certain nombre de cytokines suite à la maturation. Les cytokines sont une famille de molécules solubles sécrétées dans le milieu extérieur qui se lient à leur récepteur, sur les cellules exprimant ces récepteurs, et qui induisent chez ces cellules des adaptations via la transduction de signaux par ces récepteurs et l'induction de programmes transcriptionnels (Raman et al., 2011). On trouve dans cette famille des cytokines appelées chimiokines : ce sont des cytokines chimiotactiques qui induisent le recrutement de populations cellulaires, au niveau des sites d'infection notamment, en fonction d'un gradient qu'elles forment (Bonicchi et al., 2009). Elles ont des actions très diverses sur un très grand nombre de types cellulaires différents : elles peuvent être endocrines, paracrines ou autocrines et agir sur la différenciation, la prolifération, le recrutement, l'expression de récepteur à des chimiokines, à



d'autres cytokine ou à elle-même (Hemont et al., 2013). Dans le cadre du « *priming* » des LT, par exemple, les mDC vont sécréter un certain nombre de cytokines polarisantes tel que l'IL-12, une cytokine pro-inflammatoire orientant vers la voie T<sub>H</sub>1 et augmentant l'activité des CTL (Gee et al., 2009), ou l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui orientera les LT vers la voie T<sub>H</sub>2 (Fickenscher et al., 2002). La liste des cytokines produites par les mDC et leurs actions est retranscrite dans le tableau II (inspiré du livre « Kuby Immunology, Seventh Edition », de Owen, Punt et Stranford, 2013).

**Tableau II. Cytokines et chimiokines produites par les mDC matures et leurs effets**

Cytokines	
IL-1 $\beta$	Pro-inflammatoire, induction de fièvre et stimulation de la production de neutrophiles
IL-6	Pro-inflammatoire, régule la fonction des LB et LT (induction de T <sub>H</sub> 1)
IL-10	Anti-inflammatoire, anti-T <sub>H</sub> 1
IL-12 et IL-18	Pro-inflammatoire, pro-T <sub>H</sub> 1, induit production d'IFN $\gamma$ par LT et augmente l'activité cytotoxique des CTL
IL-15	Induit la prolifération des cellules NK et des LT
IL-23	Pro-T <sub>H</sub> 17
IL-27	Induit l'expansion des CD4 naïfs, action synergique avec l'IL-12 pour la production d'IFN $\gamma$
IL-28 (IFN $\lambda$ 2/3) et IL-29 (IFN $\lambda$ 1)	Aide les réponses immunes antivirales, augmente l'expression des molécules du CMH-I et II, stimule la prolifération des LT régulateurs
IL-30	Est la sous-unité p28 de l'IL-27
IL-36	Induit la production des cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'expression des molécules du CMH-I et II et les molécules CD80/CD86 par les mDC, induit la production d'IFN $\gamma$ , d'IL-4 et d'IL-17 par les LT
IL-37	Anti-inflammatoire, inhibition de la réponse immunitaire innée
IFN $\alpha$ et IFN $\beta$	Induit la résistance aux infections virale, inhibe la prolifération cellulaire, augmente l'expression des molécules de CMH-I sur les cellules voisines
TNF $\alpha$	Médiateur de l'inflammation et des fonctions immunes
APRIL	Stimule la prolifération des LT et LB
BAFF	Aide la prolifération des LB stimulés, induit la différenciation et la survie des LB immatures
Chimiokines	
CXCL-8 (IL-8)	Attire les neutrophiles, promeut la phagocytose
CXCL-10	Attire les monocytes, macrophages, LT, cellules NK et les DC
CCL-3	Attire les granulocytes
CCL-4	Attire les cellules NK et les monocytes
CCL-5	Attire les LT, les eosinophiles et les basophiles

### 3. Cellules dendritiques myéloïdes et virus

Ainsi, de par leur localisation dans de nombreux tissus d'interfaces avec l'environnement et de nombreux organes, les mDC font partie des premières cellules qui vont entrer en contact avec les agents infectieux qui parviennent à outrepasser les barrières naturelles du corps humain. Au cours du temps, les agents pathogènes ont co-évolué avec leurs hôtes, s'adaptant pour survivre chez ces hôtes. Certaines de ces adaptations sont l'évasion et le détournement des défenses immunitaires, notamment l'exploitation des fonctions des cellules dendritiques. Cette partie de l'introduction s'attellera donc à décrire les interactions qui existent entre les mDC et les virus, plus particulièrement avec les papillomavirus (de proches cousins des PyV) et avec les PyV. Leur description a, pour la plupart, été faite par des expériences *in vitro* ou *ex vivo* (Pollara et al., 2005).

#### 3.1 Transmission de virus via les mDC

De nombreux types différents de virus ont été décrits comme détournant les fonctions des mDC à leur avantage, notamment l'utilisation de la lectine de surface exprimée par les mDC, DC-SIGN, pour infecter leurs cellules cibles : Le VIH-1 a été montré comme interagissant avec DC-SIGN, permettant ainsi la *trans*-infection des LT CD4, c'est-à-dire le fait d'infecter une cellule cible grâce au contact que va établir la mDC avec cette cellule (Geijtenbeek et al., 2000). De plus, la production de la protéine virale Nef dans les mDC infectées induit la surexpression de DC-SIGN (Sol-Foulon et al., 2002). Le virus Ebola se sert aussi de DC-SIGN rapidement au cours de son infection pour *trans*-infecter les LT qu'il infecte (Alvarez et al., 2002). Le hCMV a été montré comme pouvant infecter les mDC via DC-SIGN, les rendant réfractaires à la surexpression des molécules de co-stimulation et s'en servant de moyen de propagation cellule à cellule via la *trans*-infection (Halary et al., 2002; Haspot et al., 2012; Raftery et al., 2001).

#### 3.2 Papillomavirus

Les papillomavirus humains (HPV) sont de proches cousins des PyV. Initialement, les deux familles de virus étaient classées dans une seule famille, les *Papovaviridae*, avant de se rendre compte qu'ils représentaient deux familles bien distinctes. Ces virus sont présents chez l'Homme au niveau des muqueuses, notamment génitales, et sur la peau. Certains des papillomavirus sont transformants et sont les agents étiologiques du cancer du col de l'utérus. En fonction de leur tropisme et de leur pouvoir transformant, ils sont classés en trois groupes (Bouvard et al., 2009; Khan et al., 2005) :

- Muqueux et génitaux à fort potentiel carcinogène (HPV-16, 18, 31 et 45 sont responsable du cancer du col de l'utérus chez l'Homme)
- Muqueux et génitaux à faible potentiel carcinogène (HPV-6 et 11)
- Cutanés (HPV-1, 2, 3, 4 et 5, par exemple, sont responsables de lésions cutanées bénignes et de verrues)

Le lien existant entre les papillomavirus et les DC a beaucoup été étudié à des fins de développement de vaccins, notamment des vaccins préventifs contre le cancer du col de l'utérus. Plusieurs études utilisant des VLP, des protéines virales ou encore des peptides immunodominants ont montré que les papillomavirus sont internalisés par les mDC (Bousarghin, 2005) qui vont acquérir un phénotype mature, induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et des réponses T spécifiques, à la fois  $T_H1$  et cytotoxiques (Lenz et al., 2001; Murakami et al., 1999; Rudolf et al., 2001; Santin et al., 1999). Ces études montrent donc un fort potentiel activateur des HPV-16 et 18 sur les mDC, permettant la mise en place d'une RI efficace contre ces virus. Cela a conduit au développement et la commercialisation de deux vaccins pour prévenir le cancer du col de l'utérus. L'étude *in vitro* de l'action de ces vaccins à, par ailleurs, montrée une collaboration étroite entre les mDC et les cellules NK pour la mise en place de la réponse immunitaire protectrice (Langers et al., 2014; Van den Bergh et al., 2014).

### 3.3 Polyomavirus

Peu d'études ont été menées pour caractériser les interactions qui existent entre les PyV humains et les mDC humaines. Dans le but de proposer l'utilisation de VLP de PyV dans des vaccins ou comme aide à la réponse anti-tumorale, plusieurs études ont été menées sur des modèles murins utilisant les DC murines et le polyomavirus murin (MPyV). Conjointement, ces études ont montrées la capacité du MPyV à infecter les DC murines, par détection de la production des protéines virales LTA<sub>g</sub> et VP1, leur conférant une capacité accrue à stimuler les LT CD8 (Drake III et al., 2001). Le chargement de DC murines avec des VLP chimériques de MPyV présentant l'antigène spécifique de la prostate (PSA) humain fusionné aux protéines VP2/3 et leur injection dans des souris présentant des tumeurs exprimant le PSA permet de prévenir la pousse des tumeurs et l'induction de LT CD8 spécifique du PSA. Les mêmes observations ont été faites avec des immunisations par des peptides de l'ovalbumine, avec en plus l'observation d'une réponse T CD4 (Bickert et al., 2006; Eriksson et al., 2011). Dans le cadre de la vaccination, l'étude de l'injection de pDC incubées avec des VLP MPyV chimériques avec la protéine fluorescente verte améliorée (EGFP) a montré l'induction de réponses T

CD4 et CD8, associée à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les splénocytes des souris traitées et immunisées avec les VLP-EGFP ou une EGFP recombinante (rEGFP) (Frič et al., 2008). Ensemble, ces résultats montrent une efficacité des VLP MPyV chimériques à induire des réponses immunitaires pouvant servir au contrôle des tumeurs ou à l'amélioration des stratégies de vaccinations. Concernant les études menées sur l'Homme ou les primates non-humains, il a été montré que des MDDC de macaque rhesus étaient capable de maturer en contact avec du virus simien 40 (SV40) inactivé chimiquement alors qu'elles semblent non réactive au SV40 infectieux. Les auteurs avancent l'hypothèse d'une capacité du SV40 à manipuler la fonction de présentation antigénique, induisant ainsi une tolérance immune au virus (Changyong et al., 2010). L'étude de l'interaction de VLP MPyV-EGFP avec des DC humaines montre que les DC peuvent internaliser ces VLP par des endosomes exprimant l'antigène 1 des endosomes précoces (EEA-1), ces VLP sont acheminées au noyau et se retrouve proche de la surface 24h plus tard. Cette interaction n'induit pas la maturation des DC, au niveau des marqueurs phénotypiques de surface, donc pas d'activation des LT mais les DC humaines et murines secrètent de manière surprenante de l'IL12p70, la sécrétion de cette cytokine étant normalement corrélée à l'activation des DC. La conclusion de ces résultats reste donc une absence d'activation des DC humaines face à des VLP MPyV-EGFP (Bouřa et al., 2005). Une étude parue peu après s'est intéressée à l'activation des mDC humaines face à des VLP de plusieurs PyV : le BKPyV, JCPyV, SV40, MPyV et le polyomavirus du hamster (HaPyV). Les résultats montrent une maturation des DC face aux VLP MPyV et HaPyV mais pas face aux VLP des virus de primate (Homme et singe), avec une surexpression des marqueurs d'activation de surface ainsi qu'une sécrétion d'IL-12 et une induction de réponse T CD8 (Gedvilaite et al., 2006). Certains de ces résultats sont contradictoires mais ce qu'il en ressort, par rapport au cadre de notre étude, est que les mDC humaines semblent plus prompt à s'activer en présence de VLP de PyV d'espèces différentes et que les virus de la même espèce ou d'une espèce proche n'induisent pas d'activation des mDC. Aussi, peu des ces études se sont intéressées à la relation existant entre le BKPyV et les mDC humaines.

#### **4. Les cellules dendritiques myéloïdes dans le rein**

Plusieurs études ont constatées la présence de mDC dans le rein en situation physiologique et des modifications de leur comportement en situation pathologique ; suite à une greffe de rein ou chez des patients réactivant leur BKPyV et déclarant une PVAN.

#### 4.1 Rein hors infection à BKPyV

L'étude immunohistologique de biopsies rénales saines a mis en évidence différents types de DC dans l'espace tubulo-interstitiel du cortex rénal et à proximité des glomérules rénaux par des marquages des molécules DC-SIGN, BDCA-1, BDCA-2 et CD68. Ces marquages ont donc permis d'identifier à la fois des mDC et des pDC, formant un réseau dense autour des tubules et des glomérules rénaux. Il a aussi été observé que ces populations se retrouvent augmentées chez des patients greffés en rejet ou souffrant de néphropathie à IgA (Woltman et al., 2007; Zuidwijk et al., 2012). Ces résultats montrent donc la présence de mDC, majoritairement CD1c<sup>+</sup>, dans le tissu interstitiel rénal, qui est augmentée en condition pathologique, et à proximité notamment des tubules rénaux, lieu de persistance du BKPyV. Plus précisément, les cellules hôtes décrites du BKPyV sont les hRPTEC. Plusieurs études ont montrées qu'il existait des interactions entre les hRPTEC et les mDC : la capacité de maturation et de stimulation des mDC, sous forme de MDDC ou de DC BDCA-1<sup>+</sup> isolées du sang, a été évaluée en présence d'hRPTEC autologues stimulées avec de l'IFN- $\gamma$ . Cette étude montre une capacité réduite des DC à maturer, exprimant peu de molécules d'activation membranaires, et une sécrétion accrue d'IL-10, empêchant la polarisation T<sub>H</sub>1 des LT (Kassianos et al., 2012). Une autre étude a montré le recrutement fractalkine-dépendant des mDC CD1c<sup>+</sup> récepteur aux chimiokines 1 à motif C-X-C 3 (CX3CR1)<sup>+</sup> par les hRPTEC inflammatoires exprimant la fractalkine qui, sous sa forme membranaire, promeut l'adhésion et la rétention de ces mDC aux hRPTEC et dans le rein, respectivement (Kassianos et al., 2015). Ainsi, ces études montrent que les mDC, déjà présentes dans le rein en conditions physiologiques, sont recrutées en plus grand nombre dans le rein inflammatoire et vont se retrouver en contact direct avec les hRPTEC, les cellules hôtes du BKPyV.

#### 4.2 Le cas de la PVAN

Deux études du même groupe se sont intéressées à l'effet de la transplantation et de l'infection à BKPyV sur le niveau des DC du sang périphérique (PBDC) (Womer et al., 2010; Womer et al., 2005). La première étude montre que les patients transplantés rénaux ont un niveau de PBDC diminué post-transplantation comparé au temps avant la greffe et que les patients déclarant une PVAN ont un niveau de PBDC plus faible que les patients avec une fonction du greffon stable. Les auteurs font l'hypothèse que le niveau de PBDC pré ou post-transplantation peut être prédictif du risque de développer une PVAN. Leur deuxième étude vient confirmer en partie cette hypothèse en montrant une corrélation entre le niveau de PBDC pré-transplantation et le risque de virémie post-transplantation : une déficience du niveau de PBDC avant greffe induit un plus fort risque de développer une virémie et *in fine* une PVAN (le statut virémique des patients étant associé au risque

de développement de la PVAN). Un complément à ces résultats pourrait être apporté par une étude récente dans laquelle l'infiltrat inflammatoire sur des biopsies rénales de patients développant une PVAN ou un rejet médié par les LT à été analysé par immunohistologie pour leurs populations cellulaires immunitaires (Yapici et al., 2015). Cette étude montre une augmentation significative du nombre de mDC BDCA1<sup>+</sup> chez les patients présentant une PVAN, là où les autres populations (LT, LB...) restent inchangées. De plus, ces mDC sont détectées à proximité des tubules infectés par le virus. Ces résultats posent donc pour la première fois l'hypothèse d'un rôle des mDC BDCA1<sup>+</sup> dans la physiopathologie de l'infection à BKPyV. En relation avec les deux études présentées au début du paragraphe, on peut imaginer que le défaut de mDC décrit dans le sang des patients atteints de PVAN soit en fait caractéristique d'une migration de ces cellules qui se retrouvent au niveau des sites de réactivation dans le rein.

## Hypothèse de travail

L'objectif de ma thèse a donc été d'étudier, décrire et caractériser l'interaction qui peut exister entre les mDC humaines et le BKPyV avec le postulat que ces cellules peuvent être impliquées dans la physiopathologie de son infection et plus particulièrement dans un transport du virus hors du rein, lors de la réactivation, participant *in fine* à l'établissement de la virémie. Cette hypothèse se base sur plusieurs arguments avancés dans cette introduction : les mDC ont été décrites comme faisant partie intégrante de l'interstitium rénal en conditions physiologiques et comme infiltrant le rein en conditions inflammatoires et spécifiquement chez les patients souffrant de PVAN. Suite à ce recrutement, elles vont se retrouver à proximité des hRPTEC, les cellules réservoir du virus. De plus les mDC sont des cellules dont les fonctions ont été montrées comme étant détournées par de nombreux virus à leurs avantages, notamment pour *trans*-infecter leurs cellules cibles via leur interaction avec les mDC, et il est avancé par certains chercheurs une capacité des PyV à échapper à la détection par les mDC. Ainsi, nous proposons que les mDC qui vont se retrouver dans un environnement inflammatoire riche en virions suite à la destruction des hRPTEC, dans lesquelles le virus se réplique après réactivation, vont être en mesure de capter ces particules virales sans être activées et, lié aux stimuli inflammatoires, migrer hors du rein en emportant avec elles ces particules virales, participant ainsi à l'établissement de la virémie. Cette hypothèse n'est, par ailleurs, pas mutuellement exclusive de l'hypothèse de la fuite du virus dans l'interstitium rénal via des lésions de la membrane basale avancée par le Pr Hirsch (Nickeleit et al., 2000).





# RESULTATS



## **Résumé de la publication**

### **Les cellules dendritiques myéloïdes sont réfractaires au polyomavirus BK mais le transmettent à des cellules permissives**

Afin d'évaluer la potentielle implication des mDC dans la physiopathologie de l'infection à BKPyV, j'ai dans un premier temps profité du modèle des MDDC, bien décrit et maîtrisé au laboratoire (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). J'ai pu constater la capacité des MDDC à fixer des particules virales fluorescentes (sous forme de VLP ou du virus infectieux) à leur surface par cytométrie en flux. Pour savoir si cette fixation menait à l'internalisation des VLP dans les MDDC, j'ai réalisé des expériences d'internalisation des VLP à 37°C et les cellules ont été analysées par différentes techniques d'imagerie. Une cinétique d'internalisation m'a permis d'estimer la dynamique de rapprochement des VLP du noyau des cellules, laissant penser que les particules sont internalisées par les MDDC. Des co-marquages de la membrane plasmique avec les VLP ou les particules infectieuses et du noyau analysés par microscopie confocale à haute résolution m'ont permis de détecter les deux types de particules virales entre le marquage nucléaire et membranaire, attestant ainsi de l'internalisation des particules. J'ai précisé mes observations en analysant l'internalisation des particules par MET et j'ai constaté que les particules virales étaient internalisées dans deux types de vésicules : de grandes vésicules rondes et des structures tubulaires issues de la membrane plasmique. En cherchant à caractériser phénotypiquement ces vésicules, j'ai constaté la co-localisation entre les VLP fluorescentes et les marqueurs de compartiments d'endocytose EEA-1 et GRAF-1, ainsi qu'avec la CTxB. EEA-1 est caractéristique des endosomes précoces pouvant correspondre aux vésicules rondes observées en MET. GRAF-1 est un marqueur de vésicules d'endocytose moins classiques impliquées dans la voie d'internalisation CLIC/GEEC, une voie d'endocytose indépendante des vésicules à clathrine et des cavéoles. Les co-marquages observés étaient souvent proche de la membrane et pour certains se prolongeaient dans le cytosol, formant un compartiment pléomorphe pouvant correspondre aux vésicules tubulaires vues en MET. De plus, la co-localisation avec la CTxB, ayant été montrée comme étant internalisée dans les cellules via des vésicules GRAF-1<sup>+</sup>, me confirme une implication de la voie CLIC/GEEC dans l'internalisation des particules du BKPyV dans les MDDC. En tant que CPA, les mDC sont équipées de PRR pour détecter les intrusions de pathogènes dans l'organisme. J'ai voulu évaluer la capacité des MDDC à s'activer face à une stimulation par les particules virales du BKPyV, en tant que VLP et de virus infectieux, via la surexpression des molécules de co-stimulation à leur surface,

analysée par cytométrie en flux. Comme déjà montré auparavant, les VLP n'ont pas induit d'activation des MDDC ; mais j'ai aussi constaté l'absence de réponse face aux virus infectieux, suggérant une ignorance des DC face au virus. Le virus pouvant être internalisé par les DC, j'ai étudié dans la même expérience i) si le BKPyV pouvait infecter les MDDC et ii) si les MDDC étaient capables de transférer le virus aux hRPTEC, i.e. *trans*-infection de hRPTEC. Par l'absence de marquage du LTA<sub>g</sub> dans les MDDC infectées, j'ai conclu que les MDDC n'étaient pas permissives à l'infection par le BKPyV. En revanche le marquage LTA<sub>g</sub> dans le noyau et la détection de VP1 dans les extraits protéiques de hRPTEC incubées avec des MDDC chargées en virus m'a permis de constater la capacité des MDDC à transférer le BKPyV aux hRPTEC. Afin d'étendre nos observations à des populations de mDC plus pertinentes physiologiquement, j'ai reproduit mes expériences sur du sang total d'individus sains ainsi que sur des mDC CD11c<sup>+</sup> triées du sang d'individus sains et de parties saines de reins tumoraux. Afin d'identifier de potentielles cellules porteuses du BKPyV dans le sang, j'ai incubé du sang total avec des VLP fluorescentes et ai constaté que les monocytes CD14<sup>+</sup>, les mDC CD11c<sup>+</sup> et les LB CD19<sup>+</sup>, dans une moindre mesure, étaient capables de fixer les VLP. Pour clarifier cette observation, j'ai isolé par tri immuno-magnétique les mDC CD11c<sup>+</sup> du sang et confirmé cette fixation. J'ai ensuite entrepris de tester mes expériences précédentes sur ces cellules isolées du sang et ai constaté que, comme les MDDC, les mDC sanguines ne s'activent pas suite à la stimulation par les particules virales, elles ne sont pas permissives au BKPyV mais permettent elles aussi la *trans*-infection de hRPTEC. Ces expériences de fixation et de *trans*-infection ont aussi été réalisées avec des mDC rénales. La reproduction de mes résultats sur ces cellules représentant un point clé de notre hypothèse. J'ai ainsi observé la capacité des mDC rénales à fixer les particules virales, comme les MDDC et mDC sanguines, leur non permissivité et leur capacité à permettre la *trans*-infection. Enfin, pour ouvrir sur un cadre clinique, je suis retourné vers du sang, de patients transplantés rénaux et très virémiques cette fois, afin de trier six populations cellulaires dans les cellules mononucléées du sang périphériques (PBMC) et essayé d'y détecter le génome du BKPyV par qPCR, pouvant ainsi ouvrir la voie vers l'identification de populations porteuses du virus dans le sang des patients. J'ai ainsi détecté du génome du BKPyV dans les fractions de monocytes et de LB dans les PBMC de ces patients.

Ces résultats représentent donc un premier pas vers la description d'un rôle des mDC, mais aussi des monocytes ou des LB, dans la physiopathologie de l'infection à BKPyV en tant que véhicule ou de réservoir utilisé par le virus pour permettre le maintien et la pérennité de son infection. Des études *in situ*, sur des biopsies rénales de patients transplantés virémiques ou ayant développés une PVAN, sont envisagées et permettront de préciser et d'avérer l'implication de ces cellules.

## **Méthodologie**

Ce paragraphe décrira les expériences réalisées lors de ma thèse, dont les résultats sont présentés dans la publication en soumission à suivre. Les méthodes de génération et de contrôle qualité des outils utilisés sont décrites dans la section « *Methods* » de l'article. Le tableau III en fin de section récapitule les anticorps utilisés dans les expériences et les tris cellulaires faits par cytométrie en flux.

### **Interaction du BKPyV avec les DC**

Pour tester la capacité des MDDC et des mDC CD1c<sup>+</sup> isolées de sang ou de rein à fixer le BKPyV,  $1.10^5$  DC ont été incubées avec 2 doses de VLP de BKPyV génotype Ib2 ou de BKPyV infectieux de la souche Dunlop (génotype Ia) couplées à l'Alexa Fluor®647 :  $1.10^3$  VLP/cellule et  $1.10^4$  VLP/cellule. L'incubation a duré une heure à 4°C pour limiter la plasticité membranaire et l'activité cellulaire afin de rendre compte d'une fixation en surface des cellules. L'excès de particules virales a été lavé trois fois en tampon phosphate salin (PBS) complétement avec 0,1% (vol:vol) d'albumine de sérum bovin (BSA). Les cellules contrôles de cette expérience, incubées dans les mêmes conditions, sont des cellules HEK293 TT (lignée de cellules épithéliales rénales humaines ; contrôle positif), les cellules LNCaP (lignée de carcinome de la prostate ; contrôle négatif) et les hRPTEC, qui ont servi dans un premier temps à vérifier la fixation des VLP avant de répéter les expériences sur des lignées plus faciles à cultiver. La fluorescence des VLP fixées à la surface des cellules vivantes (DAPI négatives) a été mesurée par cytométrie en flux.

### **Internalisation du BKPyV dans les MDDC**

Une cinétique d'internalisation du BKPyV par les MDDC a été testée en incubant pour chaque temps  $4.10^5$  MDDC avec une dose de  $1.10^4$  VLP fluorescentes/cellule pendant une heure à 4°C dans un premier temps. L'excès de VLP a été lavé trois fois en PBS 0,1% BSA. Après cette heure d'incubation,  $4.10^5$  MDDC sont fixées dans une solution de PBS complétement à 3,7% (vol:vol) avec du paraformaldéhyde (PFA) pendant dix minutes à température ambiante (RT) avant d'être lavées et incubées avec une solution à 1µg/mL de DAPI pour colorer le noyau des cellules. Ces cellules sont ensuite déposées dans une goutte de milieu de montage Prolong™ sur une lame de verre et montées avec une lamelle de verre. Ces cellules représentent le T0 de l'expérience. Les autres MDDC sont ensuite incubées à 37°C dans leur milieu de culture RPMI 1640 complétement à 2% (vol:vol) avec de l'albumine humaine et à chaque temps de l'expérience, i.e. 5, 30, 120 et 360 minutes, les cellules sont lavées de leur milieu, fixées, colorées au DAPI et montées entre lame et lamelle. Les cellules

ainsi préparées sont observées en microscopie confocale, des images sériées de chaque cellule sont prises à chaque temps et l'analyse des images a été faite avec le logiciel Imaris : pour attester de l'internalisation des VLP, le nombre de VLP éloignées de plus de 500nm ou proche de moins de 500nm du noyau est mesuré à chaque temps.

Afin de vérifier que les VLP internalisées étaient bien présentes dans le cytosol des cellules (entre la membrane plasmique et le noyau), cette expérience a été répétée avec des VLP et des particules virales infectieuses dans les mêmes conditions que précédemment (uniquement à un temps de trente minutes), en ajoutant un marquage fluorescent de la membrane avec l'agglutinine de germe de blé (WGA) couplée à l'Alexa Fluor®488. Cette lectine végétale se fixe aux molécules glycoconjuguées portant des acides sialiques, comme on en trouve dans le glycocalix membranaire entourant les cellules. En incubant les cellules fixées pendant dix minutes à RT avec une solution à 5µg/mL de WGA dans du PBS, on obtient en microscopie un marquage fin en bordure de cellule rendant compte de la morphologie de la membrane plasmique. Les cellules ainsi marquées sont observées en microscopie confocale à haute résolution, permettant de prendre des images plus résolutive, donc plus précises de nos cellules afin d'éviter le plus de biais liés à la technique quant à la détection des signaux fluorescents de nos molécules d'intérêt (membrane, VLP, BKPyV).

Pour préciser d'autant plus nos observations,  $5 \cdot 10^6$  MDDC ont été incubées à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 virus/cellule (MOI 1) ou une quantité équivalente de VLP (basée sur une concentration en nombre de particules/mL) pendant trente minutes. L'excès de particules virales est lavé trois fois avec du PBS 0,1% BSA et les cellules sont fixées avec du PBS 1,6% (vol:vol) glutaraldéhyde pendant une heure à RT. Les cellules sont ensuite culotées à 4000 tours/minute pendant vingt minutes avant d'être déshydratées et imprégnées dans une résine d'épon afin d'en réaliser des coupes ultra-fines et de les observer en MET.

### **Caractérisation des vésicules d'endocytose du BKPyV dans les MDDC**

Pour caractériser les deux types de vésicules d'endocytose observées en MET,  $4 \cdot 10^5$  MDDC/puits ont été adhérentes dans des microlames huit puits traitées à la poly-L-lysine pendant deux heures à 37°C dans du RPMI 1640 2% albumine humaine.  $1 \cdot 10^4$  VLP fluorescentes ont été ajoutées dans trois puits et une solution à 2µg/mL de CTxB couplée à l'Alexa Fluor®555 dans du PBS a aussi été ajoutée dans l'un de ces puits, pour trente minutes supplémentaires à 37°C. Les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS, fixées dix minutes à RT avec du PBS 3,7% PFA, lavées et la membrane a été marquée avec la solution à 5µg/mL de WGA fluorescente. Elles ont ensuite été perméabilisées avec une solution de PBS 0,1% BSA 0,1% (vol:vol) Triton X100 pendant 15 minutes à RT. Après deux

lavages les cellules ont été saturées avec une solution de PBS à 3% (vol:vol) de sérum normal de chèvre pendant une heure à RT, la solution a été retirée et les deux puits sans CTxB ont été complétés avec, respectivement, une solution de PBS 0,1% BSA à 4µg/mL d'anticorps anti-GRAF-1 (Novus Biological) et d'anticorps anti-EEA-1 (BD Biosciences) pendant la nuit à 4°C. Le lendemain, les cellules sont lavées deux fois et une solution d'anticorps secondaires est ajoutée pendant une heure à RT. Enfin, après deux lavages, le noyau a été marqué avec une solution de PBS à 1µg/mL de DAPI. Les cellules ainsi marquées sont observées directement dans la microlame par microscopie confocale et les images obtenues ont été déconvoluées avec le logiciel NIS elements servant à l'acquisition des images : un algorithme de déconvolution intégré au logiciel permet de nettoyer le bruit de fond de fluorescence des images et ainsi une analyse de colocalisation plus fine.

### **Analyse de la maturation des DC**

Les MDDC et mDC CD1c<sup>+</sup> sanguines étant des CPA, la rencontre avec un agent pathogène est supposée induire un signal d'activation et de maturation dans ces cellules, caractérisé entre autre par la surexpression à la membrane de molécules de costimulation tel que le CD86 ou la sécrétion dans le milieu de cytokines de polarisation tel que l'IL-10 ou l'IL-12. Nous avons donc testé la réponse des DC face aux particules virales du BKPyV en incubant  $4.10^5$  DC avec des doses de  $1.10^3$  VLP ou BKPyV infectieux/cellule et avec une solution de PBS à 100ng/mL de lipopolysaccharide bactérien et 1µg/mL de R848 (deux ligands des TLR 4 et 7/8 respectivement) qui représente un contrôle positif de maturation. Les cellules ont été incubées vingt-quatre heures à 37°C dans leur milieu RPMI 1640 2% albumine humaine puis les cellules ont été récupérées et culotées à 1500 tours/minute, le surnageant de culture des MDDC a été récupéré et la quantité d'IL-10 et d'IL-12p70 sécrétée dans le milieu a été dosée par ELISA en suivant les recommandations du fournisseur des kits de détection (BD Biosciences), et les DC ont été incubées avec des solutions d'anticorps pendant trente minutes à 4°C : des anticorps anti-CD40 (clone 5C3), 80 (clone L307), 83 (clone HB15e), 86 (clone IT2.2), CCR6 (clone 11A9) et 7 (clone 3D12) et HLA-DR (clone G46-6) ont servi à mesurer par cytométrie en flux le niveau d'expression des marqueurs d'activation respectifs étudiés sur les cellules vivantes (DAPI négatives).

### **Etude de la *trans*-infection de hRPTEC par des DC chargées en virus et de la permissivité des DC**

Pour savoir si les MDDC et les mDC CD1c<sup>+</sup> isolées de sang ou de rein peuvent servir de transporteurs au BKPyV, nous avons étudié leur capacité à transférer le BKPyV avec lequel elles ont interagit à d'autres cellules. Cette expérience nous a aussi permis de tester la capacité du virus à

infecter les DC. L'expérience a été réalisée dans deux formats de plaques : des plaques 24 puits (notées P24) et des plaques 6 puits (notées P6).  $5.10^4$  (P24) et  $2,5.10^5$  (P6) hRPTEC ont été semées dans les plaques. Le lendemain  $2.10^5$  (P24) et  $4.10^6$  (P6) MDDC ont été incubées à une MOI de 0,1 (P24) ou avec  $2.10^5$  unité infectieuses (P6) de BKPyV pendant deux heures à 37°C dans leur milieu RPMI 1640 2% albumine humaine puis lavées trois fois avec du PBS 0,1% BSA. En parallèle,  $1.10^5$  (P24) ou  $2.10^6$  (P6) MDDC sont incubées seules dans les mêmes conditions et un puits par plaque de hRPTEC est infecté à une MOI de 0,1. Chaque puits est lavé trois fois en PBS 0,1% BSA à la fin de l'incubation. Ensuite,  $1.10^5$  (P24) et  $5.10^5$  (P6) MDDC seules sont déposées dans un puits de chaque plaque,  $1.10^5$  (P24) et  $5.10^5$  (P6) MDDC chargées en virus sont déposées seules dans un puits ou dans un puits avec un tapis de hRPTEC dans chaque plaque et remises à 37°C. Les P24 sont récupérées après sept jours. Les MDDC sont adhérentes sur une lame de poly-L-lysine et l'infection par le BKPyV est détectée par un marquage fluorescent de la protéine précoce LTA<sub>g</sub> analysé par microscopie optique, en suivant un protocole standard publié par Moriyama et Sorokin en 2009. Les cellules des plaques P6 sont récupérées après trois, cinq, sept et neuf jours de culture et des extraits protéiques sont réalisés en tampon de lyse RIPA (50mM d'hydrochloride de tris, 150mM de chlorure de sodium, 0,1% de dodécylsulfate de sodium, 0,5% de déoxycholate de sodium, 1% de triton X100, 1mM d'acide éthylène diamine tétraacétique, dans 50mL d'eau) avec un cocktail d'inhibiteur de protéases à 0,5% (vol:vol) : le culot de cellule est repris dans le RIPA+cocktail d'inhibiteur et agité pendant trente minutes à 4°C, le lysat est ensuite centrifugé à 12 000 tours/minutes à 4°C et le surnageant contenant l'extrait protéique est récupéré. Les protéines sont séparées sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium et transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a ensuite été incubée avec des anticorps dirigés contre la protéine virale tardive VP1 (Abcam) et la protéine de ménage  $\beta$ -actine (Santa-Cruz Biotechnology) et révélés par des anticorps couplés à la peroxydase. Cette expérience de *trans*-infection avec détection de la protéine LTA<sub>g</sub> après sept jours de culture a aussi été réalisée avec des mDC isolées de sang et de rein dont les quantités ont été adaptées en fonction du nombre de mDC récupérées (en respectant les proportions indiquées dans ce paragraphe).

### **Etude des populations cellulaires sanguines fixant le BKPyV**

Du sang total d'individus sains a été incubé avec des VLP fluorescentes à une concentration de 2,5 $\mu$ g/mL pendant quarante-cinq minutes à 4°C, avec ou sans une solution de bloqueur des récepteurs au fragment Fc des Ig commerciale (Miltenyi Biotec) afin de s'affranchir d'une éventuelle fixation de particules virales opsonisées par des anticorps neutralisants présents dans le sérum des individus sains potentiellement séropositifs. Le sang est ensuite lavé et différentes sous-populations



des PBMC sanguines ont été marquées par des anticorps fluorescents : CD45 (clone J33, marqueur commun aux PBMC), CD3 (clone UCHT1, LT), CD14 (clone 322A-1, monocytes), CD11c (clone BU15, mDC), CD19 (clone SJ25C1, LB), HLA-DR (clone L243, marqueur des DC), CD123 (clone 9F5, pDC) et un cocktail d'anticorps Lignée dirigé contre les cellules du lignage lymphoïde. La fixation des VLP est analysée par cytométrie par la suite.

### **Détection du génome du BKPyV dans les sous-populations de PBMC de patients transplantés rénaux virémiques de la cohorte nantaise par PCR quantitative**

Six populations présentes dans des PBMC congelées de patients transplantés rénaux suivis au CHU de Nantes ont été triées par cytométrie en flux basé sur leur viabilité (cellules DAPI négatives) et leur expression de marqueurs de surface : CD1c (clone L161, mDC), CD3 (clone OKT3, LT), CD14 (clone M5E2, monocytes), CD19 (clone SJ25C1, LB), CD123 (clone 9F5, pDC) et NKp46 (clone BAB281, cellules NK). L'ADN (virale et génomique) de chaque population cellulaire a été extrait en suivant les recommandations des fournisseurs des kits d'extraction (Macherey-Nagel ou Qiagen) en fonction de la quantité de cellule triée. La détection du génome viral a ensuite été faite en utilisant un protocole standard de PCR quantitative utilisé pour le suivi des patients au service de virologie du CHU de Nantes : 5µL d'ADN purifié est mélangé avec 20µL d'un pré-mix commercial contenant la polymérase à ADN (Takara Bio Inc), deux paires d'amorces à 0,3µM dirigées contre le gène du LTA<sub>g</sub> du BKPyV et le gène de l'albumine humaine, les sondes fluorescentes à 0,1µM associées à chacun de ces gènes et du diméthylsulfoxyde à 2% (vol:vol). Les cycles d'amplification sont comme suit : 95°C 5min, (dénaturation 94°C 20min, hybridation 57°C 20min, élongation 72°C 20min)x45. Les résultats obtenus sont normalisés au nombre de copie de l'albumine humaine et exprimés en copies d'ADN/10<sup>6</sup> cellules.

**Tableau III. Liste des anticorps utilisés en cytométrie**

Cible	Clone	Fluorochrome	Concentration/Dilution	Fournisseur
<b>Analyse de la maturation des DC</b>				
CD40	5C3	FITC	1/100	BD Biosciences
CD80	L307	APC	1/100	BD Biosciences
CD83	HB15e	PE	1/100	BD Biosciences
CD86	IT2.2	PE	1/100	BD Biosciences
CCR6	11A9	PE	1/100	BD Biosciences
CCR7	3D12	APC	1/100	BD Biosciences
HLA-DR	G46-6	APC	1/100	BD Biosciences
<b>Etude des populations cellulaires sanguines fixant le BKPyV</b>				
CD45	J33	Krome Orange	1/10	Beckman Coulter
CD3	UCHT1	Alexa Fluor®700	1/40	Beckman Coulter
CD14	322A-1	FITC	1/5	Beckman Coulter
CD11c	BU15	PECy7	1/20	Beckman Coulter
CD19	SJ25C1	PECy7	1/20	BD Biosciences
HLA-DR	L243	APCH7	1/20	BD Biosciences
CD123	9F5	Brilliant Violet®711	1/20	BD Biosciences
Lin 1	-	FITC	1/10	BD Biosciences
<b>Détection du génome du BKPyV dans les sous-populations de PBMC de patients transplantés rénaux virémiques de la cohorte nantaise par PCR quantitative</b>				
CD1c	L161	Alexa Fluor®647	1/20	Biolegend
CD3	OKT3	Brilliant Violet®605	1/20	Biolegend
CD14	M5E2	FITC	1/20	BD Biosciences
CD19	SJ25C1	Brilliant Blue®700	1/20	BD Biosciences
CD123	9F5	Brilliant Violet®421	1/20	BD Biosciences
NKp46	BAB281	PE	1/20	Beckman Coulter

1 **TITLE PAGE**

2 **Title: Myeloid dendritic cells are refractory to BK polyomavirus but transmit it to permissive**  
3 **cells**

4  
5 Mathieu Sikorski<sup>1,2,3</sup>, Flora Coulon<sup>1,2,3</sup>, Cécile Peltier<sup>1,2,3</sup>, Cécile Braudeau<sup>1,2,3,4</sup>, Alexandra  
6 Garcia<sup>1,2,3</sup>, Karine Renaudin<sup>5</sup>, Christine Kandel-Aznar<sup>5</sup>, Steven Nedellec<sup>6</sup>, Philippe Hulin<sup>6</sup>, Tsing-  
7 Lee Tang Huau<sup>7,8</sup>, Julien Branchereau<sup>1,2,9</sup>, Joëlle Véziers<sup>10,11</sup>, Nadège Marec<sup>12</sup>, Juliette  
8 Desfrançois<sup>12</sup>, Pauline Gaboriaud<sup>13</sup>, Antoine Touzé<sup>13</sup>, Julien Burlaud-Gaillard<sup>14</sup>, Régis  
9 Josien<sup>1,2,3,4</sup>, Dorian McIlroy<sup>1,2,3</sup>, Céline Bressollette-Bodin<sup>1,2,3,15</sup>, Franck Halary<sup>1,2,3</sup>

10

11 Author's affiliations: <sup>1</sup>INSERM, UMR1064-Center for Research in Transplantation and  
12 Immunology, Nantes, 44093 France; <sup>2</sup>ITUN, CHU Nantes, Nantes, 44093 France; <sup>3</sup>Université de  
13 Nantes, Nantes, 44093 France; <sup>4</sup>Laboratoire d'Immunologie, CIMNA, CHU Nantes, Nantes,  
14 44093 France; <sup>5</sup>Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU Hotel Dieu, Nantes,  
15 44000 France; <sup>6</sup>MicroPICcell imaging facility, Structure Fédérative de Recherche Santé  
16 François Bonamy - FED 4203/UMS Inserm 016/CNRS 3556, Nantes, 44000 France; <sup>7</sup>Institut  
17 Curie, PSL Research University, INSERM U932, Paris, 75005 France; <sup>8</sup>Sanofi, Breakthrough  
18 Laboratory, Vitry-sur-Seine, 94400 France; <sup>9</sup>Service urologie et transplantations rénales CHU  
19 Nantes Hôtel Dieu 1 place Alexis Ricordeau 44000 Nantes; <sup>10</sup>Plate-forme SC3M, Structure  
20 Fédérative de Recherche Santé François Bonamy - FED 4203/UMS Inserm 016/CNRS 3556,  
21 Nantes, 44000 France; <sup>11</sup>INSERM, UMRS 1229, RMeS, UFR Odontologie, CHU Hotel Dieu,  
22 Nantes, 44000 France; <sup>12</sup>Plate-forme Cytocell, Structure Fédérative de Recherche Santé  
23 François Bonamy - FED 4203/UMS INSERM 016/CNRS 3556, Nantes, 44000 France;

24 <sup>13</sup>Infectiologie et Santé Publique, UFR de Sciences Pharmaceutiques, Université François  
25 Rabelais, Tours, 37082 France; <sup>14</sup>Département des Microscopies, Plateforme IBiSA de  
26 Microscopie Electronique, Université François Rabelais, Tours, 37000 France; <sup>15</sup>Service de  
27 virologie clinique, CHU Hotel Dieu, Nantes, 44000 France.

28

29 Corresponding author: Dr Franck Halary (*ORCID: 0000-0003-0336-9615*), Team “Dendritic cells  
30 and Immune Regulation in Transplantation and Immunopathology”, UMR1064 INSERM,  
31 bâtiment Jean Monnet, CHU Hotel Dieu, 30, bd Jean Monnet, 44093 NANTES cedex 1. Tel:  
32 (+33)2 40 08 74 12, fax: (+33)2 40 08 74 11, email: [franck.halary@univ-nantes.fr](mailto:franck.halary@univ-nantes.fr)

33

34 Abstract word count: 157

35 Text word count: 11926

36

37 **Abstract:**

38 The BK polyomavirus (BKPyV) persists in the human renourinary epithelium. Over  
39 immunosuppressed kidney transplant patients suffer from BKPyV reactivation first  
40 characterized by a viral shedding in urines, i.e. viruria. Uncontrolled BKPyV replication in  
41 kidney leads to a viruria-to-viremia transition that is virus in the blood. Myeloid dendritic cells  
42 (mDC) were recently reported to infiltrate PyV-associated nephropathy lesions. Thus we  
43 hypothesized that mDC could participate to BKPyV infection in reactivating patients. We first  
44 demonstrated that *in vitro*-generated mDC captured BKPyV through an unexpected GRAF-1+  
45 endocytic pathway. Neither capsids nor BKPyV infectious particles activated mDC. MDCC as  
46 well as tissue mDC re-targeted the virus to primary renal epithelial cells. Finally, we showed  
47 that BKPyV DNA was associated with monocytes and B-cells in the PBMC of kidney  
48 transplanted patients with sustained viremia. This study sheds light on a new role for mDC  
49 and putatively other immune cells in the BKPyV infection in kidney transplanted patients as  
50 well as healthy individuals.

51

## 52 Introduction

53 The BK polyomavirus (BKPv) was the first member of the *Polyomaviridae* family to be  
54 discovered in 1971 (Gardner et al., 1971). It is a small non-enveloped virus encoded by a  
55 double-stranded circularized DNA genome of approximately 5Kb protected by an icosahedral  
56 capsid mainly composed of the major VP1 protein (Gardner et al., 1971; Seif et al., 1979;  
57 Wright and Di Mayorca, 1975). BKPv productively infects a vast majority of the worldwide  
58 population asymptotically (Chesters et al., 1983; Egli et al., 2009). Following the primary  
59 infection which mostly occurs during childhood (Brown et al., 1975; Flaegstad et al., 1986),  
60 BKPv establishes a persistent infection in the renourinary tract (Heritage et al., 1981).  
61 However, evidence of BKPv persistency and reactivation in salivary glands has emerged from  
62 clinical data showing BKPv reactivation in HIV-infected individuals suffering from the HIV-  
63 associated salivary gland disease (HIV-SGD; (Burger-Calderon et al., 2014; Burger-Calderon et  
64 al., 2016)). In kidney allograft recipients, immunosuppressive conditioning induces BKPv  
65 reactivation in the kidney tubular epithelium (Hirsch et al., 2002) first leading to viral shedding  
66 in urine, i.e. viruria, as cell-free virions or associated to *decoy* cells (Drachenberg et al., 1999;  
67 Nickeleit et al., 2000). A sustained infection due to an inadequate immune control was then  
68 shown to most likely cause denudation of the tubular epithelial basal membrane by shedding  
69 of infected epithelial cells leading eventually to the establishment of viremia (Nickeleit et al.,  
70 1999). BKPv viremia is associated to the occurrence of a polyomavirus-associated  
71 nephropathy or PVAN in up to 10% of kidney-grafted (KTx) patients reactivating BKPv, i.e.  
72 representing almost 50% of KTx patients (Drachenberg et al., 2004). At that stage, BKPv is  
73 the first infectious cause of kidney graft loss (Hirsch, 2002; Randhawa et al., 1999).

74 Myeloid DC are key players of the induction phase as well as the polarization of the immune  
75 response (see for review (Chow et al., 2011)). As a consequence, it has been proposed that  
76 they could be involved in immune responses against various animal and human  
77 polyomaviruses (Bickert et al., 2006; Changyong et al., 2010; Drake III et al., 2001; Eriksson et  
78 al., 2011). Late stage PVAN, i.e. PVAN-B and -C is characterized by a mild inflammation,  
79 fibrosis and tubular atrophy while early stages are marked by cell infiltrates and inflammation  
80 (Drachenberg et al., 2003; Hirsch and Randhawa, 2013; Kuypers, 2012). Although this infiltrate  
81 was recently shown to contain BDCA-1+/CD1c+ dendritic cells (DC), the most abundant  
82 myeloid DC (mDC) subset in blood and various tissues (Lindstedt et al., 2005; Woltman et al.,  
83 2007; Yapici et al., 2015; Zuidwijk et al., 2012), CD1c+ mDC have been shown to reside in  
84 human kidneys under physiological conditions where they could closely interact with renal  
85 proximal tubular epithelial cells (hRPTEC), a well-known cellular host for BKPyV (Woltman et  
86 al., 2007). Intriguingly, this type of cell-to-cell interaction has already been related to a strong  
87 decrease in DC maturation and retention of DC in the renal tissue resulting in a loss of DC  
88 functions (Kassianos et al., 2012; Kassianos et al., 2015). Moreover the ability of BKPyV  
89 particles to induce activation and eventually DC maturation to readily ensure optimal BKPyV-  
90 derived antigen presentation to T cells was challenged by the demonstration that monocyte-  
91 derived DC (MDDC) were unresponsive to BKPyV viral-like particles (VLP), which consist of  
92 empty capsids lacking minor capsid proteins, i.e. VP2 and 3, and the viral DNA genome  
93 (Gedvilaite et al., 2006). Finally, although no direct interaction between BKPyV and human  
94 blood DC has been demonstrated so far, very few studies previously reported that BKPyV DNA  
95 was associated with PBMC of healthy and HIV+ patients suffering from HIS-SGD, i.e.,  
96 supporting the hypothesis that at least one PBMC subset could capture and transport viral  
97 DNA in the bloodstream of immunocompromised as well as healthy individuals (Azzi et al.,

98 1996; Dolei et al., 2000; Sundsfjord et al., 1996). Noticeably, mDC have been widely proposed  
99 to function as a shuttle for various human viruses like HIV (Geijtenbeek et al., 2000), Ebola  
100 (Alvarez et al., 2002) or CMV (Halary et al., 2002; Haspot et al., 2012) thus promoting their  
101 infection.

102 Based on these data, we hypothesized that mDC could behave as a transporter for the BKPyV  
103 allowing it to escape the renal compartment and to reach the blood stream. Here, we  
104 demonstrated first in MDDC that BKPyV was efficiently endocytosed in macropinosome-like  
105 as well as unconventional GRAF-1+ tubular vesicles. MDDC and blood CD1c+ mDC were clearly  
106 shown to be unresponsive towards VLP and BKPyV infectious particles, suggesting an active  
107 viral-dependent mechanism to escape mDC activation thus contributing to ineffective  
108 immune responses in transplant patients. Moreover, we demonstrated that MDDC and CD1c+  
109 mDC from healthy blood and kidney were totally non-permissive to BKPyV but could promote  
110 *trans*-infection of BKPyV to hRPTEC supporting a physiologically relevant role for mDC in viral  
111 spreading. In whole blood of healthy individuals, we show that BKPyV VLP were capable of  
112 attaching to monocytes and mDC suggesting a role for those blood cells from myeloid origin.  
113 Finally, various cell subsets were sorted from PBMC of highly viremic transplant patients. A  
114 qPCR analysis revealed that viral DNA could be found in monocytes or B cells. Altogether these  
115 results imply that myeloid cells like mDC and monocytes, but also B lymphocytes, could play  
116 a major role in the spreading of BKPyV from the renal compartment to the blood stream.

117



118 **Results**

119 **Human monocyte-derived dendritic cells bind BKPyV particles as efficiently as human renal**  
120 **proximal tubular epithelial cells**

121 In an attempt to address whether human dendritic cells could play a role in the BKPyV  
122 infection, we first tested whether *in vitro*-generated DC derived from human blood monocytes  
123 (MDDC) could bind BKPyV particles. We produced such VLP composed of auto assembled  
124 major capsid protein VP1 molecules by transiently transfecting HEK293TT cells with a plasmid  
125 encoding the sub-type Ib2 VP1 sequence. VLP purity was checked by negative contrast  
126 transmission electron microscopy (Figure 1A). We then incubated MDDC and human primary  
127 renal proximal tubular epithelial cells (hRPTEC) with comparable doses of fluorescence-  
128 labelled VLP. Both cell types were equally stained, i.e. showed similar MFI, suggesting similar  
129 BKPyV VLP binding abilities (Figure 1B). Interestingly, hRPTEC detached with trypsin or EDTA  
130 were equally capable of binding VLP (Supplemental Figure 1). A quantitative analysis of VLP  
131 binding was then performed on HEK293TT cells, also very permissive to BKPyV infection, and  
132 MDDC from different donors as well as on the LNCaP cell line, already described as non-  
133 permissive to BKPyV infection. As expected, no binding to LNCaP cells could be observed  
134 confirming the absence of appropriate receptors for BKPyV on those cells. Conversely, both  
135 HEK293TT cells and MDDC were able to bind Ib2 VLP in a dose dependent manner (Figure 1C).  
136 Moreover no difference could be observed in the dose-dependent binding of Ia and IVb1  
137 genotype-derived VLP compared to Ib2 VLP on those cells (Supplemental Figure 1). These  
138 results were extended to the dose-dependent binding of fluorescence-labelled infectious  
139 BKPyV particles on MDDC (Dunlop strain; Figure 1D). Altogether, these results clearly  
140 established the capacity of MDDC to bind BKPyV VLP from the most frequent circulating

141 genotypes in Europe (Ia and Ib2), and the phylogenetically distant genotype IVb1 known to be  
142 restricted to east Asia. In terms of binding both VLP and infectious particles, MDDC behaved  
143 similarly to permissive renal epithelial cells.

144

#### 145 **BKPyV particles are rapidly endocytosed in large round-shaped and tubular vesicles in MDDC**

146 When kept as immature cells, MDDC, like all other professional antigen presenting cells,  
147 exhibit high levels of phagocytosis/endocytosis leading to efficient antigen uptake (Sallusto  
148 and Lanzavecchia, 1994b). Based on our previous results, we next wondered whether BKPyV  
149 particles could be internalized into immature MDDC. We first analyzed the distance of VLP to  
150 the nucleus in MDDC at 4°C and after six hours at 37°C. A quantification of VLP displayed as  
151 dots by the Imaris software in Figure 2A demonstrated that VLP were located closer to the  
152 nucleus after various incubation times in physiological conditions. As soon as five minutes at  
153 37°C, there was a significant increase in the amount of VLP close to the nucleus, moving from  
154 approximately 25% of total spots at time 0 to 40% after five minutes. Thereafter, the  
155 proportion of VLP spots <500nm from the nuclear membrane remained close to 40% (Figure  
156 2B). To ensure that VLP were located between the plasma membrane and the nucleus,  
157 confocal imaging was performed on MDDC incubated with either VLP (Figure 2C) or infectious  
158 particles (Figure 2D). The wheat-germ agglutinin (WGA) was used as a plasma membrane  
159 marker and nuclei were also stained with DAPI. Figures 2C and 2D show representative  
160 confocal sections of distinct cells containing few but countable VLP or BKPyV mostly as small  
161 but clearly resolved dots. Unexpectedly, the VLP signal was sometimes located in non-dotted  
162 structures (Figure 2C, asterisks). By reconstructing a cell containing such intracellular  
163 structures in 3D, we could confirm that the VLP fluorescent signal was localized into vesicles

164 and tube-shaped structures as well. To clarify this point at a nanometer resolution, similar  
165 experiments were performed but this time cells containing VLP or BKPyV particles were  
166 processed for transmission electron microscopy (TEM). We confirmed that either VLP (Figures  
167 3A, 3B, 3C, 3D and 3E) or infectious BKPyV particles (Figure 3F) were endocytosed into MDDC  
168 in two type of vesicles, large round-shaped vesicles and tubular structures (Figure 3). Some of  
169 these vesicles were reminiscent of sorting endosomes (Figures 3C and 3F). Interestingly,  
170 tubular structures appeared to originate from the plasma membrane, most likely caused by  
171 the accumulation of bound particles on the membrane (Figures 3D and 3E). At higher  
172 magnifications, i.e. x100,000-120,000, no curvature in the plasma membrane could be  
173 observed as already reported for SV-40 (Ewers et al., 2010). From these results we concluded  
174 that both VLP and infectious particles were endocytosed into uncoated large vesicles  
175 resembling macropinosomes already described for instance in herpesviruses internalization  
176 into MDDC (Haspot et al., 2012) and uncoated pleiomorphous vesicles, mostly tubular in  
177 morphology (40-60nm width) suggesting at least in part the use of an unconventional entry  
178 pathway by BKPyV in MDDC.

179

180 **BKPyV particles are endocytosed into EEA-1+ or GRAF-1+ compartments and partly co-**  
181 **localize with cholera toxin B subunit in MDDC**

182 Although a recent study reported that BKPyV enters hRPTEC in a caveolin- and clathrin-  
183 independent pathway (Zhao et al., 2016), no consensus exists on BKPyV internalization into  
184 biologically relevant cell types like human renal epithelial cells. By extension nearly no data  
185 were available for DC. We then sought to identify the BKPyV-containing compartments in  
186 MDDC to further clarify how BKPyV particles enter these cells. First, colocalization of VLP with

187 clathrin and caveolin was analyzed by classical confocal microscopy but we have not been able  
188 to clearly stain those markers in MDDC. Then subsequent images from cells stained with an  
189 anti-EEA-1 and incubated with fluorescent VLP were deconvoluted to reveal a clear but  
190 incomplete colocalization of EEA-1 and VLP in many cells, highlighting vesicular structures of  
191 various sizes that could be related to the large endosomes evidenced by TEM. Based on the  
192 pixel size for all images, we could calculate that vesicle size ranged from less than 100nm to  
193 roughly 1 $\mu$ m diameter in agreement with previous observations made by our group with  
194 larger viruses like hCMV (Haspot et al., 2012). However, all VLP did not colocalize with EEA-1  
195 especially those associated with polymorphous tubular structures (Figures 4A and 4B). So we  
196 attempted to characterize markers that could be associated with the unconventional tubular  
197 structures in MDDC. Based on previous studies, clathrin- and caveolin-independent  
198 endocytosis pathways have been related to the internalization of GPI-anchored proteins,  
199 namely the clathrin-independent carriers (CLIC) and the glycosylphosphatidylinositol-  
200 anchored protein-enriched compartments (GEEC) endocytic pathway (Kirkham et al., 2005;  
201 Sabharanjak et al., 2002). More recently, this endocytic pathway has been associated with the  
202 protein GTPase Regulator Associated with Focal Adhesion Kinase-1 (GRAF1), a Rho-GAP  
203 domain containing protein (Lundmark et al., 2008). We observed relatively abundant VLP-  
204 GRAF-1 colocalization events in most cells. GRAF-1 staining was mostly located close to the  
205 cell surface but sometimes also linked to deeper pleiomorphous structures (Figure 4C; bold  
206 white arrows). Cholera toxin B subunit (CTxB) has been shown to use GRAF-1 vesicles to enter  
207 cells (Lundmark et al., 2008). Moreover, polyomaviruses are known to share a retro transport  
208 endocytic pathway with Shiga and Cholera toxins (Nelson et al., 2013). Thus we looked for  
209 colocalization between VLP and CTxB in MDDC. Interestingly, colocalized spots were detected,  
210 confirming involvement of the CLIC/GEEC pathway and GM1-containing lipid rafts as

211 platforms for the BKPyV receptors on MDDC (Figure 4D, thin white arrows). Taken together,  
212 these results showed that BKPyV particles were endocytosed through at least two distinct  
213 pathways into MDDC, the first resembling macropinocytosis with large round-shaped EEA-1+  
214 vesicles and the second characterized by the GRAF-1 molecule, a hallmark of the  
215 unconventional CLIC/GEEC pathway. Whether or not both BKPyV entry pathways are  
216 connected remains to be established.

217

### 218 **Human MDDC are unable to sense BKPyV**

219 Like any other antigen presenting cells, MDDC are endowed with sensors for sterile and  
220 pathogen-associated danger signals such as toll-like receptors (TLR) allowing them to switch  
221 from an immature to an activated or mature status. Then matured MDDC become capable of  
222 efficiently presenting antigens to specific naïve T lymphocytes (Sallusto and Lanzavecchia,  
223 1994a). Here we wondered whether BKPyV particles either as empty capsids or infectious  
224 virions could act on CD86 expression which is known to be a sensitive indicator of DC viral-  
225 induced activation and maturation (Manel et al., 2010). Immature MDDC from distinct blood  
226 donors were cultured for 24 hour with culture medium only or VLP, BKPyV infectious virions  
227 or medium supplemented with LPS and R848, two TLR agonists respectively triggering TLR-4  
228 and TLR-7/8. The LPS+R848 condition was used as a positive control for activation measured  
229 by the CD86 upregulation at the cell surface. As shown in Figure 5A, contact with BKPyV  
230 particles, either VLP or whole virions, was insufficient to activate immature MDDC.  
231 Accordingly, no IL-10 or IL-12p70 could be detected by ELISA in the corresponding culture  
232 supernatants (Figure 5B). To ensure that other DC activation/maturation markers behaved  
233 similarly, we looked at expression variations of several cell surface makers found on MDDC

234 and known to be augmented on activated cells. In line with previous results, no measurable  
235 upregulation of CD80, CD83, CD40, CCR7 and HLA-DR could be observed except for the  
236 LPS/R848 condition, nor was there any alteration of CCR6 expression (Figure 5C). Taken  
237 together these results confirmed that neither VLP nor whole virions could activate MDDC  
238 strongly suggesting that although they were responsive to TLR agonists, MDDC appear to  
239 ignore the presence of BKPyV.

240

241 **MDDC are not permissive to BKPyV infection but can transfer the virus to human renal**  
242 **proximal tubular epithelial cells**

243 Since MDDC were capable of capturing BKPyV particles through an unconventional endocytic  
244 pathway, it seemed likely that incoming particles could be protected from degradation.  
245 However whether endocytosed virions could infect MDDC themselves or be transmitted to  
246 permissive cells remained to be explored. Thus we took advantage of a *trans*-infection assay  
247 that we set up for hCMV studies. Briefly, it consists in incubating MDDC with controlled  
248 amounts of virus at 37°C to allow viral endocytosis or simply adhesion to the plasma  
249 membrane. Then, after extensive washes, unbound virions were removed and loaded MDDC  
250 were subsequently cultured in close contact to a hRPTEC monolayer. At various times after  
251 this contact with MDDC or virus we analyzed all cells by immunofluorescence for the presence  
252 of LTA<sub>g</sub> in nuclei. As expected, no LTA<sub>g</sub> staining could be seen in hRPTEC and MDDC alone  
253 (Figure 6A; upper rows). Similarly, none of the MDDC tested became positive for LTA<sub>g</sub> when  
254 cultured for seven days after being infected with the Dunlop strain (Figure 6A; lowest row and  
255 related inset). In contrast, a large fraction of BKPyV-infected hRPTEC were unequivocally  
256 positive for LTA<sub>g</sub> demonstrating that the Dunlop strain used here was readily infectious at a

257 low MOI. Interestingly, BKPyV-loaded MDDC were clearly able to *trans*-infect BKPyV to hRPTEC  
258 as efficiently as in the *cis*-infection condition, i.e. Dunlop-infected hRPTEC, suggesting that  
259 BKPyV infection was not initiated in MDDC but could occur in hRPTEC through a MDDC-  
260 dependent *trans*-infection process. We next looked at a late gene product, the VP1 major  
261 capsid protein, in the same setting but at various time points to confirm our previous  
262 observations and also to document the kinetics of infection in both *cis*- and *trans*-infection  
263 conditions. As early as day three, VP1 was only detected in hRPTEC *cis*-infection. At day five,  
264 the protein appeared also in the *trans*-infection condition. Since VP1 expression peaked at day  
265 five in *cis*-infected hRPTEC versus day 9 in the *trans*-infection, we concluded that this delay in  
266 the VP1 appearance might be due to lower amounts of virus in the *trans*-infection condition  
267 (Figure 6B). Hence, hRPTEC exhibit a large available surface of interaction with viral particles  
268 compared to MDDC at least during the endocytic phase of this assay. Altogether these results  
269 demonstrated that MDDC are non-permissive to the BKPyV Dunlop strains but kept the  
270 potential to redirect the virus to highly permissive cells like hRPTEC.

271

### 272 ***Ex vivo* blood and kidney CD1c+ mDC can carry and transfer BKPyV**

273 Although MDDC display functional similarities with *bona fide* human myeloid DC, they are now  
274 considered as a model of inflammatory DC rather than organ-residing immature mDC. In an  
275 attempt to extend our previous results to more relevant human DC subsets, we wondered  
276 whether circulating peripheral blood DC could behave as MDDC. To avoid any technical bias,  
277 we incubated fluorescence-labelled VLP with whole blood of healthy volunteers. Cells were  
278 gated as presented in the Supplemental Figure 2. We then evaluated the binding of VLP to  
279 various cell subsets in PBMC by flow cytometry: T (CD3+) and B lymphocytes (CD19+), total

280 monocytes (CD14+) as well as myeloid CD11c+ (mDC) and plasmacytoid CD123+ DC (pDC)  
281 among HLA-DR-positive Lin-negative cells. Figure 7A shows representative results obtained on  
282 whole blood. No VLP binding was observed on T lymphocytes and pDC suggesting that those  
283 cells of the lymphoid lineage appeared to be unable to bind BKPyV particles. Conversely,  
284 myeloid cells, i.e. monocytes and mDC, were clearly able to bind VLP. B-cells showed a limited  
285 ability to interact with empty capsids. We quantified these interactions on several healthy  
286 blood donors and similar results were obtained although a certain degree of variability  
287 inherent to human samples was noticed. Here again, VLP significantly stained monocytes and  
288 mDC in whole blood, regardless of the BKPyV serostatus of donors, whereas the other cell  
289 types were left almost unstained (Figure 7B). In order to rule out any effect of anti-BKPyV  
290 antibodies in whole blood samples of BKPyV seropositive donors, we performed this binding  
291 assay in the presence IgG Fc fragment receptor inhibitors. For mDC and monocytes (only data  
292 showing the results for mDC are shown in Figure 7C) no significant difference in the VLP  
293 binding could be observed with or without Fc receptor blockers. To avoid any interference of  
294 blood components to the VLP binding, we sought to isolate blood mDC using a commercial  
295 immunomagnetic cell sorting kit based on CD1c expression. A representative gating showing  
296 sorting efficiency is shown in Supplemental Figure 3A. We formally demonstrated that blood  
297 CD1c+ mDC were capable of binding VLP as well as BKPyV particles (Figures 7D and 7E,  
298 respectively). Next, we showed that CD1c+ blood mDC were also non responsive to VLP or  
299 BKPyV co-incubations based on the absence of CD86 upregulation on those cells (Figure 7F).  
300 Since it was recently shown that CD1c+ renal DC numbers were significantly increased in  
301 BKPyV-associated nephropathic kidneys (Yapici et al., 2015), we next wondered whether renal  
302 CD1c+ DC could be able to bind BKPyV particles like blood mDC. Freshly isolated cells were  
303 prepared for binding experiments from healthy parts of tumor-bearing kidneys. Quality



304 control is shown in the Supplemental Figure 3B. We demonstrated first with those cells that  
305 they were also clearly able to bind VLP (Figure 7D) and infectious BKPyV particles of the Dunlop  
306 strain (Figure 7E) in a dose-dependent manner. We finally explored the capacity of CD1c+ mDC  
307 from the blood and the kidney to *trans*-infect BKPyV virions to hRPTEC. These experiments  
308 were performed similarly to those presented in Figure 5A, i.e. based on the counting of LTag-  
309 positive cells among total cells. As expected, CD1c+ mDC from both compartments were non-  
310 permissive but were efficient at propagating BKPyV to hRPTEC demonstrating that  
311 physiologically relevant mDC behave like MDDC in our experimental system (Figure 7G).

312

313 **BKPyV genome is detected in the monocytic and B-cell subsets in PBMC of kidney transplant**  
314 **patients with sustained viremia**

315 Given that blood mDC and monocytes from healthy individuals were shown to bind BKPyV VLP  
316 or infectious particles, we sought to look for the presence of viral DNA in various cell subsets  
317 in PBMC of ten kidney transplant patients presenting viruria and persistent viremia, i.e. above  
318  $6 \cdot 10^4$  genome copies/ $10^6$  cells (Table 1). Three of them were not productively infected based  
319 on undetectable viruria and a transient and barely detectable viremia, i.e. only one positive  
320 qPCR. We used FACS-sorting to isolate T- (CD3+) and B-cells (CD19+), monocytes (CD14+), NK  
321 cells (NKp46+) , mDC and pDC (see the Supplemental Figure 4 for the gating strategy) and  
322 performed qPCR on DNA extracted from each cell subset. Unfortunately, no adequate amount  
323 of DNA could be retrieved from extraction for the mDC and pDC fractions due to almost no  
324 sorted cells in expected fractions. Interestingly, DNA could be found only in monocytes and B-  
325 cells from patients with sustained viremia and elevated viruria (Table 2 and Figure 8A). We  
326 then only quantified BKPyV DNA within positive fractions, i.e. either in monocytes alone in

327 one patient or in monocytes and B-cells in four patients out of seven with a documented  
328 sustained viremia. Although we could observe a high variability between patients, replicates  
329 were rather homogeneous. Values ranged from  $2 \cdot 10^2$  to almost  $3 \cdot 10^5$  copies/ $10^6$  cells. The  
330 highest values were attributed to the B-cell fraction of two highly viremic patients but it  
331 remained difficult to link a particular cellular fraction to high BKPyV DNA burdens. Altogether  
332 these results showed that at least monocytes and B-cells in the PBMC of kidney transplant  
333 patients with high sustained viremia could be associated with BKPyV DNA. Whether this  
334 cellular DNA amount was associated to endocytosed BKPyV particles or episomal DNA in  
335 monocytes and B-cells remains to be established.

336

## 337 **Discussion**

338 BKPyV replication in the urinary epithelium causes viruria in kidney transplant. It has been  
339 proposed that denudation of the renal tubular epithelium through shedding of infected  
340 epithelial cells could help the virus to leave the renal compartment and reach the blood  
341 stream. In this study, we hypothesized that renal mDC whose frequency specifically increases  
342 in the kidney upon PVAN could also participate in the viral path from the kidney to the blood  
343 by capturing BKPyV particles and targeting them to permissive cells, meaning in turn they  
344 could actively participate to the viral spreading in the host. Our results demonstrated that  
345 mDC indeed endocytosed BKPyV particles through two distinct pathways, notably through an  
346 unconventional GRAF-1-associated route which could be dependent on gangliosides found at  
347 least in part on the DC plasma membrane. Recently, the GRAF-1 marker has been strongly  
348 associated with the CLIC/GEEC pathway which is by definition independent of caveolin and  
349 clathrin as reported previously (Lundmark et al., 2008). Moreover, our results are in line with

350 a recent study from Michael Imperiale's laboratory showing that BKPyV was internalized into  
351 hRPTEC in a caveolin and clathrin-independent manner (Zhao et al., 2016). We have shown  
352 that BKPyV-containing vesicles in MDDC, partially overlapped with CTxB positive endosomes  
353 suggesting the probable participation of ganglioside-enriched lipid-rafts located at the cell  
354 surface in the BKPyV entry process. Interestingly, such an endocytic pathway has already been  
355 reported for SV40 by Ewers and colleagues (Ewers et al., 2010). It was strongly associated to  
356 the GM1 ganglioside in that setting. In parallel, we propose that the tubular endosomes  
357 observed in DC were shaped by the presence of GD1b/GT1b gangliosides, two known  
358 receptors for BKPyV as demonstrated previously (Low et al., 2006). Interestingly, Shiga toxin  
359 and ricin entry inhibitors, known to block the retrograde transport pathway, strongly inhibited  
360 BKPyV infection (Nelson et al., 2013). Similar results were achieved using derlin-1 mutants  
361 (Jiang et al., 2008). Noticeably, as far as we know, all data related to BKPyV entry or  
362 intracellular trafficking have been obtained with epithelial cells originating from kidney like  
363 hRPTEC, Vero or HEK293TT cell lines. Here we present the first data obtained with immune  
364 cells. Although we demonstrated in this study that BKPyV particles were present in two  
365 distinct endosomal subtypes after short term incubations, i.e. 30 minutes at a physiological  
366 temperature, we did not report any connection between those two intracellular  
367 compartments. For example, time-lapse experiments will be necessary to determine whether  
368 the tubular endosomes and the large vesicles containing viral particles are spatially as well as  
369 temporally linked or not. Based on previous results from our laboratory, we hypothesized that  
370 the large EEA-1+ vesicles resembling macropinosomes could be part of the  
371 endosomal/lysosomal pathway that mainly drives the enzymatically-driven antigen  
372 processing in DC (Haspot et al., 2012). We know from clinical observations that  
373 immunocompetent individuals are able to mount efficient anti-BKPyV adaptive immune

374 responses (Drummond et al., 1985; Randhawa et al., 2006; Sharma et al., 2006) indicating that  
375 APC, namely DC, effectively process viral antigens to present them to T- and B-cells *in vivo*. In  
376 this study, we did not investigate BKPyV antigen presentation because we have been unable  
377 to document MDDC and blood mDC activation or maturation when cells were co-cultured with  
378 BKPyV capsids or infectious particles even though they were still capable of responding to a  
379 TLR agonist challenge suggesting limited BKPyV-derived antigen presentation. Our  
380 observations raise an important question about the possible deficiency of MDDC as adequate  
381 sensors for the virus. Since MDDC are totally non-permissive to BKPyV, we ruled out any  
382 possible mechanism relying on viral protein expression since neither early nor late viral  
383 proteins were detected in MDDC and blood mDC upon BKPyV infection. One could speculate  
384 that viral binding on DC could trigger activation signals which mostly lead to type I interferon  
385 responses but simultaneously to inhibitory signals that could counteract activators signaling.  
386 However this remains to be confirmed by investigating sensing mechanisms in mDC.  
387 Understanding these control or escape mechanisms by BKPyV in DC and other target cells  
388 should lead to the development of new strategies to favor sensing and subsequent  
389 appropriate immune responses.

390 Most results showing data related to infectious particles in this study have been obtained with  
391 the Dunlop strain. We know that data with other viral strains of biological relevance, i.e.  
392 clinical isolates, would have enriched our results. However, we showed that VLP from three  
393 genetically diverse VP1 genotypes, namely Ib2, Ia and IVb1 behaved similarly in terms of  
394 binding with human epithelial cells and MDDC. Hurdiss and colleagues have shown that cryo-  
395 EM-based 3D structures of BKPyV VLP and infectious particles were so close that one can  
396 expect very similar abilities to bind their cellular receptors though no evidence suggested that  
397 post-entry step might differ due to absence or presence of minor capsid proteins respectively

398 (Hurdiss et al., 2016). Therefore, although testing various clinically-relevant strains will be  
399 required to extend our observations, we think that our results reflect an interaction that  
400 should be common to all BKPyV strains, i.e. clinical and laboratory-adapted isolates. In that  
401 context, it might be interesting to explore the impact of archetype vs rearranged strains.

402 In this study, we demonstrated that VLP bound several blood cell subsets, i.e. monocytes and  
403 mDC, from healthy individuals. A small number of B-cells were also stained in all whole blood  
404 samples but not significantly more than T-lymphocytes, which appeared totally unable to bind  
405 VLP like pDC. Whole blood analyses are unbiased approaches and we could eliminate potential  
406 specific antibody-mediated interference, i.e. Fc-dependent cell binding. To confirm that mDC  
407 or monocytes would be able to capture and transport BKPyV in the blood of kidney-transplant  
408 patients, we sorted the main blood cell subsets from PBMC of patients with sustained viremia.  
409 We also intended to sort mDC and pDC but it turned out to be difficult due to the very low  
410 frequencies of these cell types in transplant patients compared to healthy individuals  
411 (Fangmann et al., 2007; Hackstein et al., 2005; Hesselink et al., 2005; Womer et al., 2005).  
412 Therefore no cellular and viral DNAs could be extracted from these two cellular subsets from  
413 patients' PBMC. Our results showed that mostly B-cells and monocytes were associated with  
414 low levels of BKPyV genomic DNA. The same samples were analyzed up to four times and  
415 similar qPCR results (Ct) were obtained arguing in favor of a real association between the virus  
416 and those cells. Interestingly, our results confirmed the work published by others where  
417 BKPyV DNA could be found in PBL of healthy blood donors (Azzi et al., 1996; Chatterjee et al.,  
418 2000; Dolei et al., 2000). Such a discrepancy between results in healthy blood donors and  
419 transplanted patients needs to be discussed here. First, the main difference is thought to  
420 reside in the iatrogenic immune suppression of patients that, besides occasionally causing  
421 leukopenia, is known to specifically alter some cellular subsets in the peripheral blood, e.g.

422 the myeloid lineage (see for review (van den Bosch et al., 2017)). For example, monocyte  
423 homing and circulation is disturbed by MMF treatment (Weimer et al., 2003). B-cell  
424 proliferation and IgG secretion have also been shown to be negatively regulated by  
425 mycophenolate and everolimus (Ganschow et al., 2001; Karnell et al., 2011). Importantly, we  
426 have been limited in the amounts of collected cells for each transplanted patient, impairing  
427 the quality of DNA extractions for the minor populations like mDC or pDC in accordance with  
428 previous reports (Fangmann et al., 2007; Hackstein et al., 2005; Hesselink et al., 2005; Womer  
429 et al., 2005). Unfortunately, this did not allow us to confirm that blood mDC from patients  
430 could bear BKPyV genomes either as whole particles or episomal DNA. B-cells are numerous  
431 in salivary glands which may serve as an alternative BKPyV reservoir although previous reports  
432 are conflicting (Jeffers et al., 2009; Sundsfjord et al., 1994). We therefore considered that  
433 BKPyV-loaded B-cells may arise from this location rather than the kidney, suggesting that  
434 reactivation possibly occurs concomitantly in both anatomical sites in patients. It would be  
435 interesting then to check for the presence of the virus in saliva of these highly viremic patients  
436 to confirm our hypothesis. In addition, one could expect BKPyV DNA in B-cells from patients  
437 with other transplants characterized by similar IS burdens. Regardless of their original  
438 locations, B-cells have already been described as non-permissive shuttles for JCPyV, a virus  
439 closely related to BKPyV (Chapagain and Nerurkar, 2010). All together, these results strongly  
440 suggest that even though only a barely detectable fraction of B-cells from healthy individuals  
441 appeared able to bind BKPyV particles, B-cells might be of importance in conveying BKPyV  
442 genomes throughout patients. These findings might have implications in the management of  
443 patients by considering the monocytes and B-cells follow-up over time in kidney transplanted  
444 patients. Whether this observation is true in HSCT patients remains to be investigated.

445 In summary, our present work is a first insight into the role played by mDC or monocytes and  
446 putatively other immune cells like B lymphocytes as efficient non-permissive vehicles for  
447 BKPyV. Cell-free BKPyV particles might be picked up in the vicinity of infected hRPTEC or even  
448 acquired by those cells from infected cell-derived apoptotic bodies released before cellular  
449 shedding occurs. Our research center has created the DIVAT bio collection, the most  
450 important European validated databank in kidney transplantation (CIC Nantes, CHU Hotel  
451 Dieu, Nantes, France; <http://www.divat.fr/biocollection>). Biopsies from dozens of patients  
452 diagnosed for PVAN and other non-virally induced nephropathies compared to other acute  
453 and chronic rejection events should help us now to test *in situ* the conclusions of this *in vitro*  
454 study.

455

456 **Methods**

457 **Ethic statements**

458 Fresh human blood samples from healthy volunteers were obtained from the Etablissement  
459 Français du Sang, the French blood donor bank (EFS, Nantes, France). Biopsies from healthy  
460 parts of primitive renal carcinoma patients and blood samples from kidney transplanted  
461 patients were collected according to institutional guidelines (CPP Ouest authorization,  
462 11/08/2011) and under patients' informed consent. All samples are conserved in the ITUN bio  
463 collection declared at the french Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
464 under the reference DC-2011-1399 (09/05/2011).

465

466 **Cells**

467 Adult blood monocytes were isolated by elutriation (DTC cell-sorting facility, Nantes University  
468 Hospital/Biogen Ouest, Nantes, France) from healthy blood donors. Cells were differentiated  
469 into monocyte derived-dendritic cells (MDDC) for seven days at  $1.10^6$  cells/mL in RPMI 1640  
470 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with 2% human albumin  
471 (vol:vol; LFB SA, Courtaboeuf, France), 20ng/mL recombinant human (rh) IL-4 (CellGenix  
472 GmbH, Freiburg, Germany), 50ng/mL rhGM-CSF (Gentaur, Kampenhout, Belgique) , 2mM L-  
473 glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (P/S, Gibco, Thermo Fischer  
474 Scientific, Waltham, MA) adapted from Sallusto *et al* (Sallusto and Lanzavecchia, 1994b).  
475 Medium was refreshed every three days. Human myeloid BDCA-1+ (or CD1c+) DC were  
476 isolated from blood and kidney by positive immuno-magnetic selection using anti-CD1c  
477 microbeads according to the manufacturer's instructions with an autoMACS® Pro Separator



478 instrument (CD1c+ Dendritic cell isolation kit, human; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,  
479 Germany) or by flow cytometry sorting with a FACS ARIA (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)  
480 based on CD1c expression (FITC anti-human CD1c antibody, clone L161; Biolegend, San Diego,  
481 CA). Briefly, healthy parts of tumor-bearing kidneys were finely minced and then digested with  
482 Liberase Thermolysin Medium (TM; Roche, Bâle, Switzerland) for two hours with reaction  
483 medium exchange after one hour to maximize tissue dissociation. Blood and renal cell  
484 suspensions were then enriched in mononuclear cells by centrifugation on a Ficoll density  
485 gradient (Eurobio Abcys, Courtaboeuf, France) and prepared for the CD1c sorting. Cell sorting  
486 typically yielded >95% purity. Human renal proximal tubular epithelial cells (hRPTEC; Sciencell  
487 Research Laboratories, Carlsbad, CA) were cultured in EpiCM medium (Sciencell Research  
488 Laboratories), complemented with EpiCGS, 1% P/S (vol:vol) and 0.5% heat-inactivated fetal  
489 bovine serum (FBS, Sciencell Research Laboratories). Human RPTEC were expanded *in vitro* in  
490 5% heat-inactivated FBS when required and used up to passage six. LNCaP cells (Caliper  
491 LifeSciences, Hopkinton, MA) and HEK 293 TT cells (NCI, Frederick, MD) were cultured in RPMI  
492 1640 or DMEM media respectively, both complemented with 2mM L-glutamine and 10% FBS.

493

#### 494 **Virus and virus-like particles (VLP) stock preparation**

495 The BK polyomavirus (BKPyV) Dunlop strain of the BKPyV was a kind gift by Dr Christine H  
496 Rinaldo (UiT, Norway). The gla, glb2 and glVb1 VP1 expression vectors were kindly provided  
497 by Dr Chris Buck (NCI, USA). Amplification and purification of the Dunlop strain were adapted  
498 from previously described protocols (Jiang et al., 2008; Moriyama and Sorokin, 2009). Briefly,  
499 hRPTEC (Sciencell Research Laboratories) were infected with BKPyV at 0.5 FFU/cell (focus  
500 forming unit/cell) and sub cultured for four weeks. Cells were harvested, lysed and cell lysates

501 were subjected to purification on a continuous iodixanol gradient (OptiPrep®, Axis Shield  
502 Diagnostics Ltd, Dundee, Scotland), formed spontaneously by layering 39%, 33% and 27%  
503 iodixanol in PBS 0.8M NaCl. VLP production and purification on an iodixanol gradient were  
504 done as described previously (Pastrana et al., 2012). Both viral particles and VLP were labelled  
505 with Alexa Fluor®647 protein labelling kit according to manufacturer's instructions when  
506 required (Molecular Probes, Eugene, OR).

507

### 508 **Infectious and physical titres determination**

509 BKPyV stocks were titrated according to a protocol adapted from Moriyama and colleagues  
510 (Moriyama and Sorokin, 2009). Here, hRPTEC were cultured in 0.5% FBS EpiCM in 24-well  
511 plates up to 60-70% confluency then infected with serial dilutions of infectious BKPyV  
512 suspensions. After 5 days of culture, LTA<sub>g</sub> expression was revealed by immunofluorescence  
513 (clone PAb416; Abcam, Cambridge, UK). The number of infected cells was determined for each  
514 culture well (100 images per well) on a HCS Arrayscan device (Thermo Fisher Scientific).  
515 Infectious titers were calculated as proposed by Moriyama and colleagues (Moriyama and  
516 Sorokin, 2009). Viral particles were titrated in term of particles/mL using a qNano device (Izon  
517 Science Ltd, Oxford, UK) that count nanoparticles based on the tunable resistive pulse sensing  
518 technology (TRPS). This method is based on a size-tunable pore through which nanoparticles  
519 are driven due to pressure and voltage in an electrolyte solution. Each particle causes a  
520 resistive pulse signal detected and measured by the device software, allowing measurement  
521 of the particle size and concentration of the solution when compared to calibration particles.  
522 It was used to titer BKPyV and VLP diluted in PBS using a NP100 nanopore (detection range  
523 from 50 to 330nm) and CPC70 calibration particles (Izon Science Ltd, Oxford, UK).

524

525 **Flow cytometry and cell sorting**

526 Alexa Fluor®647 labelled-VLP were incubated for one hour at 4°C on DC, LNCaP and HEK 293  
527 TT cells, at the indicated concentration, washed two times and fluorescent VLPs bound to cells  
528 were detected by flow cytometry on live-gated cells, i.e. DAPI negative cells. DC were  
529 incubated 24 hours with  $1 \cdot 10^3$  VLP/cell,  $1 \cdot 10^3$  BkPyV particles/cell or with 100ng/mL LPS and  
530 1µg/mL R848 (Invivogen, San Diego, CA). CD40 (clone 5C3; BD Biosciences), CD80 (clone L307,  
531 BD Biosciences), CD83 (clone HB15e, BD Biosciences), CD86 (clone IT2.2, BD Biosciences),  
532 CCR6 (clone 11A9, BD Biosciences) and CCR7 (clone 3D12, BD Biosciences) and HLA-DR (clone  
533 G46-6, BD Biosciences) expression on DC was detected to monitor cell maturation. FACS  
534 analyses were mainly conducted on a LSR II flow cytometer (BD Biosciences). Whole blood  
535 was incubated with or without blockers of Fc fragment receptors (Miltenyi Biotec) and  
536 washed. Fluorescent VLP were incubated at 2.5µg/mL for 45 minutes at 4°C, washed and sub-  
537 population staining was further carried out using fluorescence-coupled antibodies: CD45  
538 (Clone J33; Beckman Coulter, Brea, CA), CD3 (Clone UCHT1; Beckman Coulter), CD14 (Clone  
539 322A-1; Beckman Coulter), CD11c (Clone BU15; Beckman Coulter), CD19 (Clone SJ25C1; BD  
540 Biosciences), HLA-DR (Clone L243; BD Biosciences), CD123 (Clone 9F5; BD Biosciences) and  
541 Lineage (Lin 1; BD Biosciences). PBMC isolated from the blood of highly viremic patients by  
542 Ficoll separation were stained with fluorescent antibodies against six populations and sorted  
543 by flow cytometry with a BD Influx™ : mDC (CD1c, clone L161), T lymphocytes (CD3, clone  
544 OKT3), monocytes (CD14, clone M5E2), B lymphocytes (CD19, clone SJ25C1), pDC (CD123,  
545 clone 9F5) and NK cells (NKp46, clone BAB281). Of note, mDC were sorted on CD19neg cells  
546 in PBMC. Cells were then washed and further prepared for nucleic acid extractions.

547

548 **Confocal microscopy**

549 MDDC were incubated with  $1.10^4$  fluorescent VLP/cell for one hour at  $4^\circ\text{C}$  in culture medium  
550 and washed two times with 0.1% BSA solution in PBS. Four hundred thousand cells were fixed  
551 with a 3.7% paraformaldehyde solution (PFA; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) in  
552 PBS in a V-bottom 96 well-plate for 10 minutes at room temperature (RT; Time zero condition).  
553 Remaining VLP-loaded MDDC were distributed at  $4.10^5$  cells/well and further incubated at  
554  $37^\circ\text{C}$ . Incubation was stopped after 5, 30, 120 and 360 minutes. Cells harvested at those time  
555 points were fixed with 3.7% PFA solution in PBS and counterstained with  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI solution  
556 in PBS. Cells were then deposited directly into ProLong<sup>TM</sup> mounting medium (Thermo Fisher  
557 Scientific) as a cell suspension thus avoiding cellular deformation due to adherence to the  
558 glass slide and mounted on a slide. Other MDDC were seeded and adhered in  $\mu$ -Slide 8 well-  
559 slides (Ibidi GmbH, Planegg Martinsried, Germany) coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich,  
560 Saint-Louis, MO), with  $4.10^5$  cells/well for two hours at  $37^\circ\text{C}$  then incubated with  $1.10^4$   
561 fluorescent BKPyV particles/cell or with a  $2\mu\text{g}/\text{mL}$  Alexa Fluor<sup>®</sup>555 conjugated CTxB (Thermo  
562 Fisher Scientific) solution in PBS and incubated thirty additional minutes at  $37^\circ\text{C}$ . Cells were  
563 then washed twice with PBS, fixed with 3.7% PFA for 10 minutes at RT. Plasma membranes  
564 were stained with  $5\mu\text{g}/\text{mL}$  Alexa Fluor<sup>®</sup>488 conjugated WGA (Thermo Fisher Scientific) in PBS,  
565 then permeabilized with 0.1% BSA, 0.1% Triton X100 in PBS for 15 minutes at RT. Two washing  
566 steps with PBS were carried out between each staining step. After permeabilization,  
567 saturation was done with 3% NGS in PBS for one hour at RT, solution was removed and primary  
568 anti-GRAF antibody (Novus Biological, Littleton, CO) at  $4\mu\text{g}/\text{mL}$  or primary anti-EEA1 antibody  
569 (BD Biosciences) in 1% BSA in PBS was added directly and incubated O/N at  $4^\circ\text{C}$ . Secondary

570 antibody staining was done during one hour at RT and finally nucleus was counterstained with  
571 1µg/mL DAPI. Cells were examined and imaged using a laser scanning confocal microscope  
572 Nikon A1RSi (Nikon, Tokyo, Japan). Digital image stacks images were collected at 60× (NA 1.4)  
573 using NIS elements confocal software and appropriate fluorescence filters. Alternatively,  
574 images were analyzed using Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland) for cell  
575 segmentation and VLP characterization: briefly, the nucleus was detected as a surface and  
576 VLPs were detected as spots. The distance of spots from the nucleus was assessed  
577 automatically by counting spot numbers below or above 500nm from the nucleus on 3D  
578 cellular modelling. Other image sets were deconvoluted using NIS elements software  
579 algorithms for compartment analyses. Deconvolution allowed for background cleaning and a  
580 finer resolution of colocalization compared to confocal imaging alone.

581

### 582 **Super Resolution Structured Illumination Microscopy**

583 Cells were prepared as already described above and then deposited directly into ProLong™  
584 mounting medium (Thermo Fisher Scientific) as a cell suspension and examined using a Nikon  
585 N-SIM microscope with a dedicated oil immersion objective (x100, NA 1.49 Plan Apo). Three  
586 dimensional optical sectioning was done respecting Nyquist sampling rate (15 structure  
587 illuminations per plane, per channel), and super resolution image reconstruction was  
588 performed using Nikon Imaging Software algorithms.

589

### 590 **Electron microscopy**

591 Five million MDDC were incubated with either 1 FFU/cell of BKPyV or an equal amount of VLP,  
592 based on physical titers for each. Cells were also incubated in medium only, for 30 minutes at  
593 37°C. Cells were washed two times with 0.1% BSA solution in PBS, fixed with 1.6%  
594 glutaraldehyde solution in PBS (vol:vol) for one hour at RT. Cells were then pelleted at  
595 4000rpm for 20 minutes before being submitted to dehydration and epon resin impregnation  
596 as already described elsewhere (Haspot et al., 2012). Ultrathin sections were observed on a  
597 JEM 1010 microscope (Jeol Europe SAS, Croissy Sur Seine, France).

598

#### 599 **ELISA**

600 Supernatants from various MDDC cultures were harvested at indicated times and frozen at -  
601 80°C until being analyzed. IL-10 and IL-12p70 were quantified in those culture supernatants  
602 by ELISA with BD OptEIA™ human IL-10 and IL-12p70 sets following the manufacturer's  
603 instructions (BD Bioscience).

604

#### 605 ***Cis* and *Trans*-infection assays**

606 A day before infection, hRPTEC (Sciencell Research Laboratories, Carlsbad, CA) were seeded  
607 at  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in EpiC medium (Sciencell Research Laboratories) supplemented with 5%  
608 FBS. After 24 hours, DC were harvested and further incubated for two hours at 37°C with the  
609 Dunlop strain at 0.1 FFU/cell. Cells were washed three times with 0.1% BSA solution in PBS. In  
610 parallel,  $1 \times 10^5$  (P24) or  $2 \times 10^6$  (P6) DC were incubated with medium at 37°C and one well of  
611 hRPTEC was infected with 0.1 FFU/cell of BKPyV during two hours and washed 3 times with  
612 0.1% BSA solution in PBS. Infected and uninfected DC were resuspended in RPMI 1640

613 (Thermo Fisher Scientific) with 2% human albumin and 2mM L-glutamine, on hRPTEC wells in  
614 EpiCM, 0.5% FBS, at  $1 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup>. After seven days of culture, DC were collected and let  
615 adhered onto poly-L-lysine-coated glass slides. Infection with BKPyV was assessed by LTA<sub>g</sub>  
616 staining, on the slide for DC and directly in the wells for hRPTEC, as described before  
617 (Moriyama and Sorokin, 2009). LTA<sub>g</sub> immunostaining was imaged on an Axiovert A1  
618 epifluorescence microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) at seven days post-  
619 infection. Cell lysates were prepared from all time points in 300μL of RIPA lysis buffer (50mM  
620 Tris HCl, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% triton X100, 1mM EDTA, in  
621 50mL of water). Proteins were separated on a 7.5% SDS-PAGE gel, transferred on a  
622 nitrocellulose membrane and stained for the major capsid protein VP1 (Abcam) and β-actin  
623 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas). BKPyV infection of DC was assessed similarly.

624

#### 625 **Quantification of viral DNA by quantitative PCR**

626 DNA was extracted from each cellular fraction using the Nucleospin<sup>®</sup> Tissue or Tissue XS  
627 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) or DNeasy<sup>®</sup> minikit (Qiagen, Courtaboeuf), depending on  
628 the amount of cells. Viral DNA and the cellular albumin gene were co-amplified using an in  
629 house duplex real time PCR (adapted from previous publications (Bressollette-Bodin et al.,  
630 2009; Bressollette-Bodin et al., 2005)). Briefly, 5μl of purified DNA are added to 20ul of mix  
631 containing 1X premix (Premix Ex Taq, Perfect Real Time, Takara Bio Inc), 0.3μM of each primer  
632 (BKVRG1, BKVRG2, ALB1RG, ALB2RG), 0.1 μM of each probe (BKVSRG, ALBSRG), DMSO 2%.  
633 The amplification program is as follows: hot start activation 5min, 95°C; 45 amplification cycles  
634 (20' denaturation at 94°C, 20' annealing at 57°C, 20' elongation at 72°C). Standard curve is

635 obtained from tenfold dilutions of a mixture of BKPyV plasmid and cellular DNA (Human DNA,  
636 Roche). Viral loads are normalized to albumin gene and expressed as DNA copies/10<sup>6</sup> cells.

637

## 638 **Statistics**

639 Statistical analyses were performed with the PRISM software (GraphPad Software Inc., version  
640 5.04, La Jolla, CA). Almost exclusively one-way ANOVA with multiple comparison tests were  
641 performed to assess significance in this study. Exceptionally, correlation and linear regression  
642 studies, Mann-Whitney or Friedman tests were also applied to some data sets. *P*-values lower  
643 than 0.05 were considered as significant.

644

## 645 **Supplemental material**

646 ***Supplemental Figure 1:*** BKPyV VLP bind to HEK293TT cells and MDDC regardless of the  
647 genotype and to hRPTEC in trypsin independent manner.

648 ***Supplemental Figure 2:*** Gating strategy to analyze the VLP binding to PBMC subsets.

649 ***Supplemental Figure 3:*** Purity of freshly isolated CD1c<sup>+</sup> DC from blood and kidney.

650 ***Supplemental Figure 4:*** Gating strategy to sort main cell subsets from transplant patients'  
651 PBMC and quantify BKPyV genome copies in each subset.



652 **Author contributions**

653 M.S. and F.H. designed, performed, analyzed and interpreted experiments and wrote the  
654 paper. F.C., C.P., C.B., A.G., S.N., P.H., T.L.T.H., J.V., N.M., J.D., P.G., J.B.-G. performed and  
655 analyzed experiments. K.R., C.K.-A. and J.B. collected and characterized all human samples  
656 used in this study. A.T., R.J., D.Mcl. and C.B.-B. participated in experimental design and data  
657 discussion and actively contributed to the manuscript preparation. F.H. designed experiments,  
658 interpreted results, wrote the paper and supervised this study. All authors reviewed and  
659 approved the manuscript.

660

661 **Acknowledgments**

662 The authors would like to thank Camille Roesch (Izon Sciences Europe Ltd.) for her help in the  
663 VLP and BKPyV particle titrations based on the TRPS technique and Hélène Roux for her  
664 technical assistance. This work was supported by the Fondation d'Entreprises Progreffe  
665 (Mathieu Sikorski's salary). This work was realized in the context of the IHU-Cesti project,  
666 which received French government financial support managed by the Agence Nationale de la  
667 Recherche via the "Investment into the Future" program ANR-10-IBHU-005. The IHU- Cesti  
668 project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. The authors  
669 declare no conflict of interest.

670

671

672 **References**

- 673 Alvarez, C.P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muñiz, A.L. Corbí, and R. Delgado. 2002. C-Type Lectins  
674 DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. *Journal*  
675 *of Virology* 76:6841-6844.
- 676 Azzi, A., R. De Santis, S. Ciappi, F. Leoncini, G. Sterrantino, N. Marino, F. Mazzotta, D. Laszlo,  
677 R. Fanci, and A. Bosi. 1996. Human polyomaviruses DNA detection in peripheral blood  
678 leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *Journal of*  
679 *neurovirology* 2:411-416.
- 680 Bickert, T., G. Wohlleben, M. Brinkman, C.M. Trujillo-Vargas, C. Ruehland, C.O.A. Reiser, J.  
681 Hess, and K.J. Erb. 2006. Murine polyomavirus-like particles induce maturation of bone  
682 marrow-derived dendritic cells and proliferation of T cells. *Medical Microbiology and*  
683 *Immunology* 196:31-39.
- 684 Bressollette-Bodin, C., M. Coste-Burel, B. Besse, E. Andre-Garnier, V. Ferre, and B.M. Imbert-  
685 Marcille. 2009. Cellular normalization of viral DNA loads on whole blood improves the  
686 clinical management of cytomegalovirus or Epstein Barr virus infections in the setting  
687 of pre-emptive therapy. *J Med Virol* 81:90-98.
- 688 Bressollette-Bodin, C., M. Coste-Burel, M. Hourmant, V. Sebille, E. Andre-Garnier, and B.M.  
689 Imbert-Marcille. 2005. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104  
690 renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the*  
691 *American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*  
692 5:1926-1933.
- 693 Brown, P., T. Tsai, and D.C. Gajdusek. 1975. Seroepidemiology of human papovaviruses.  
694 Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence  
695 among remote peoples of the world. *American journal of epidemiology* 102:331-340.

696 Burger-Calderon, R., V. Madden, R.A. Hallett, A.D. Gingerich, V. Nিকেলেইট, and J. Webster-  
697 Cyriaque. 2014. Replication of oral BK virus in human salivary gland cells. *J Virol* 88:559-  
698 573.

699 Burger-Calderon, R., K.J. Ramsey, J.M. Dolittle-Hall, W.T. Seaman, L.K. Jeffers-Francis, D. Tesfu,  
700 V. Nিকেলেইট, and J. Webster-Cyriaque. 2016. Distinct BK polyomavirus non-coding  
701 control region (NCCR) variants in oral fluids of HIV- associated Salivary Gland Disease  
702 patients. *Virology* 493:255-266.

703 Changyong, G., M. Sun, H. Li, N. Brockmeyer, and N. Wu. 2010. Simian Virus 40 Inhibits  
704 Differentiation and Maturation of Rhesus Macaque DC-SIGN+-Dendritic Cells.  
705 *European Journal of Medical Research* 15:377-382.

706 Chapagain, M.L., and V.R. Nerurkar. 2010. Human polyomavirus JC (JCV) infection of human B  
707 lymphocytes: a possible mechanism for JCV transmigration across the blood-brain  
708 barrier. *J Infect Dis* 202:184-191.

709 Chatterjee, M., T.B. Weyandt, and R.J. Frisque. 2000. Identification of archetype and  
710 rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *J Med Virol*  
711 60:353-362.

712 Chesters, P.M., J. Heritage, and D.J. McCance. 1983. Persistence of DNA sequences of BK virus  
713 and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 147:676-684.

714 Chow, A., B.D. Brown, and M. Merad. 2011. Studying the mononuclear phagocyte system in  
715 the molecular age. *Nature reviews. Immunology* 11:788-798.

716 Dolei, A., V. Pietropaolo, E. Gomes, C. Di Taranto, M. Ziccheddu, M.A. Spanu, C. Lavorino, M.  
717 Manca, and A.M. Degener. 2000. Polyomavirus persistence in lymphocytes:  
718 prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood  
719 transfusion centre. *The Journal of general virology* 81:1967-1973.

720 Drachenberg, C.B., C.O. Beskow, C.B. Cangro, P.M. Bourquin, A. Simsir, J. Fink, M.R. Weir, D.K.  
721 Klassen, S.T. Bartlett, and J.C. Papadimitriou. 1999. Human polyoma virus in renal  
722 allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. *Human*  
723 *pathology* 30:970-977.

724 Drachenberg, C.B., J.C. Papadimitriou, H.H. Hirsch, R. Wali, C. Crowder, J. Nogueira, C.B.  
725 Cangro, S. Mendley, A. Mian, and E. Ramos. 2004. Histological patterns of  
726 polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *American*  
727 *journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation*  
728 *and the American Society of Transplant Surgeons* 4:2082-2092.

729 Drachenberg, C.B., J.C. Papadimitriou, R. Wali, C.L. Cubitt, and E. Ramos. 2003. BK Polyoma  
730 Virus Allograft Nephropathy: Ultrastructural Features from Viral Cell Entry to Lysis.  
731 *American Journal of Transplantation* 3:1383-1392.

732 Drake III, D.R., M.L. Shawver, A. Hadley, E. Butz, C. Maliszewski, and A.E. Lukacher. 2001.  
733 Induction of Polyomavirus-Specific CD8+T Lymphocytes by Distinct Dendritic Cell  
734 Subpopulations. *Journal of Virology*

735 Drummond, J.E., K.V. Shah, and A.D. Donnenberg. 1985. Cell-mediated immune responses to  
736 BK virus in normal individuals. *J Med Virol* 17:237-247.

737 Egli, A., L. Infanti, A. Dumoulin, A. Buser, J. Samaridis, C. Stebler, R. Gosert, and H.H. Hirsch.  
738 2009. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy  
739 blood donors. *J Infect Dis* 199:837-846.

740 Eriksson, M., K. Andreasson, J. Weidmann, K. Lundberg, K. Tegerstedt, T. Dalianis, and T.  
741 Ramqvist. 2011. Murine Polyomavirus Virus-Like Particles Carrying Full-Length Human  
742 PSA Protect BALB/c Mice from Outgrowth of a PSA Expressing Tumor. *PLoS ONE* 6:

743 Ewers, H., W. Romer, A.E. Smith, K. Bacia, S. Dmitrieff, W. Chai, R. Mancini, J. Kartenbeck, V.  
744 Chambon, L. Berland, A. Oppenheim, G. Schwarzmann, T. Feizi, P. Schwille, P. Sens, A.  
745 Helenius, and L. Johannes. 2010. GM1 structure determines SV40-induced membrane  
746 invagination and infection. *Nat Cell Biol* 12:11-18; sup pp 11-12.

747 Fangmann, J., C. Wegmann, A. Hoppe, P. Martin, U. Sack, J. Harms, S. Faber, and F. Emmrich.  
748 2007. Characterization of dendritic cell subsets in patients undergoing renal  
749 transplantation. *Transplantation proceedings* 39:3101-3104.

750 Flaegstad, T., T. Traavik, and B.E. Kristiansen. 1986. Age-dependent prevalence of BK virus IgG  
751 and IgM antibodies measured by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *The*  
752 *Journal of hygiene* 96:523-528.

753 Ganschow, R., M. Lyons, M.J. Kemper, and M. Burdelski. 2001. B-cell dysfunction and  
754 depletion using mycophenolate mofetil in a pediatric combined liver and kidney graft  
755 recipient. *Pediatric transplantation* 5:60-63.

756 Gardner, S.D., A.M. Field, D.V. Coleman, and B. Hulme. 1971. New human papovavirus (B.K.)  
757 isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*

758 Gedvilaite, A., D.C. Dorn, K. Sasnauskas, G. Pecher, A. Bulavaite, R. Lawatscheck, J. Staniulis, T.  
759 Dalianis, T. Ramqvist, G. Schönrich, M.J. Raftery, and R. Ulrich. 2006. Virus-like particles  
760 derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their  
761 ability to induce maturation in human dendritic cells. *Virology* 354:252-260.

762 Geijtenbeek, T.B.H., D.S. Kwon, R. Torensma, S.J. van Vliet, G.C.F. van Duijnhoven, J. Middel,  
763 I.L.M.H.A. Cornelissen, H.S.L.M. Nottet, V.N. Kewal-Ramani, D.R. Rittman, C.G. Fidgor,  
764 and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that  
765 Enhances trans-Infection of T Cells - ScienceDirect. *Cell* 100:587-597.

766 Hackstein, H., F.C. Renner, A. Bohnert, A. Nockher, T. Frommer, G. Bein, and R. Weimer. 2005.  
767 Dendritic cell deficiency in the blood of kidney transplant patients on long-term  
768 immunosuppression: results of a prospective matched-cohort study. *American journal*  
769 *of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the*  
770 *American Society of Transplant Surgeons* 5:2945-2953.

771 Halary, F., A. Amara, H. Lortat-Jacob, M. Messerle, T. Delaunay, C. Houlès, F. Fieschi, F.  
772 Arenzana-Seisdedos, J.-f. Moreau, and J. Déchanet-Merville. 2002. Human  
773 Cytomegalovirus Binding to DC-SIGN Is Required for Dendritic Cell Infection and Target  
774 Cell trans-Infection. *Immunity* 17:653-664.

775 Haspot, F., A. Lavault, C. Sinzger, K. Laib Sampaio, Y.-D. Stierhof, P. Pilet, C. Bressolette-Bodin,  
776 and F. Halary. 2012. Human Cytomegalovirus Entry into Dendritic Cells Occurs via a  
777 Macropinocytosis-Like Pathway in a pH-Independent and Cholesterol-Dependent  
778 Manner. *PLoS ONE* 7:e34795.

779 Heritage, J., P.M. Chesters, and D.J. McCance. 1981. The persistence of papovavirus BK DNA  
780 sequences in normal human renal tissue. *Journal of Medical Virology* 8:143-150.

781 Hesselink, D.A., L.M. Vaessen, W.C. Hop, W. Schoordijk, J.N. Ijzermans, C.C. Baan, and W.  
782 Weimar. 2005. The effects of renal transplantation on circulating dendritic cells.  
783 *Clinical and experimental immunology* 140:384-393.

784 Hirsch, H.H. 2002. Polyomavirus BK Nephropathy: A (Re-)emerging Complication in Renal  
785 Transplantation. *American Journal of Transplantation* 2:25-30.

786 Hirsch, H.H., W. Knowles, M. Dickenmann, J. Passweg, T. Klimkait, M.J. Mihatsch, and J.  
787 Steiger. 2002. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy  
788 in renal-transplant recipients. *The New England journal of medicine* 347:488-496.

789 Hirsch, H.H., and P. Randhawa. 2013. BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation.  
790 *American Journal of Transplantation* 13:179-188.

791 Hurdiss, D.L., E.L. Morgan, R.F. Thompson, E.L. Prescott, M.M. Panou, A. Macdonald, and N.A.  
792 Ranson. 2016. New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of  
793 BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure* 24:528-536.

794 Jeffers, L.K., V. Madden, and J. Webster-Cyriaque. 2009. BK virus has tropism for human  
795 salivary gland cells in vitro: implications for transmission. *Virology* 394:183-193.

796 Jiang, M., J.R. Abend, B. Tsai, and M.J. Imperiale. 2008. Early Events during BK Virus Entry and  
797 Disassembly. *Journal of Virology* 83:1350-1358.

798 Karnell, J.L., F.G. Karnell, 3rd, G.L. Stephens, B. Rajan, C. Morehouse, Y. Li, B. Swerdlow, M.  
799 Wilson, R. Goldbach-Mansky, C. Groves, A.J. Coyle, R. Herbst, and R. Ettinger. 2011.  
800 Mycophenolic acid differentially impacts B cell function depending on the stage of  
801 differentiation. *Journal of immunology* 187:3603-3612.

802 Kassianos, A.J., S. Sampangi, X. Wang, K.E. Roper, K. Beagley, H. Healy, and R. Wilkinson. 2012.  
803 Human proximal tubule epithelial cells modulate autologous dendritic cell function.  
804 *Nephrology Dialysis Transplantation* 28:303-312.

805 Kassianos, A.J., X. Wang, S. Sampangi, S. Afrin, R. Wilkinson, and H. Healy. 2015. Fractalkine–  
806 CX3CR1-dependent recruitment and retention of human CD1c+ myeloid dendritic cells  
807 by in vitro–activated proximal tubular epithelial cells. *Kidney International* 87:1153-  
808 1163.

809 Kirkham, M., A. Fujita, R. Chadda, S.J. Nixon, T.V. Kurzchalia, D.K. Sharma, R.E. Pagano, J.F.  
810 Hancock, S. Mayor, and R.G. Parton. 2005. Ultrastructural identification of uncoated  
811 caveolin-independent early endocytic vehicles. *The Journal of cell biology* 168:465-  
812 476.

813 Kuypers, D.R. 2012. Management of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant  
814 recipients. *Nature reviews. Nephrology* 8:390-402.

815 Lindstedt, M., K. Lundberg, and C.A. Borrebaeck. 2005. Gene family clustering identifies  
816 functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells.  
817 *Journal of immunology* 175:4839-4846.

818 Low, J.A., B. Magnuson, B. Tsai, and M.J. Imperiale. 2006. Identification of Gangliosides GD1b  
819 and GT1b as Receptors for BK Virus. *Journal of Virology* 80:1361-1366.

820 Lundmark, R., G.J. Doherty, M.T. Howes, K. Cortese, Y. Vallis, R.G. Parton, and H.T. McMahon.  
821 2008. The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic  
822 pathway. *Current biology : CB* 18:1802-1808.

823 Manel, N., B. Hogstad, Y. Wang, D.E. Levy, D. Unutmaz, and D.R. Littman. 2010. A cryptic  
824 sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* 467:214-  
825 217.

826 Moriyama, T., and A. Sorokin. 2009. BK Virus (BKV): Infection, Propagation, Quantitation,  
827 Purification, Labeling, and Analysis of Cell Entry.

828 Nelson, C.D., D.W. Carney, A. Derdowski, A. Lipovsky, G.V. Gee, B. O'Hara, P. Williard, D.  
829 DiMaio, J.K. Sello, and W.J. Atwood. 2013. A retrograde trafficking inhibitor of ricin and  
830 Shiga-like toxins inhibits infection of cells by human and monkey polyomaviruses. *mBio*  
831 4:e00729-00713.

832 Nickeleit, V., H.H. Hirsch, I.F. Binet, F. Gudat, O. Prince, P. Dalquen, G. Thiel, and M.J. Mihatsch.  
833 1999. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to  
834 manifest disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 10:1080-1089.



835 Nickeleit, V., H.H. Hirsch, M. Zeiler, F. Gudat, O. Prince, G. Thiel, and M.J. Mihatsch. 2000. BK-  
836 virus nephropathy in renal transplants -- tubular necrosis, MHC-class II expression and  
837 rejection in a puzzling game. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15:324-332.

838 Pastrana, D.V., D.C. Brennan, N. Cuburu, G.A. Storch, R.P. Viscidi, P.S. Randhawa, and C.B.  
839 Buck. 2012. Neutralization serotyping of BK polyomavirus infection in kidney  
840 transplant recipients. *PLoS pathogens* 8:e1002650.

841 Randhawa, P.S., S. Finkelstein, V. Scantlebury, R. Shapiro, C. Vivas, M. Jordan, M.M. Picken,  
842 and A.J. Demetris. 1999. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the  
843 allograft kidney. *Transplantation* 67:103-109.

844 Randhawa, P.S., I. Popescu, C. Macedo, A. Zeevi, R. Shapiro, A.N. Vats, and D. Metes. 2006.  
845 Detection of CD8+ T cells sensitized to BK virus large T antigen in healthy volunteers  
846 and kidney transplant recipients. *Human immunology* 67:298-302.

847 Sabharanjak, S., P. Sharma, R.G. Parton, and S. Mayor. 2002. GPI-anchored proteins are  
848 delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent  
849 pinocytic pathway. *Developmental cell* 2:411-423.

850 Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994a. Efficient presentation of soluble antigen by cultured  
851 human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating  
852 factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*  
853 179:1109-1118.

854 Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994b. Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured  
855 Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating  
856 Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *The Journal*  
857 *of Experimental Medicine* 179:1109-1118.

858 Seif, I., G. Khoury, and R. Dhar. 1979. The genome of human papovavirus BKV. *Cell* 18:963-  
859 977.

860 Sharma, M.C., W. Zhou, J. Martinez, L. Krymskaya, T. Srivastava, W. Haq, D.J. Diamond, and  
861 S.F. Lacey. 2006. Cross-reactive CTL recognizing two HLA-A\*02-restricted epitopes  
862 within the BK virus and JC virus VP1 polypeptides are frequent in immunocompetent  
863 individuals. *Virology* 350:128-136.

864 Sundsfjord, A., T. Flaegstad, R. Flo, A.R. Spein, M. Pedersen, H. Permin, J. Julsrud, and T.  
865 Traavik. 1996. BK and JC viruses in human immunodeficiency virus type 1-infected  
866 persons: prevalence, excretion, viremia, and viral regulatory regions. *The Journal of*  
867 *Infectious Diseases* 169:485-490.

868 Sundsfjord, A., A.R. Spein, E. Lucht, T. Flaegstad, O.M. Seternes, and T. Traavik. 1994.  
869 Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory  
870 infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult  
871 patients. *Journal of clinical microbiology* 32:1390-1394.

872 van den Bosch, T.P., N.M. Kannegieter, D.A. Hesselink, C.C. Baan, and A.T. Rowshani. 2017.  
873 Targeting the Monocyte-Macrophage Lineage in Solid Organ Transplantation. *Frontiers*  
874 *in immunology* 8:153.

875 Weimer, R., J. Mytilineos, A. Feustel, A. Preiss, V. Daniel, H. Grimm, M. Wiesel, and G. Opelz.  
876 2003. Mycophenolate mofetil-based immunosuppression and cytokine genotypes:  
877 effects on monokine secretion and antigen presentation in long-term renal transplant  
878 recipients. *Transplantation* 75:2090-2099.

879 Woltman, A.M., J.W. de Fijter, K. Zuidwijk, A.G. Vlug, I.M. Bajema, S.W. van der Kooij, V. van  
880 Ham, and C. van Kooten. 2007. Quantification of dendritic cell subsets in human renal  
881 tissue under normal and pathological conditions. *Kidney International* 71:1001-1008.

882 Womer, K.L., R. Peng, P.R. Patton, M.R. Murawski, M. Bucci, A. Kaleem, J. Schold, P.A. Efron,  
883 A.W. Hemming, T.R. Srinivas, H.U. Meier-Kriesche, B. Kaplan, and M.J. Clare-Salzler.  
884 2005. The effects of renal transplantation on peripheral blood dendritic cells. *Clinical*  
885 *transplantation* 19:659-667.

886 Wright, P.J., and G. Di Mayorca. 1975. Virion polypeptide composition of the human  
887 papovavirus BK: comparison with simian virus 40 and polyoma virus. *J Virol* 15:828-  
888 835.

889 Yapici, U., J. Kers, I. Slavujevic-Letic, G. Stokman, J.J.T.H. Roelofs, M.C. van Aalderen, J.W.  
890 Groothoff, O.J. de Boer, K.A.M.I. van der Pant, N. Claessen, L.B. Hilbrands, F.J.  
891 Bemelman, I.J.M. ten Berge, and S. Florquin. 2015. Intragraft Blood Dendritic Cell  
892 Antigen-1-Positive Myeloid Dendritic Cells Increase during BK Polyomavirus-  
893 Associated Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 27:2502-  
894 2510.

895 Zhao, L., A.T. Marciano, C.R. Rivet, and M.J. Imperiale. 2016. Caveolin- and clathrin-  
896 independent entry of BKPyV into primary human proximal tubule epithelial cells.  
897 *Virology* 492:66-72.

898 Zuidwijk, K., J.W. de Fijter, M.J.K. Mallat, M. Eikmans, M.C. van Groningen, N.N. Goemaere,  
899 I.M. Bajema, and C. van Kooten. 2012. Increased influx of myeloid dendritic cells during  
900 acute rejection is associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy and predicts  
901 poor outcome. *Kidney International* 81:64-75.

902

903

# Figure 1

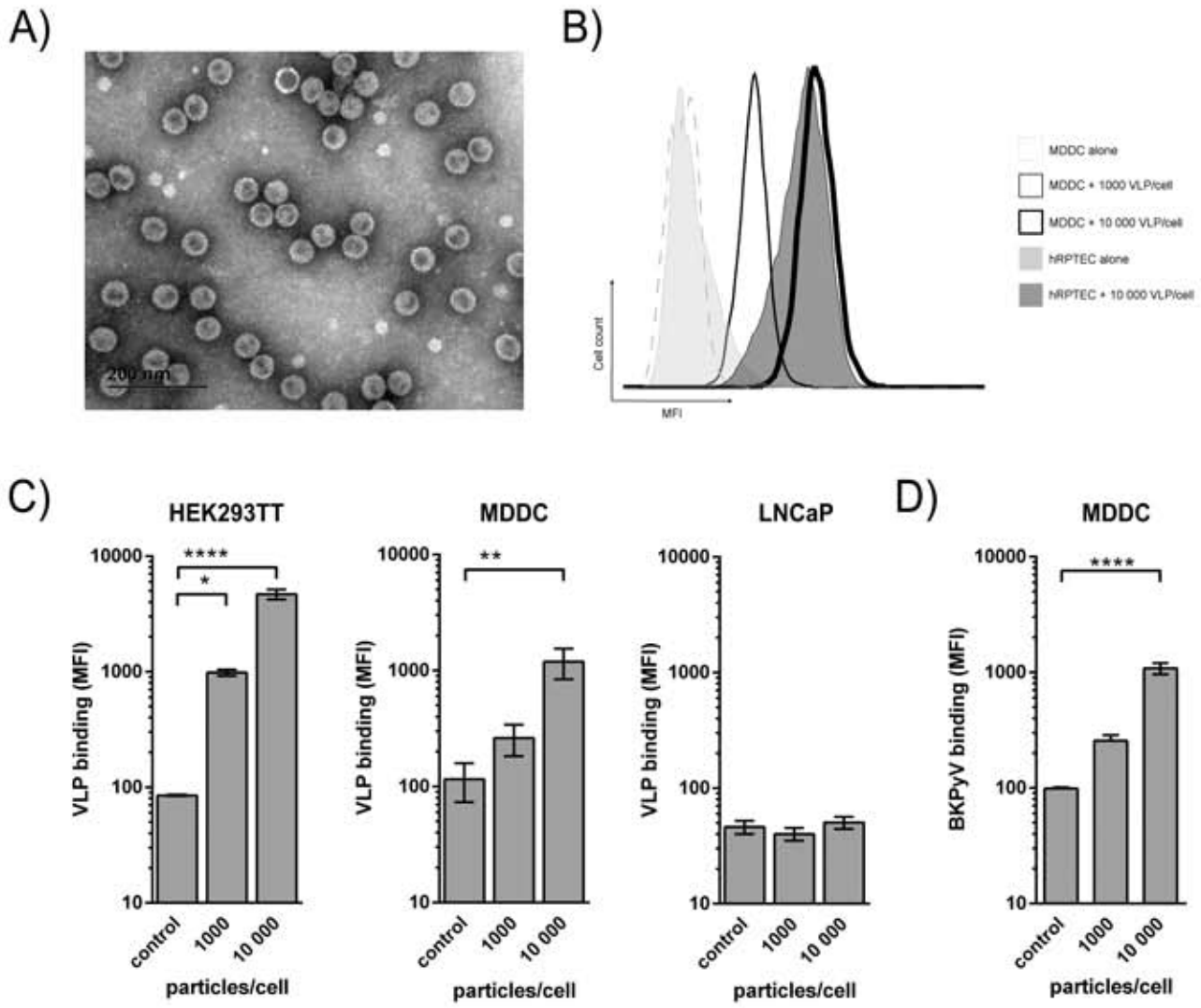


Figure 2

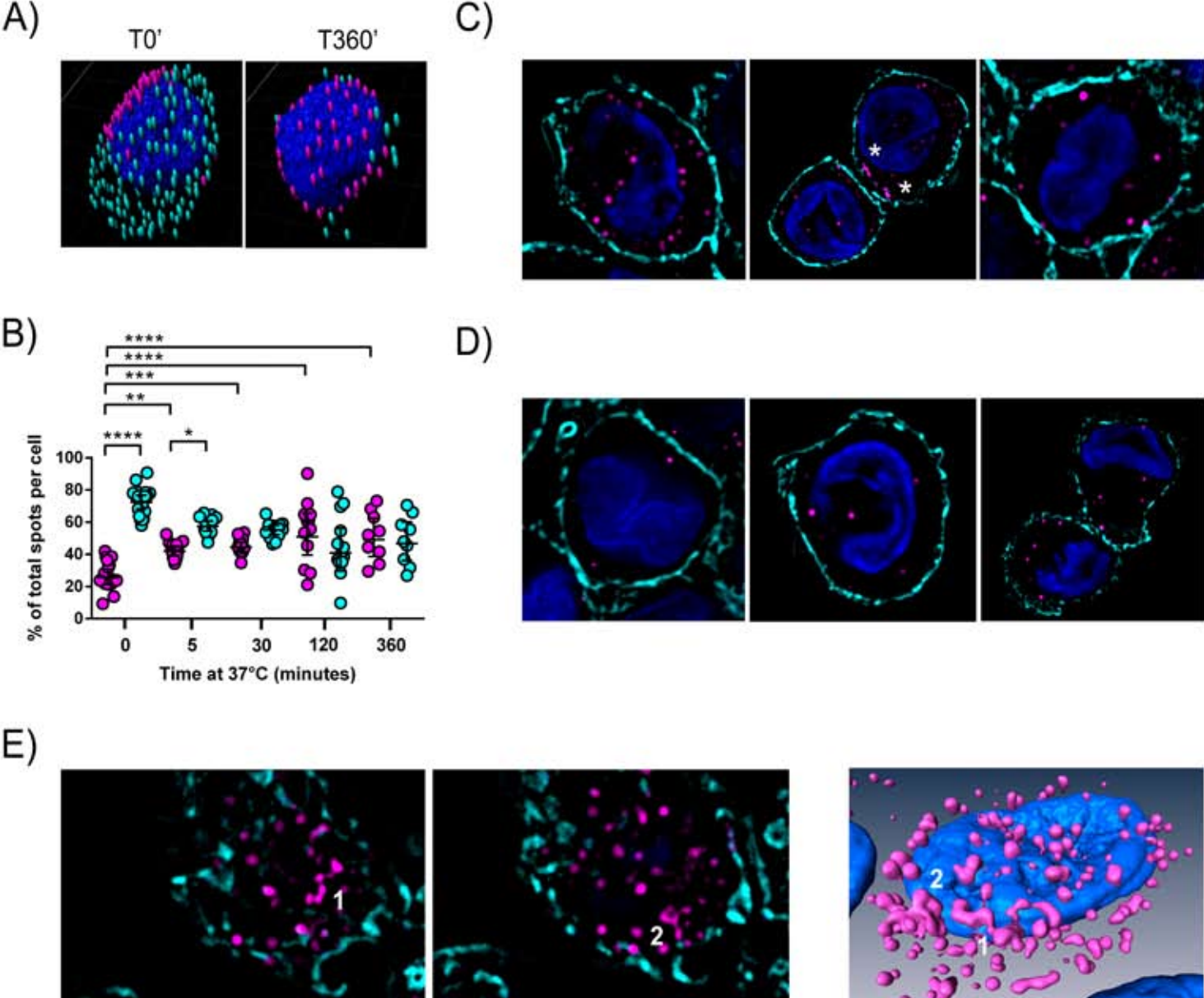


Figure 3

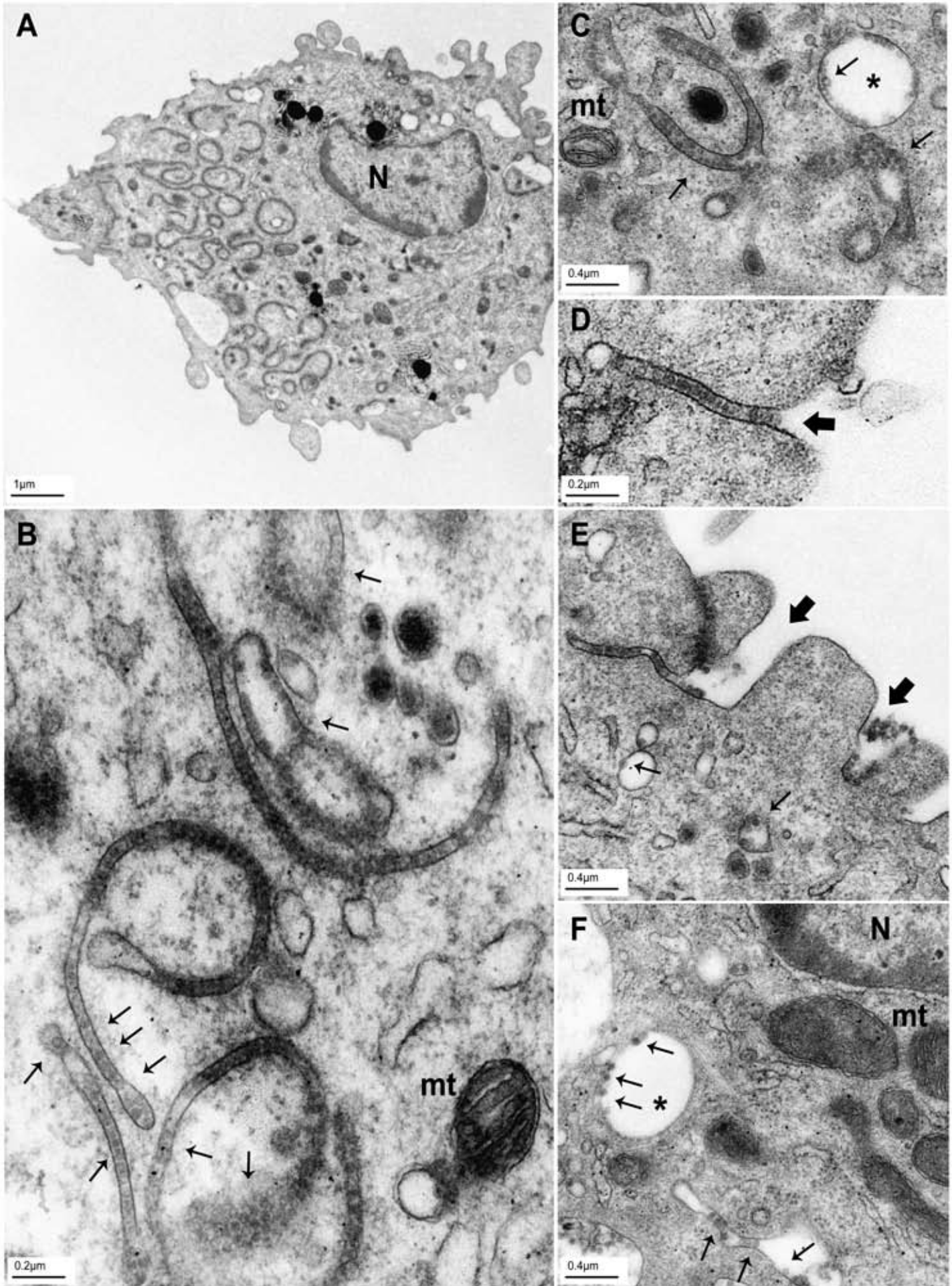




Figure 4

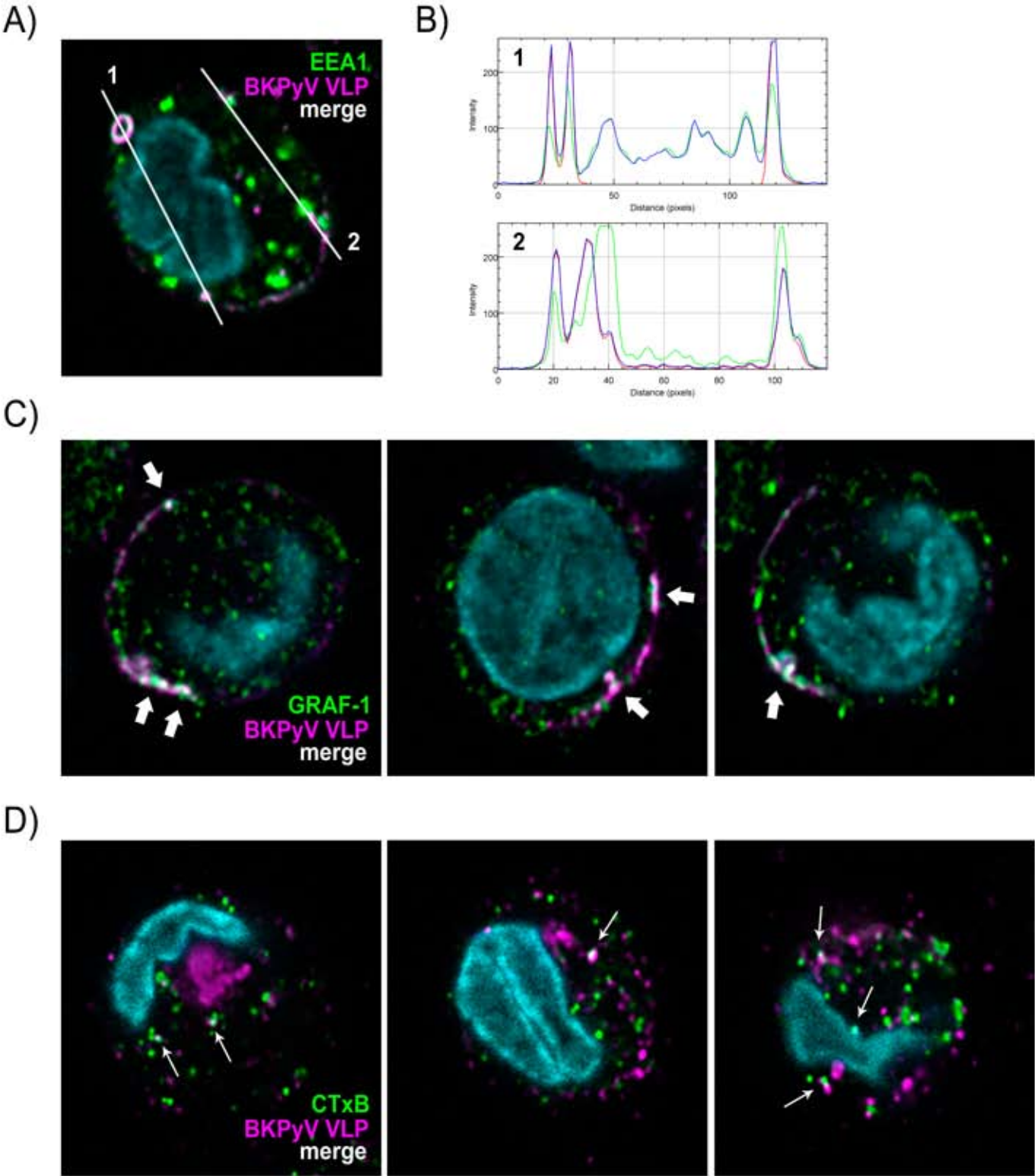
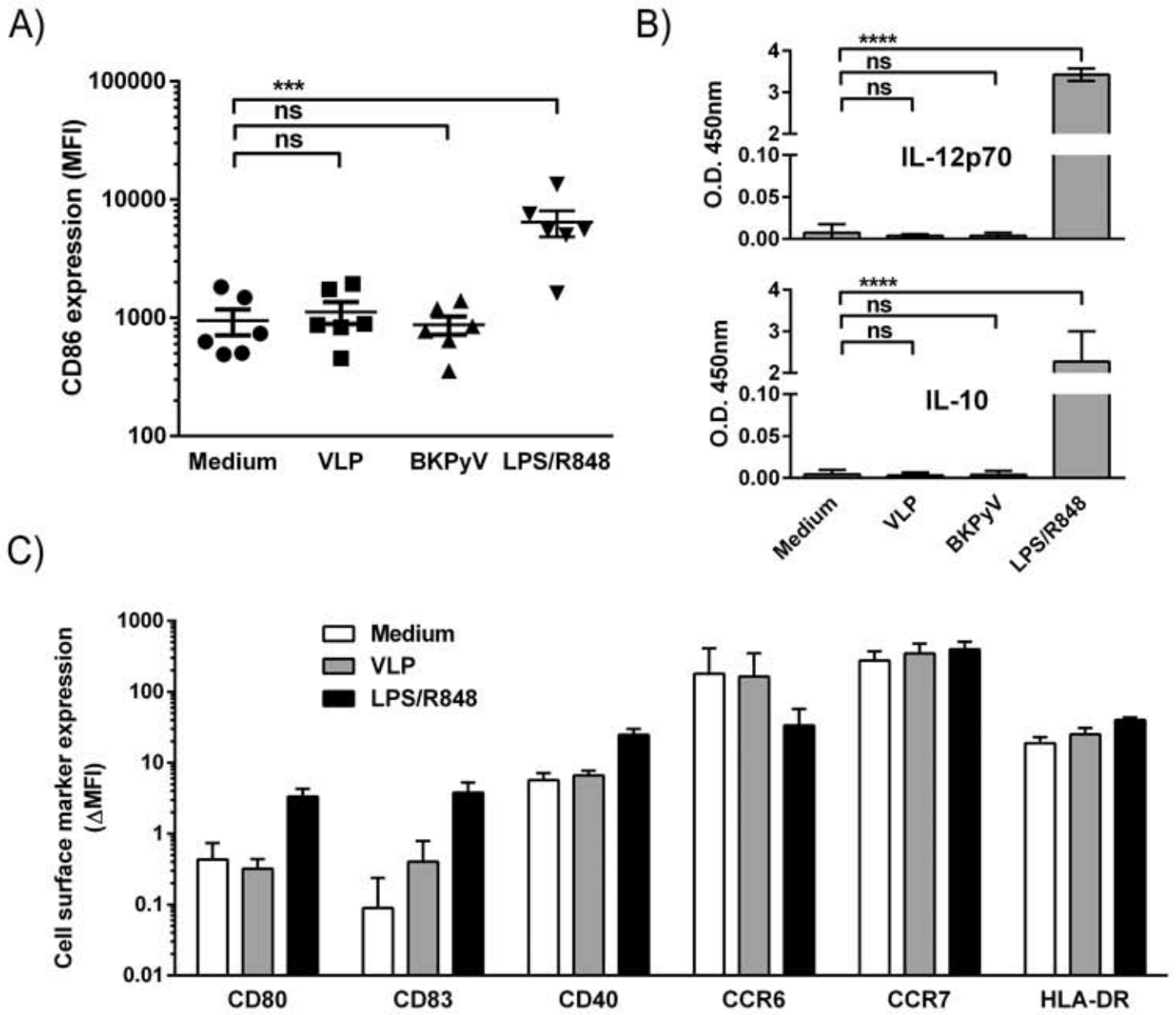


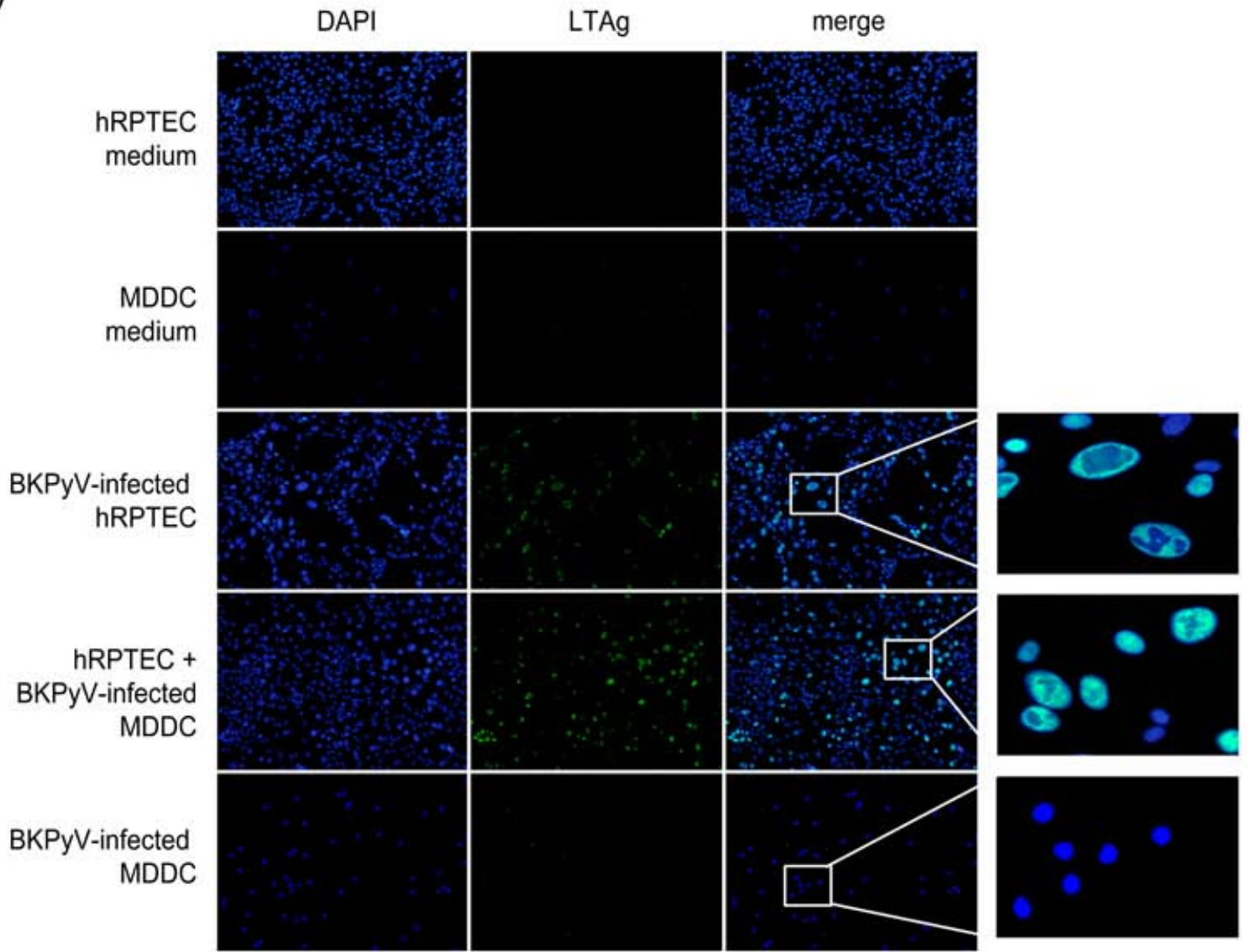
Figure 5





# Figure 6

A)



B)

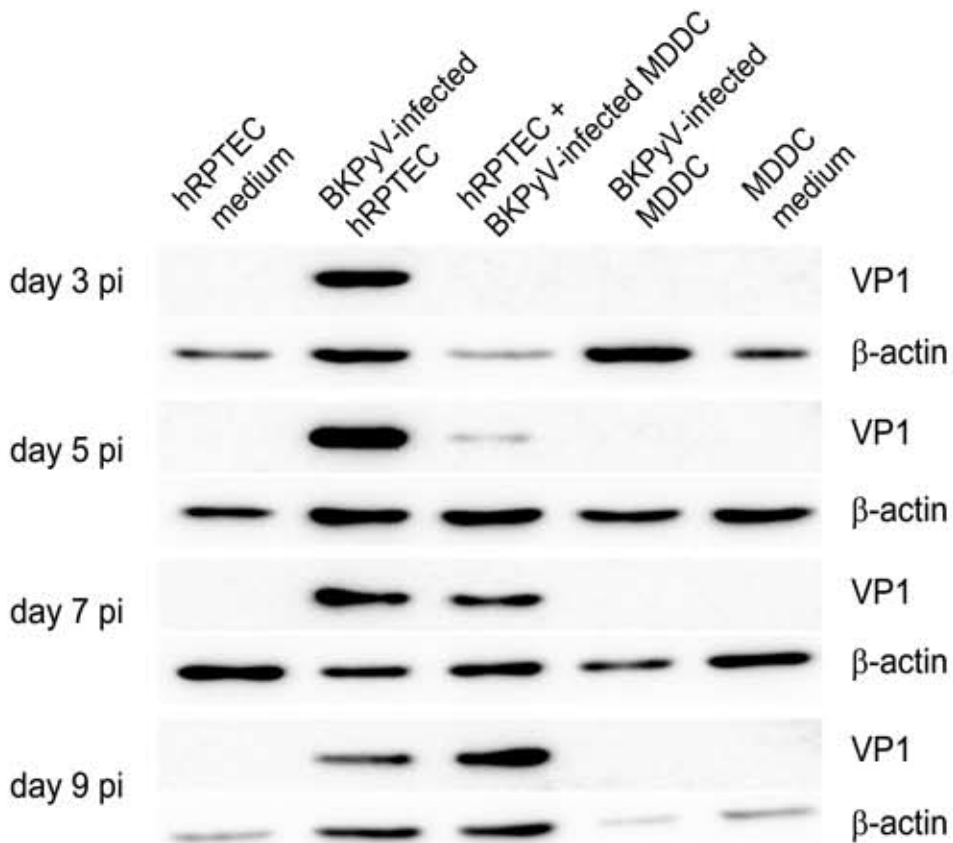


Figure 7

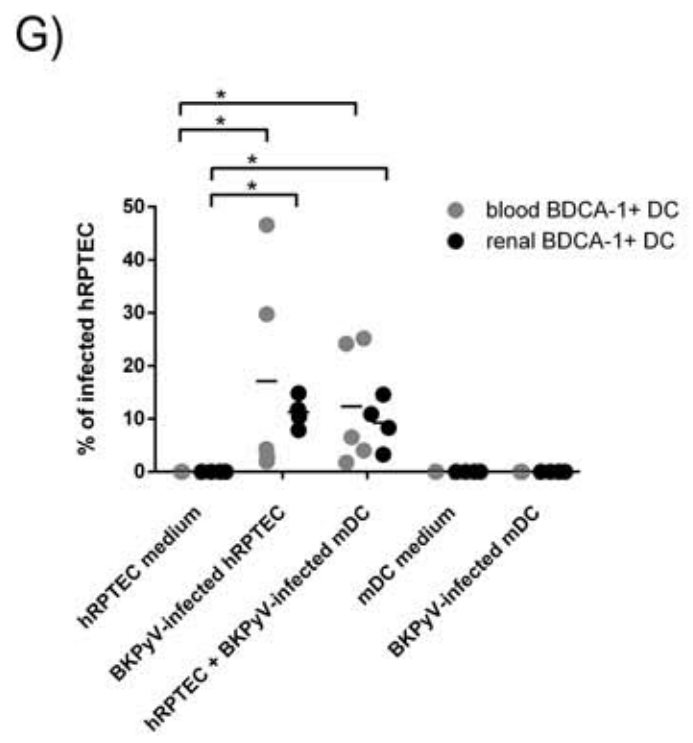
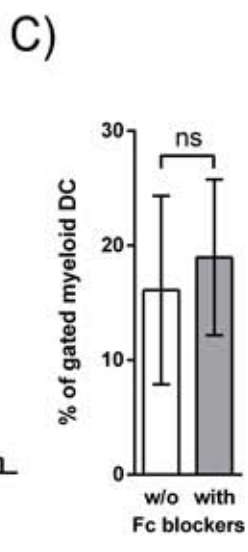
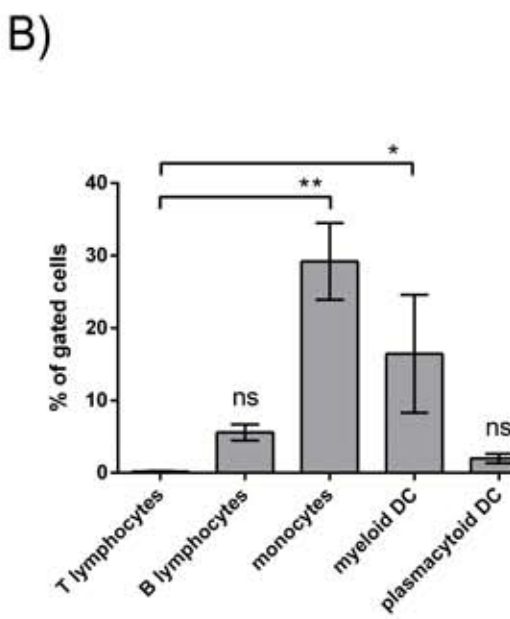
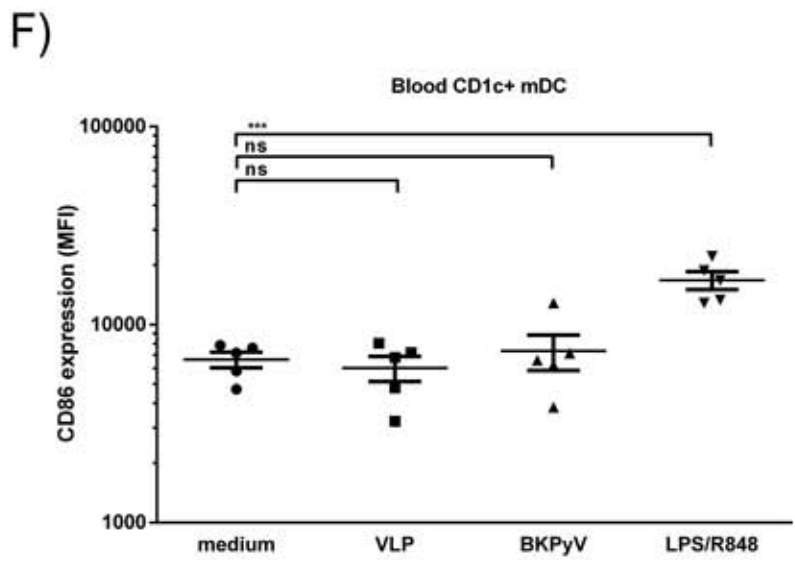
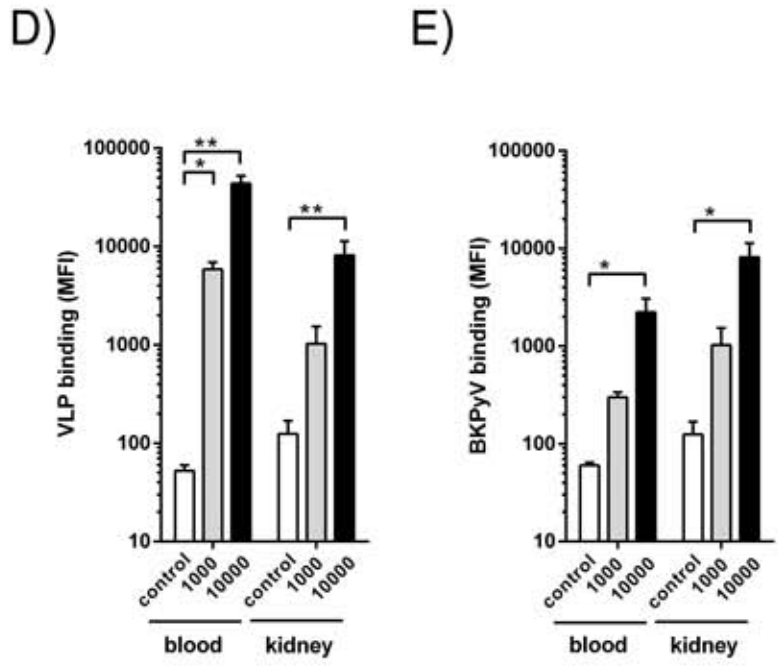
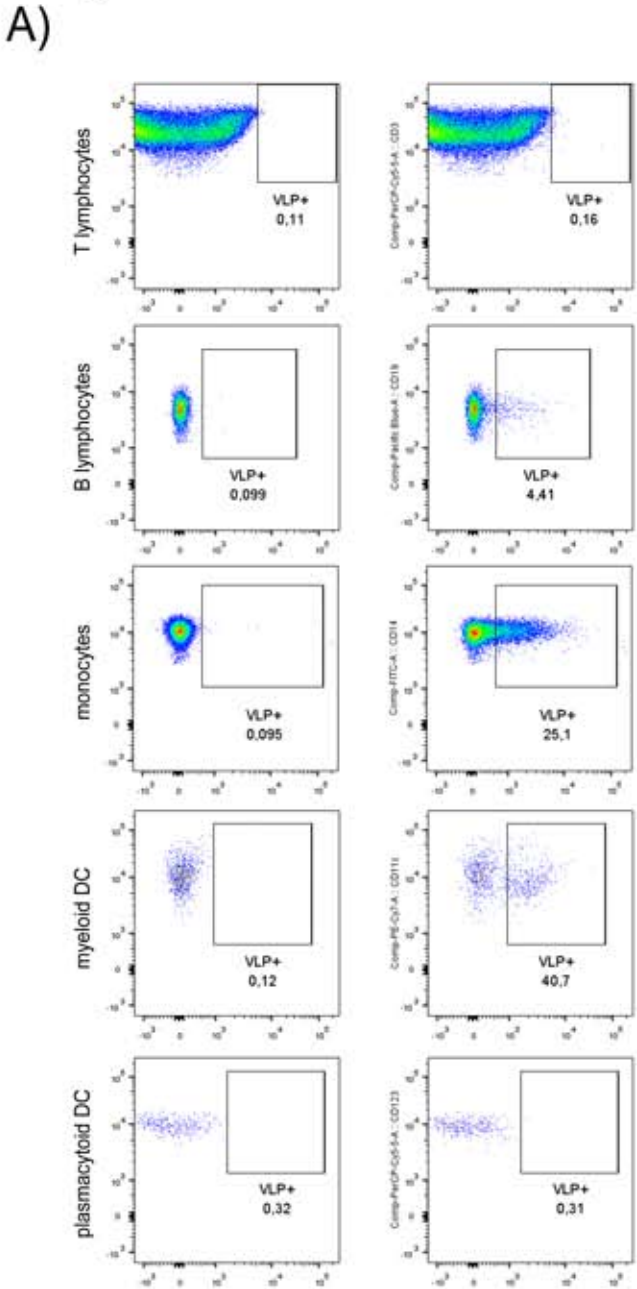
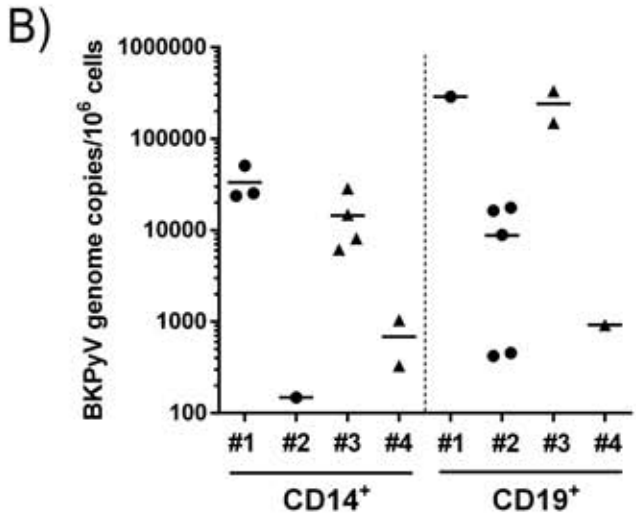
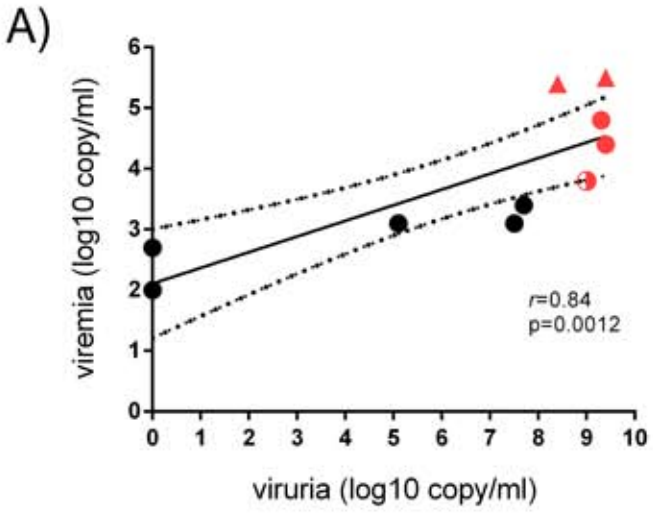


Figure 8



905 **Figure legends**

906 **Figure 1:** MDDC can bind BKPyV particles in a comparable manner to primary human renal  
907 proximal tubular epithelial cells (hRPTEC). (A) Negative contrast transmission electron  
908 microscopy picture of genotype Ib2 BKPyV VLP. A 200nm scale bar is represented on the  
909 micrograph. (B) Representative flow cytometry histograms showing the binding of  
910 fluorescently-labelled Ib2 VLP to MDDC (empty histograms) and hRPTEC (filled histograms).  
911 Human RPTEC autofluorescence was always identical to the one of MDDC shown here (dotted  
912 line histogram). (C) Empty capsids and (D) infectious particles (Dunlop strain) binding to MDDC  
913 (n=5 donors), HEK 293 TT (n=4 experiments) and LNCaP (n=3 experiments) cells assessed by  
914 flow cytometry using Alexa Fluor®647-conjugated particles. Data are represented as MFI ±  
915 SEM. Statistically significant results were marked by one or several asterisks according to the  
916 level of significance: \*=p<0.05, \*\*=p<0.01, \*\*\*\*=p<0.0001; one-way ANOVA with multiple  
917 comparison tests.

918

919 **Figure 2:** BKPyV particles are rapidly endocytosed in MDDC. (A) MDDC were incubated with  
920 104 Alexa Fluor®647 coupled-VLP per cell during one hour at 4°C, washed and incubated at  
921 37°C during the indicated times. Cells were then fixed and stained with DAPI to reveal nuclei.  
922 Time zero (T0') represents cells that have been fixed right after the one hour incubation with  
923 VLP and washes to remove unbound VLP. Image stacks were obtained with a Nikon A1  
924 confocal microscope and treated with the Imaris software. Figure 2A shows representative  
925 analyzed cells containing VLP located above (light blue dots) or below (magenta dots) 500nm  
926 arbitrary distance from the nuclear surface (dark blue=DAPI). (B) Quantification from the  
927 Imaris analysis on isolated cells; each dot on the graph represents one analyzed cell (T0': n=21;  
928 T5': n=17; T30': n=16; T120': n=15; T360': n=11). The Y axis indicates incubation times at 37°C

929 after removing excess of VLP. Statistically significant results were marked by one or several  
930 asterisks according to the level of significance: \*=p<0.05, \*\*=p<0.01, \*\*\*=p<0.001,  
931 \*\*\*\*=p<0.0001; one-way ANOVA with multiple comparison tests. (C) Confocal images of  
932 endocytosed Alexa Fluor®647 coupled-VLP (panels show three independent cells) or (D) -  
933 BKPyV particles both at 104 particles/cell after 30 minutes at 37°C (magenta). Cellular  
934 membranes were stained with fluorescence-labelled WGA (Alexa Fluor®488 displayed in light  
935 blue) and nuclei were counterstained with DAPI. High resolution confocal images were  
936 obtained from the A1 Nikon microscope equipped with a SIM module. Asterisks indicate tube-  
937 shaped structures. (E) Confocal sections of the same cell showing two tubular structures  
938 containing fluorescence-labelled VLP (marked by 1 and 2). The right panel of this figure is a  
939 surface-rendered reconstruction of the same cell showing the same tubular structures (1 and  
940 2) in 3D.

941

942 **Figure 3:** Transmission Electron Microscopy reveals the BKPyV endocytosis into large vesicles  
943 and tubule-shaped endosomes in MDCC. Micrographs showing ultrathin sections of MDCC  
944 incubated for 30 minutes at 37°C with 104 fluorescent VLP (A, B, C, D and E) or BKPyV/cell (F).  
945 (A) A general view of a representative cell containing dense tubular structures on the left part  
946 of the cell. (B and C) Pleiomorphous or large round vesicles containing VLP are shown at a  
947 higher magnification. (D and E) Micrographs showing VLP internalization from the cell surface  
948 into tube-shaped endosomes. (F) BKPyV particles endocytosed in large vesicles or  
949 pleiomorphous endosomes in a MDCC. Thin and bold arrows indicate particles and tube  
950 formation respectively; asterisk indicate large vesicles resembling macropinosomes.  
951 N=nucleus; mt=mitochondria.

952

953 **Figure 4:** BKPyV particles colocalize with EEA-1, GRAF-1 and CTxB in MDDC revealing an  
954 unconventional endocytosis pathway. (A) Confocal sections of MDDC incubated for 30  
955 minutes at 37°C with 104 fluorescent VLP/cell (magenta). EEA-1-positive endocytic vesicles  
956 were stained after fixation (green). Nuclei were counterstained with DAPI (light blue). The  
957 colocalization between VLP and EEA-1 is shown in white. (B) RGB profiles along two  
958 measurement lines (1 and 2, showed in Figure 3A) analyzed with the ImageJ software.  
959 Colocalization is represented by merging blue, red (=magenta or VLP) and green histograms  
960 (1 pixel=88nm). (C) and (D) show respectively colocalization of BKPyV VLP with the GRAF-1  
961 marker (bold white arrows) and Alexa Fluor®555-conjugated cholera toxin subunit B (CTxB;  
962 2µg/mL; thin white arrows). Deconvoluted images are presented here. Displayed data are  
963 representative of three independent experiments.

964

965 **Figure 5:** Neither BKPyV infectious particles nor VLP can activate human MDDC. (A) CD86 cell  
966 surface expression was assessed by flow cytometry on immature MDDC (circles) or cultured  
967 with VLP (squares; 1.103 particles per cells), BKPyV particles (triangles; *ibid*) or a TLR agonist  
968 cocktail (inverted triangles; 100ng/mL LPS and 1µg/mL R848); n=6 distinct blood donors). (B)  
969 ELISA titration of IL-10 and IL-12p70 in the supernatants of immature or cultivated MDDC with  
970 VLP, BKPyV particles or R848/LPS (doses were similar to those employed in Figure 4A) shown  
971 as optical density (OD) at 450nm. (C) Cell surface expression of CD80, CD83, CD40, CCR6, CCR7  
972 and the HLA-DR on MDDC alone (empty bars) or cultured for 24 hours with VLP (grey bars;  
973 103 particles per cells) or LPS/R848 (black bars). Data are represented as MFI ± SEM. For each  
974 MFI, background, i.e. autofluorescence, was subtracted to calculate  $\Delta$  MFI values displayed in  
975 this figure; n=3 except for the HLA-DR staining with n=2 (no statistical test available for this  
976 figure). Statistically significant results were marked by one or several asterisks according to

977 the level of significance: ns=non-significant, \*=p<0.05, \*\*=p<0.01, \*\*\*=p<0.001,  
978 \*\*\*\*=p<0.0001; one-way ANOVA with multiple comparison tests.

979

980 **Figure 6:** MDDC are not permissive to BkPyV but mediate its transmission to primary hRPTEC.

981 (A) Epifluorescence microscope images (x10 magnification) showing large T antigen (LTag)  
982 immunostaining (green) of hRPTEC and/or MDDC in various conditions (displayed as rows),  
983 respectively: hRPTEC alone (medium; non infected), MDDC alone (ibid), BkPyV-infected  
984 hRPTEC (MOI=0.1), non-infected hRPTEC covered by BkPyV-infected MDDC (MOI=0.1; excess  
985 of virus, i.e. unbound virus, was removed by extensive washes) and BkPyV-infected MDDC.  
986 For the last three conditions, insets showing higher magnifications are displayed (x40  
987 magnification). Nuclei were counterstained with DAPI. (B) Western blot analysis of VP1  
988 expression, as a late BkPyV infection event, in cell lysates resulting from identical culture  
989 conditions as presented above. Stripped nitrocellulose membranes were subsequently  
990 incubated to reveal the  $\beta$ -actin as a loading control. Figures 5A and 5B are representative of  
991 three independent experiments.

992

993 **Figure 7:** Non permissive blood and kidney CD1c+ myeloid DC bind and transmit BkPyV to

994 primary hRPTEC. (A) Whole blood of healthy volunteers was incubated with 2.5 $\mu$ g/mL of Alexa  
995 Fluor<sup>®</sup>647 coupled-VLP or the same volume of PBS during 45 minutes at 4°C. Excess of VLP  
996 was removed by extensive washes. VLP binding was then assessed by flow cytometry on  
997 monocytes (CD14+), B (CD19+) and T (CD3+) lymphocytes, myeloid (CD11c+ in CD45+, HLA-  
998 DR+, Lin- cells) and plasmacytoid DC (CD123+ in CD45+, HLA-DR+, Lin- cells). The gating  
999 strategy is reported in the Supplementary Figure 2. Representative dot plots showing the VLP  
1000 binding on whole blood cell subsets. Percentages of stained cells are displayed in each dot

1001 plot. (B) Quantitative analysis of VLP binding to whole blood cell subsets (similar to Figure 6A;  
1002 n=4). Mean percentages for each subset are displayed  $\pm$  SEM. (C) Comparison of the VLP  
1003 binding abilities of myeloid blood DC with or w/o Fc receptor blockers in whole blood (Miltenyi  
1004 Biotech) (n=4). (D) Assessment of the VLP binding to freshly isolated blood or kidney CD1c+  
1005 DC at 103 (light grey bars) and 104 particles/cell (black bars) by flow cytometry. Results are  
1006 shown as MFI  $\pm$  SEM (n=4). (E) Flow cytometric analysis of fluorescence-labelled BKPyV  
1007 particles binding to freshly isolated blood or kidney CD1c+ DC, i.e. from healthy blood donors  
1008 and healthy parts, at least macroscopically, of resected human tumor-bearing kidneys. From  
1009 the left to the right, histograms show binding with no virus (empty bars), that is the “control”  
1010 condition, and 103 (light grey) and 104 particles/cell (black bars) (n=4). (F) CD86 cell surface  
1011 expression was assessed by flow cytometry on freshly isolated blood CD1c+ DC cultured for  
1012 24 hours in medium alone (circles) or with VLP (squares; 103 particles per cells), BKPyV  
1013 particles (triangles; *ibid*) or with LPS/R848 (inverted triangles; 100ng/mL LPS and 1 $\mu$ g/mL  
1014 R848); n=4 distinct blood donors. (G) Purified blood (grey circles) or kidney (black circles)  
1015 CD1c+ DC trans-infection capacities were evaluated as already done in the Figure 5A. Briefly,  
1016 the percentages of LTA<sub>g</sub>+ cells were obtained from a semi-automated counting method  
1017 already presented elsewhere within total cells, i.e. DAPI counterstained nuclei (Haspot et al.,  
1018 2012). The gating/purification strategies are detailed in the Supplementary Figure 3. Data are  
1019 represented as MFI  $\pm$  SEM. Statistically significant results are marked by an asterisk; \*= $p$ <0.05,  
1020 \*\*= $p$ <0.01, \*\*\*= $p$ <0.001; one-way ANOVA with multiple comparison tests.

1021

1022 **Figure 8:** BKPyV genomes are detected in the CD14+ and CD19+ fractions in PBMC of kidney  
1023 transplanted patients with high and sustained viremia. (A) Dot plot showing viruria vs viremia  
1024 (log<sub>10</sub> copy/ml) for patients analyzed in this study and presenting a latent (n=3) and an active



1025 (n=7) BKPyV infection. Dotted lines indicate the 95% confidence interval. The linear regression  
1026 line and the Pearson's r shown on the graph were determined with the GraphPad Prism  
1027 software. Red triangles indicate patients with a proven PVAN while red symbols indicate  
1028 patients with BKPyV DNA in their CD14+ and CD19+ fractions of PBMC. The half-colored circle  
1029 (red and white) represents the patient with only BKPyV DNA in CD19+ fraction (see Table 2).  
1030 (B) BKPyV genome copy values determined by qPCR (copies/10<sup>6</sup> cells) in CD14+ and CD19+  
1031 fractions of four kidney transplant patients with a sustained viremia. #1 to #4 refer patients'  
1032 ID (see Tables 1 and 2). Triangles represent samples of PVAN patients. Data are shown as  
1033 replicates of the tested samples; n is ranging from one to four.

**Table 1: Clinical data of kidney transplant patients analyzed in this study**

Patients ID	LIMA	MAMA	MOCH	BEYA	SOAL	SEMI	MARO (#1)	BAGA (#2)	ALGA (#3)	DAJE (#4)
KTx date	11/12/2011	11/25/2011	12/28/2010	11/27/2009	03/16/2009	10/14/2011	04/04/2016	04/29/2012	05/15/2017	04/28/2012
Induction therapy	ATG <sup>a</sup>	basiliximab	ATG	basiliximab	basiliximab	ATG	basiliximab	ATG	ATG	ATG
Rejection episode(s)	acute AMR <sup>b</sup>	no	no	no	acute TCMR <sup>c</sup>	no	no	no	acute TCMR <sup>c</sup>	no
First positive viruria (months post-graft)	none	none	none	3	6	0,6	3,3	10	1	1
First positive viremia (months post-graft)	nd	nd	nd	3	6	1,2	6,4	10	3	1
Blood sampling after graft (months)	2	2	8	13	19	9	17,8	13	3	6
<b>Viruria at time of sampling (log10 cop/ml)</b>	<b>negative</b>	<b>negative</b>	<b>negative</b>	<b>5,1</b>	<b>7,5</b>	<b>9</b>	<b>9,4</b>	<b>9,3</b>	<b>8,4</b>	<b>9,4</b>
<b>Viremia at time of sampling (log10 cop/ml)</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>	<b>nd</b>	<b>3,1</b>	<b>3,1</b>	<b>3,8</b>	<b>4,4</b>	<b>4,8</b>	<b>5,4</b>	<b>5,5</b>
<b>BKPyV infection status</b>	<b>latent</b>	<b>latent</b>	<b>latent</b>	<b>active</b>	<b>active</b>	<b>active</b>	<b>active</b>	<b>active</b>	<b>active</b>	<b>active</b>
<b>At the time of sampling:</b>										
<b>IS therapy</b>										
<i>Tacrolema (ng/ml)</i>	13,3	8,7	12,6	8,4	no	5,4	4,7	6,2	9,2	9
<i>Ciclosporin A blood level (ng/ml)</i>	no	no	no	no	391	no	no	no	no	no
<i>Mycophenolate mofetil (mg/d)</i>	2000	1000	MPO <sup>d</sup> , 720	no	1500	no	MPO <sup>d</sup> , 360	1000	no	no
<i>Corticosteroids (mg/d)</i>	10	no	10	5	60	5	no	no	10	15
<b>Blood cell count:</b>										
<i>WBC (G/L; normal range:5-13)</i>	6,51	6,41	4,9	9,25	12,63	6,09	2,37	7,55	9,28	13,88
<i>Total lymphocytes (G/L; normal range:1.8-7.3)</i>	0,38	3,74	0,76	2,78	1,36	2,29	1,3	1,32	0,88	1,75
<i>Monocytes (G/L; normal range:0.3-1)</i>	0,56	0,08	0,44	0,67	0,64	1	0,19	0,89	0,97	1,26
<i>CD3 (x10e3/ml)</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,169	nd	0,515	1,046
<i>CD4 (x10e3/ml)</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,631	nd	0,334	0,334
<i>CD8 (x10e3/ml)</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,546	nd	0,164	0,651
<b>Creatininemia</b>	352	247	263	159	303	204	135	117	206	243
<b>MDRD<sup>e</sup></b>	12,3	23	28,7	31	18	29	37	68,5	29,4	20
<b>PVAN occurrence, classification</b>	no	no	no	no	no	no	no	no	yes, stB	yes, stB

<sup>a</sup>Thymoglobulins, <sup>b</sup>Antibody-mediated rejection, <sup>c</sup>T-cell mediated rejection, <sup>d</sup>Mycophenolic acid, <sup>e</sup>Creatinine clearance (Cockcroft-Gault method), nd=not determined

1036 **Table 2: Detection of BKPyV DNA in leukocyte subpopulations from kidney transplant patients with sustained viremia**

1037

Patients ID	BEYA	SOAL	SEMI	MARO (#1)	BAGA (#2)	ALGA (#3)	DAJE (#4)
<b>Leukocyte subpopulations</b>							
CD3+	-	-	-	-	-	-	-
CD19+	-	-	+	+	+	+	+
CD14+	-	-	-	+	+	+	+
NKp46+	-	-	-	-	-	-	-
mDC	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
pDC	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>

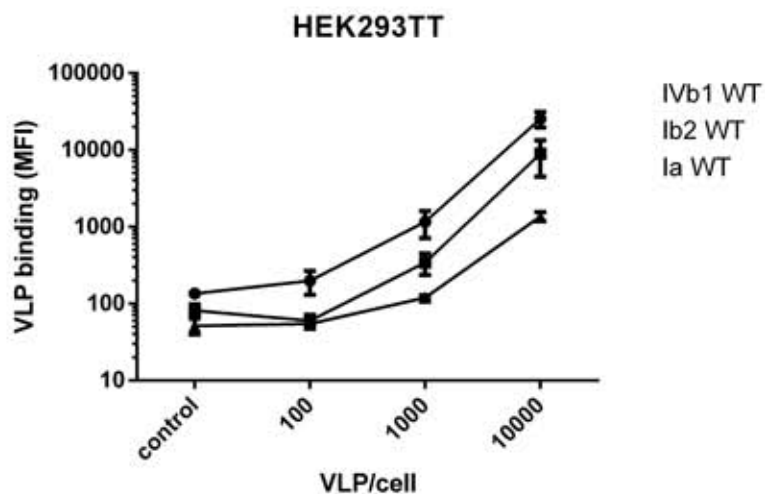
1038 *nd*=not determined

1039

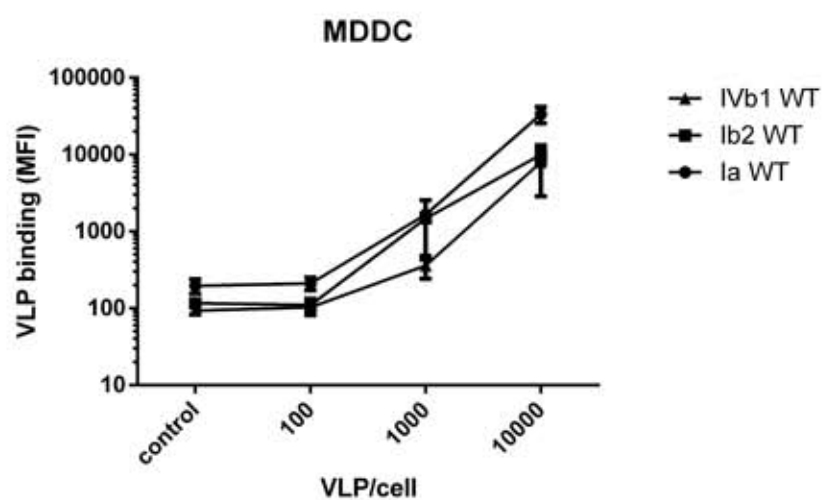
1040

# Supp F1

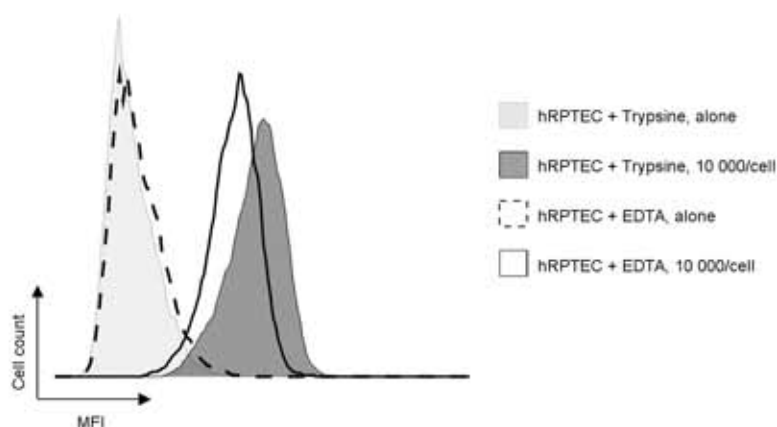
A)



B)

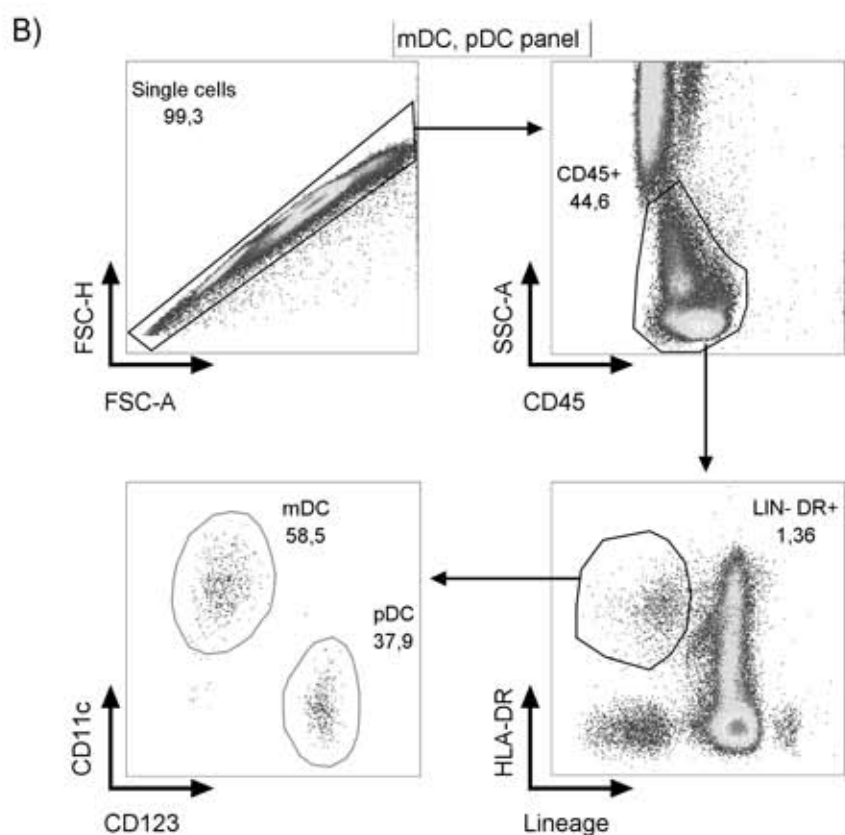
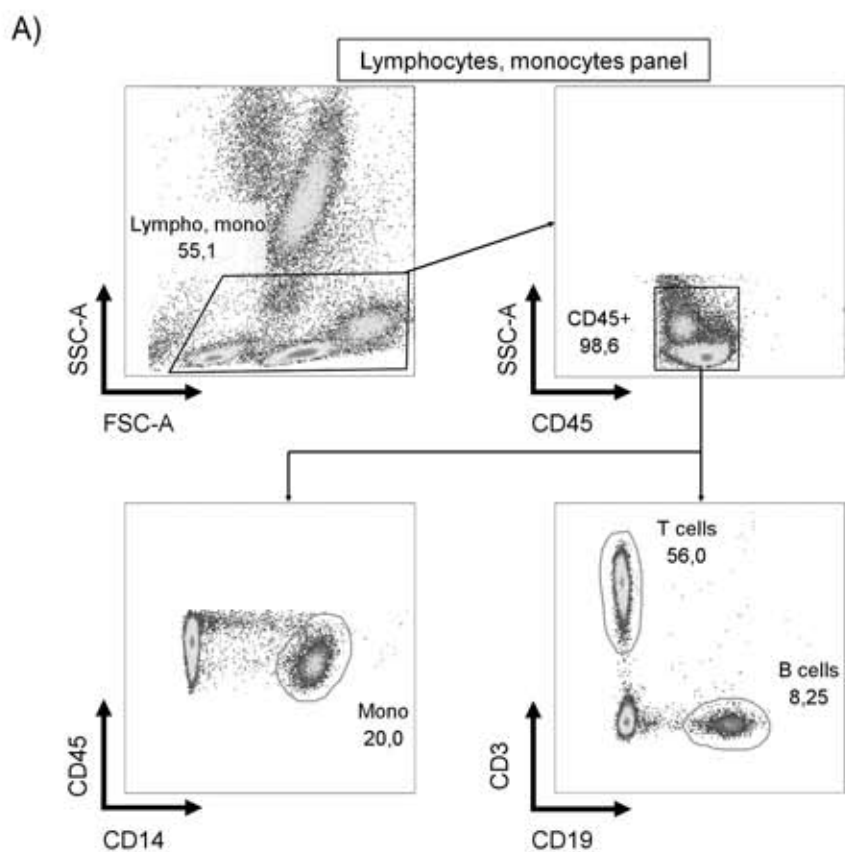


C)



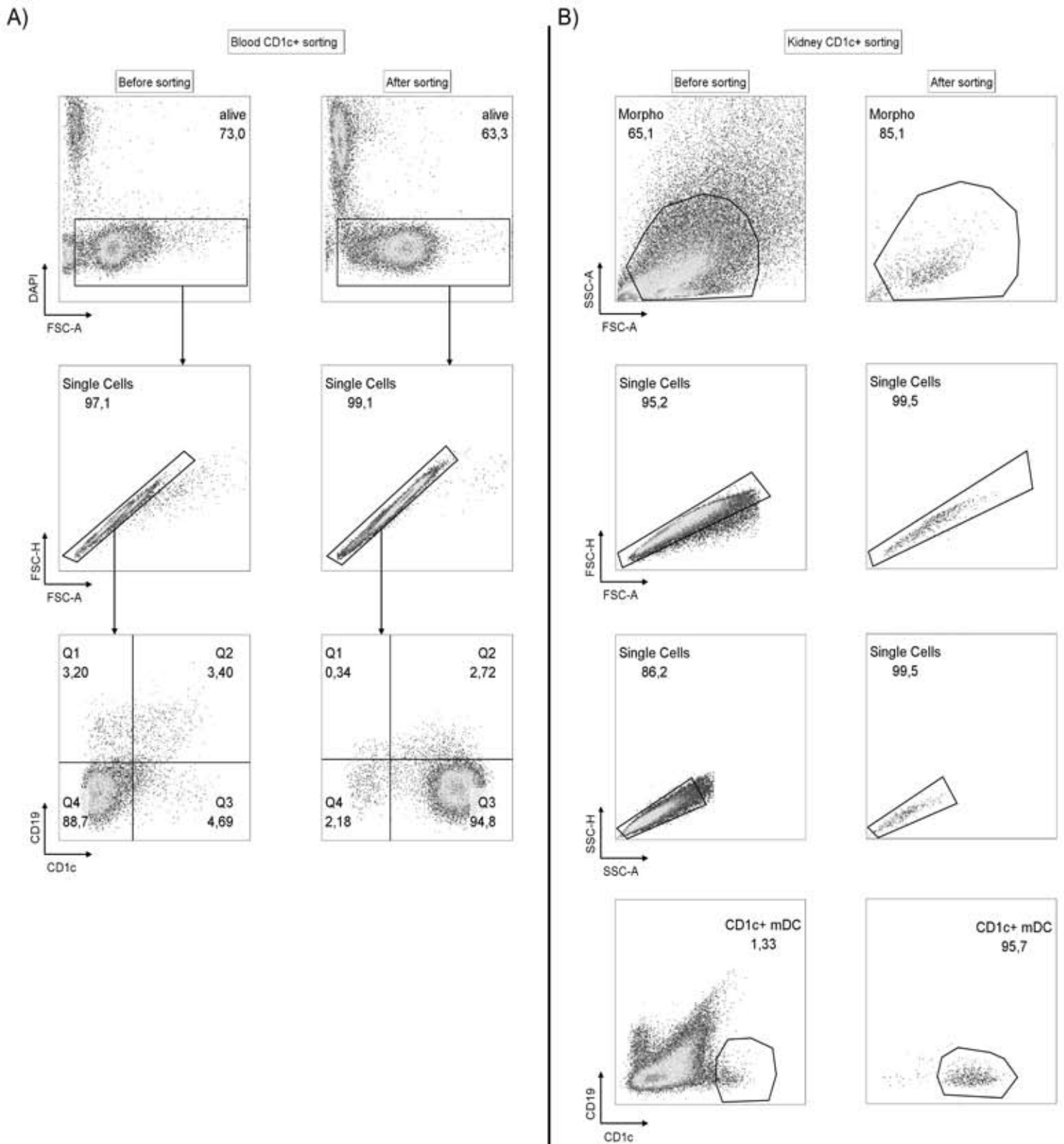
**Supplemental Figure 1: BKPvV VLP bind to HEK293TT cells and MDDC regardless of the genotype and to hRPTEC in trypsin independent manner.** HEK293TT cells (A) and MDDC (B) were incubated with indicated doses of fluorescent VLP one hour at 4°C and binding was measured by flow cytometry. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. (C) hRPTEC were detached from flask with trypsin or 20mM EDTA solution, incubated with 10,000 VLP/cell and binding was assessed by flow cytometry.

# Supp F2



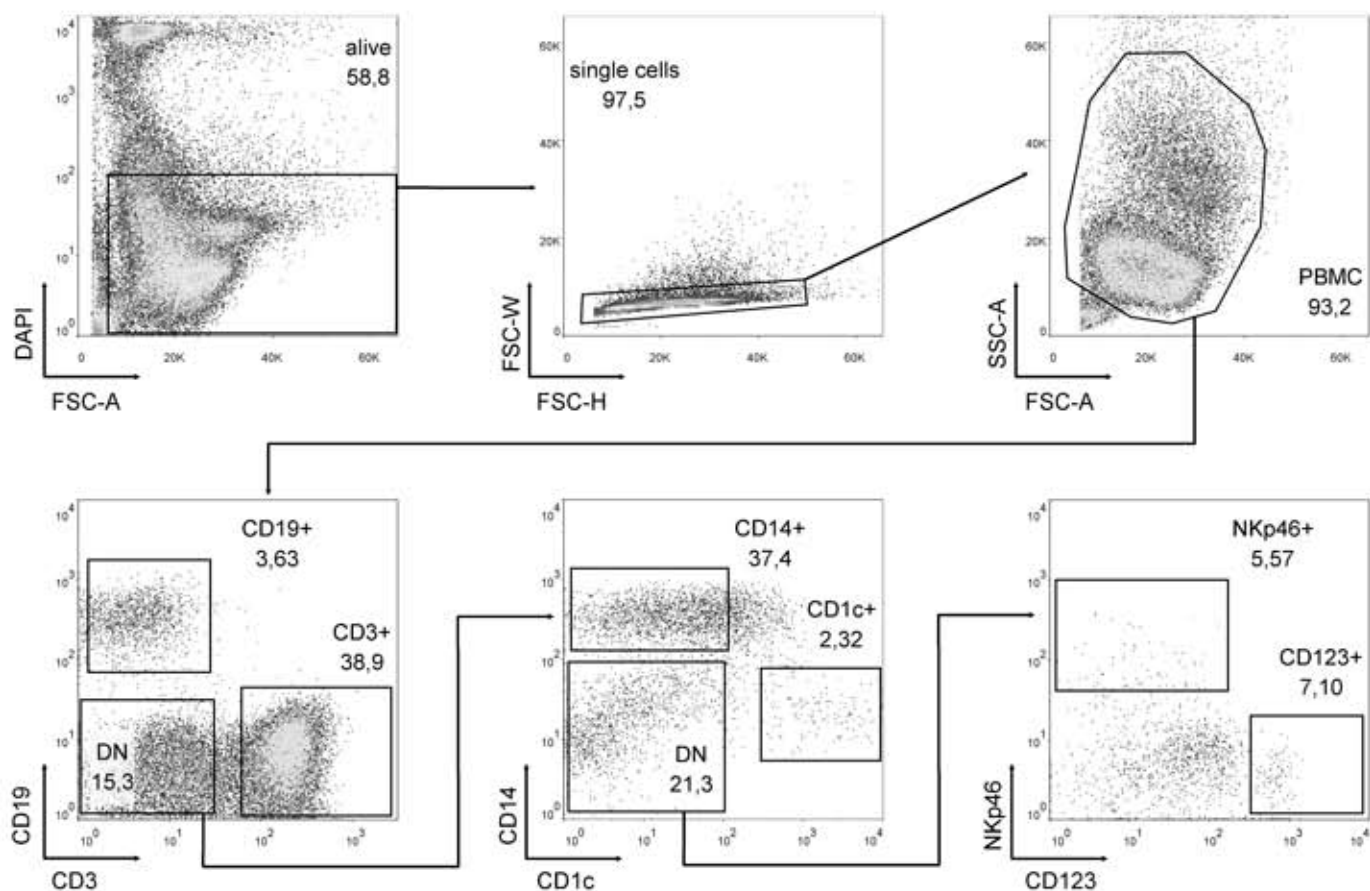
**Supplemental Figure 2: Gating strategy to analyze the VLP binding to PBMC subsets.** (A) T and B lymphocytes are selected as CD3+/CD19- and CD19+/CD3- respectively among CD45+ mononuclear white blood cells (CD45+/SSC-A low). Monocytes were characterized by the CD14 expression in this CD45+/SSC-A low subset. (B) A second gating strategy was used to analyze myeloid and plasmacytoid blood DC from the same healthy donors. CD45+/SSC-A low cells were subdivided according to the HLA-DR and Lineage markers. Myeloid DC were CD11c+ cells within the HLA-DR+ Lin- fraction whereas plasmacytoid DC expressed CD123 in a mutually exclusive manner.

# Supp F3



**Supplemental Figure 3: Purity of freshly isolated CD1c+ DC from blood and kidney.** (A) Gating and enrichment evaluation before and after immunomagnetic cell sorting of CD19- CD1c+ myeloid blood DC. (B) Similar dot plots showing the purity of CD1c+ myeloid DC from resected human kidneys before and after the FACS-assisted sorting. These results are representative of five different cell isolation from both blood and kidney compartments.

# Supp F4



**Supplemental Figure 4: Gating strategy to sort main cell subsets from transplant patients' PBMC and quantify BKPyV genome copies in each subset.** A morphology gating on live cells was performed before staining PBMC for CD19 and CD3. On the CD19-/CD3- fraction, CD14+ or CD1c+ (mDC) subsets were isolated. NK cells (NKp46+ cells) or pDC (CD123+) were sorted from the CD14- CD1c- double negative fraction.





**CONCLUSION**

-

**PERSPECTIVES**



Pour conclure sur ce travail de thèse, notre étude a montré que les mDC humaines sont capables de fixer et d'internaliser le BKPyV. Cette interaction n'induit pas de signaux d'activation conduisant à la maturation des DC et l'internalisation du virus ne conduit pas à une infection de ces cellules, nous permettant de conclure à une non permissivité des DC à l'infection par le BKPyV. D'autre part, l'interaction entre le BKPyV et les mDC permet la *trans*-infection de cellules permissives ; donc le virus, au contact ou internalisé, est transmis à d'autres cellules grâce à cette interaction. Nous avons identifié des voies utilisées pour permettre l'internalisation du virus, à la fois classiques via des endosomes EEA-1<sup>+</sup> et non classique via la voie CLIC/GEEC et des vésicules pléomorphes GRAF-1<sup>+</sup>, moins bien décrite. Cette étude représente, à ma connaissance, la première étude *in vitro* visant à caractériser et définir les modalités de l'interaction entre le BKPyV et les mDC humaines ; en postulant un rôle des mDC dans la physiopathologie de l'infection et non pas en tant que CPA ayant pour but l'établissement d'une RI anti-BKPyV efficace pour le développement de vaccins. Cette étude apporte un complément et des perspectives plus approfondies à une hypothèse évoquée il y a dix-sept ans sur l'établissement de la virémie chez les patients transplantés réactivant leur virus (Nickeleit et al., 2000). L'originalité de ce travail, et le poids du message apporté, réside dans la vérification et la reproduction des résultats sur trois types cellulaires différents, dont les mDC sanguines et rénales qui apportent une relevance biologique indéniable à notre étude et que je considère comme indispensable aux études chez l'Homme. Cette relevance biologique est encore amplifiée par les analyses des populations de PBMC de patients virémiques : nous avons, directement à partir d'échantillons de sang de patients transplantés rénaux ayant une infection à BKPyV persistante, clairement identifié par qPCR que les populations de monocytes et de LB sanguines étaient porteuses du génome du BKPyV.

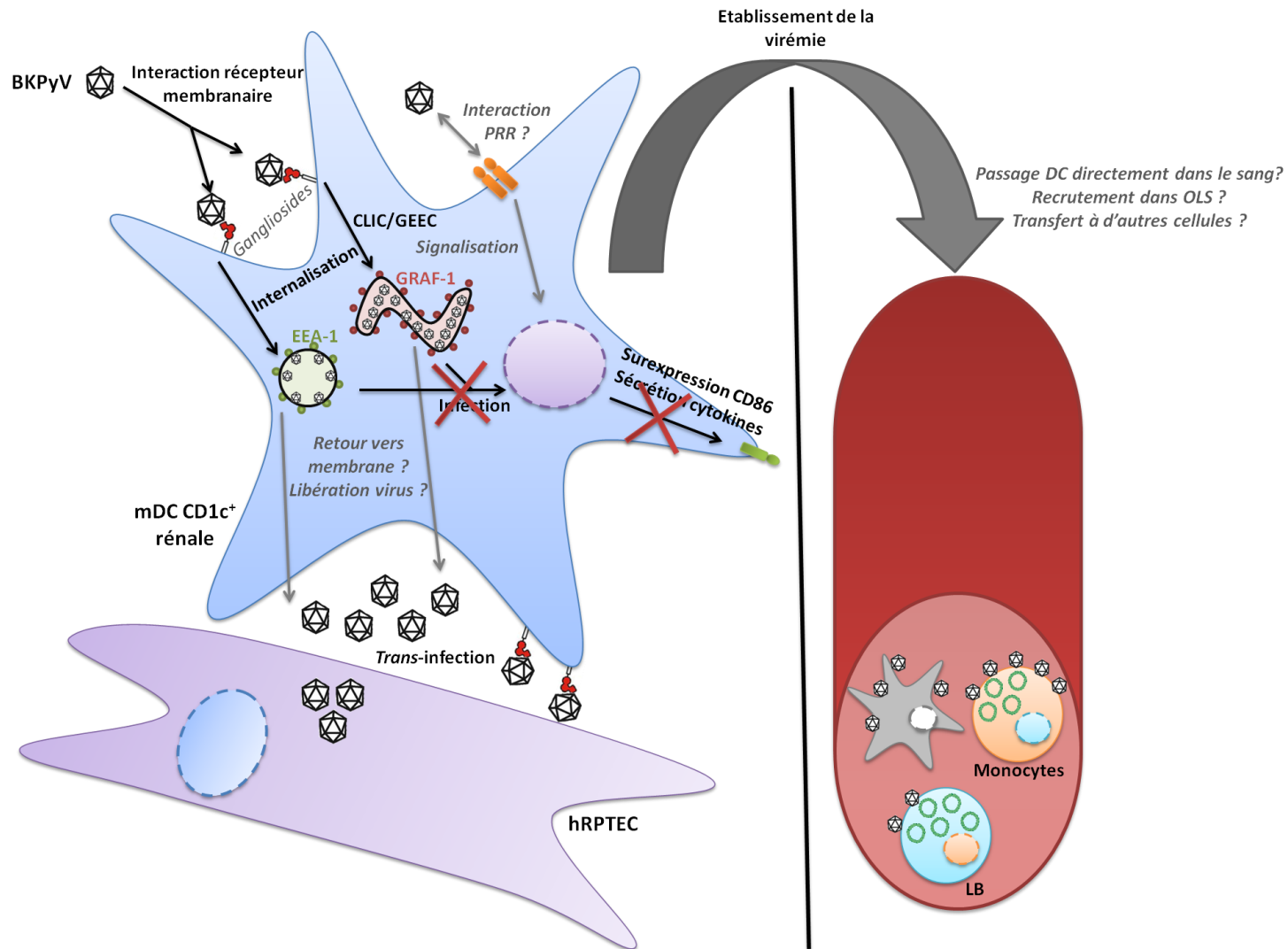
D'un point de vue fondamental, ce travail pose les bases pour des études à venir plus poussées : le fait que le virus se fixe aux mDC implique une interaction avec un récepteur membranaire. Deux principaux ont été décrit pour le BKPyV : les gangliosides GT1b et GD1b (Low et al., 2006). L'identification de la voie d'endocytose CLIC/GEEC utilisée pour l'internalisation du virus et la colocalisation partielle avec la CTxB nous apporte un premier indice pour l'identification du ou des récepteur(s) potentiel(s) du virus à la surface des mDC. Cette voie d'internalisation implique des radeaux lipidiques riches en gangliosides, dans le cas de la CTxB le ganglioside GM1. Ainsi ces radeaux lipidiques, et les gangliosides qui les composent, semblent aussi impliqués dans l'internalisation du BKPyV dans les mDC. Cela est à vérifier, notamment par des expériences de spectrométrie de masse pour étudier la composition en gangliosides des mDC mais aussi en utilisant des anticorps dans le but de bloquer la fixation du virus aux DC et identifier ainsi le récepteur. Les expériences d'internalisation des particules virales permettant l'identification des compartiments EEA-1<sup>+</sup> et GRAF-1<sup>+</sup> ont toutes été

réalisées à des temps arrêtés et courts, i.e. après 30 minutes à 37°C. L'imagerie en time-lapse nous permettrait d'observer directement et de manière plus dynamique la formation des vésicules d'endocytose et pourrait nous permettre de savoir si les deux compartiments observés, i.e. les grandes vésicules rondes et les vésicules tubulaires, représentent deux compartiments bien distincts au cours du processus d'internalisation, si l'une apparaît avant l'autre, ou si l'une « donne naissance » à l'autre par exemple. En lien avec la *trans*-infection, il serait intéressant de déterminer si ce transfert de virus à d'autres cellules implique un retour des vésicules d'endocytose vers la surface de la DC pour libérer le virus dans une potentielle « synapse » mise en place entre la DC et sa cellule cible, ce qui pourrait représenter un espace privilégié favorisant l'infection de cette dernière, ou s'il reste du virus en interaction avec son récepteur à la surface des DC qui va être transmis ? Ici encore, les techniques d'imagerie sur cellules vivantes seront primordiales pour visualiser ces phénomènes. De plus, il serait très intéressant d'éclaircir le point de l'absence d'activation des DC face aux particules virales : en effet, les DC utilisées dans les expériences sont bien réactives aux ligands de TLR utilisés en contrôle positif, ce qui veut dire qu'elles sont capables de maturer et de jouer leur rôle de CPA. Le fait qu'un virus non enveloppé, dont la réplication repose entièrement sur le détournement des polymérases et autres protéines cellulaires et dont le génome ne code à priori pas de protéines d'échappement, semble être ignoré par les mDC soulève justement la question de l'existence d'un mécanisme d'échappement immunitaire chez les polyomavirus, comme ça a déjà été évoqué pour le SV40 (Changyong et al., 2010). Une première piste serait de vérifier au niveau des voies de signalisations impliquées dans la détection des signaux de danger et menant à la surexpression des protéines de co-stimulation ou des molécules de CMH, comme la voie NFκB, si l'interaction avec le virus n'induit aucune phosphorylation ou activation de kinases, pouvant mettre en évidence une réaction des DC face au virus. Induire des délétions de gènes chez le BKPyV et produire des virus mutés pour certaines des protéines virales pourraient aussi être un moyen d'identifier la/les protéine(s) impliquée(s) dans cette ignorance en cherchant à retrouver une surexpression des molécules d'activation sur les DC en contact avec de tels virus.

Les résultats recueillis sur les cellules *ex vivo* issues du sang d'individus sains, de patients transplantés rénaux avec une virémie persistante et de portions saines de reins tumoraux ont permis de préciser et de mettre en évidence l'implication de plusieurs types de cellules immunitaires biologiquement relevant dans la physiopathologie de l'infection à BKPyV. Dans le sang, il avait déjà été montré la détection du génome du virus par PCR quantitative dans la fraction de PBMC (Dolei et al., 2000). Notre étude faite sur six populations triées du sang de patients virémiques affine ces résultats précédents et précise les populations concernées, en l'occurrence les monocytes et les LB sont les cellules porteuses du génome du BKPyV dans le sang des patients transplantés rénaux

virémiques. Dans le sang total d'individus sains, nos expériences de fixation des particules fluorescentes analysées par cytométrie en flux nous montrent que les monocytes et les mDC sont capables de fixer les particules virales. Les LB présentent à chaque expérience une proportion fixant les VLP, mais de manière non significativement différente des LT qui ne fixent pas les particules virales du tout. Ces résultats peuvent sembler divergents, pensant que les cellules fixant le virus dans le sang seront les cellules dans lesquelles nous retrouverons le génome viral chez les patients. En effet, bien que les LB ne fixent pas significativement les VLP, ils sont indéniablement porteurs du génome du virus dans le sang des patients virémiques. Malheureusement les tris de mDC chez ces patients et l'extraction d'ADN par la suite n'ont pas été concluants, dû notamment à la faible proportion de cette population parmi les cellules sanguines, qui est encore diminuée chez les patients transplantés rénaux (Womer et al., 2005). Cela dit, ces découvertes mettent en évidence l'implication des monocytes et des LB comme porteurs du génome viral dans le sang des patients. Ainsi il peut être envisagé que ces populations fassent l'objet d'une attention particulière en clinique, dans la prise en charge et le suivi des patients transplantés, en suivant leur proportion ou en suivant une éventuelle réplication du virus dans ces cellules. Les données recueillies sur les mDC rénales nous prouvent que les mDC résidentes du rein ont la capacité de fixer et de transmettre le BKPyV à d'autres cellules. L'accès à Nantes à de nombreuses biopsies rénales récoltées pour la biocollection DIVAT est une formidable opportunité de vérifier et d'approfondir nos observations faites *ex vivo* directement *in situ*.

Ces résultats pris conjointement me permettent de proposer un modèle de propagation et de dissémination du virus dans l'organisme via un transport par les DC rénales représenté en figure 9. Ce modèle est incomplet dans le sens où nous connaissons les points de passage du virus et les cellules jouant un rôle à ces endroits, mais les recherches futures devront s'atteler à identifier et préciser les liens qui existent entre ces points de passage, i.e. par quels compartiments et via quels éventuels types cellulaires supplémentaires le virus passe-t-il afin de rallier le sang à partir du rein ? Aussi, il serait intéressant de savoir si le virus est capable d'infecter productivement des populations cellulaires sanguines et d'ainsi se répliquer directement depuis le sang ou non. Il faudrait aussi identifier si les DC quittant le rein avec le virus sont elles-mêmes capables de rallier le sang directement ou si elles transmettent le virus à d'autres cellules entre temps. Nous pouvons imaginer par exemple un recrutement des mDC rénales, chargées en virus, par la voie lymphatique pour se rendre dans les OLS où elles pourraient transmettre le virus aux LB qui se retrouveraient dans la circulation sanguine par la suite.



**Figure 9 : Schéma récapitulatif des résultats et perspectives du projet.** Les résultats issus de la caractérisation des propriétés de l'interaction des mDC et du BKPvV sont représentés en noir (flèches et texte). Les questions subsistantes, qui feront l'objet d'études futures, sont représentées en italique et en grisé (flèches et texte).

# REFERENCES





Abend, J.R., Joseph, A.E., Das, D., Campbell-Cecen, D.B., and Imperiale, M.J. (2009). A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *Journal of General Virology*.

Ahsan, N., and Shah, K.V. (2006). Polyomaviruses and Human Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 577, 1-18.

Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M.A.A., Dalianis, T., Ramqvist, T., and Andersson, B. (2007). Identification of a Third Human Polyomavirus. *Journal of Virology* 81, 4130-4136.

Alvarez, C.P., Lasala, F., Carrillo, J., Muñiz, O., Corbí, A.L., and Delgado, R. (2002). C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. *Journal of Virology* 76, 6841-6844.

Amigorena, S. (1999). Présentation antigénique par les cellules dendritiques. *Médecines/Sciences* 15, 931-938.

Amigorena, S., and Savina, A. (2010). Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 22, 109-117.

Angel, C.E., George, E., Brooks, A.E.S., Ostrovsky, L.L., rown, T.L.H., and Dunbar, P.R. (2006). Cutting Edge: CD1a+ Antigen-Presenting Cells in Human Dermis Respond Rapidly to CCR7 Ligands. *The Journal of Immunology* 176, 5730-5734.

Arthur, R.R., Shah, K.V., Baust, S.J., Santos, G.W., and Saral, R. (1986). Association of BK Viruria with Hemorrhagic Cystitis in Recipients of Bone Marrow Transplants. *The New England Journal of Medicine*.

Bauman, Y., Daphna, N., Alon, V., Pinchas, T., Nir, D., Noam, S.-G., Dikla, L., Raizy, G., and Ofer, M. (2011). An Identical miRNA of the Human JC and BK Polyoma Viruses Targets the Stress-Induced Ligand ULBP3 to Escape Immune Elimination. *Cell Host & Microbe* 9, 93-102.

Bennett, S.M., Jiang, M., and Imperiale, M.J. (2013). Role of Cell-Type-Specific Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation in Polyomavirus Trafficking. *Journal of Virology*.

Bennett, S.M., Zhao, L., Bosard, C., and Imperiale, M.J. (2015). Role of a nuclear localization signal on the minor capsid Proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. *Virology* 474, 110-116.

Bernhoff, E., Garth, D.T., Lars, J.K., Tore, J.G., Hans, H.H., and Christine, H.R. (2010). Leflunomide Inhibition of BK Virus Replication in Renal Tubular Epithelial Cells. *Journal of Virology*.

Bickert, T., Wohlleben, G., Brinkman, M., Trujillo-Vargas, C.M., Ruehland, C., Reiser, C.O.A., Hess, J., and Erb, K.J. (2006). Murine polyomavirus-like particles induce maturation of bone marrow-derived dendritic cells and proliferation of T cells. *Medical Microbiology and Immunology* 196, 31-39.

Binet, I., Nicleleit, V., Hirsch, H.H., Prince, O., Dalquen, P., Gudat, F., Mihatsch, M.J., and Thiel, G. (1999). Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation* 67, 918-922.

Binggeli, S., Egli, A., Schaub, S., Binet, I., Mayr, M., Steiger, J., and Hirsch, H.H. (2007). Polyomavirus BK-Specific Cellular Immune Response to VP1 and Large T-Antigen in Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* 7, 1131-1139.

Bjorang, O., Tveitan, H., Midtvedt, K., Broch, L.U., Scott, H., and Andresen, P.A. (2002). Treatment of polyomavirus infection with cidofovir in a renal-transplant recipient. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*.

Blyth, E., Clancy, L., Simms, R., Gaundar, S., O'Connell, P., Micklethwaite, K., and Gottlieb, D.J. (2011). BK Virus-Specific T Cells for Use in Cellular Therapy Show Specificity to Multiple Antigens and Polyfunctional Cytokine Responses. *Transplantation* 92, 1077-1084.

Boltjes, A., and van Wijk, F. (2014). Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. *Frontiers in Immunology* 5.

Bonecchi, R., Galliera, E., Borroni, E.M., Corsi, M.M., Locati, M., and Mantovani, A. (2009). Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Frontiers in Bioscience* 1, 540-551.

Bouřa, E., Liebl, D., Špiřek, R., Frič, J., Marek, M., Štokrová, J., Holáň, V., and Forstová, J. (2005). Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: Analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Letters* 579, 6549-6558.

Bousarghin, L. (2005). Human papillomavirus 16 virus-like particles use heparan sulfates to bind dendritic cells and colocalize with langerin in Langerhans cells. *Journal of General Virology* 86, 1297-1305.

Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., *et al.* (2009). A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *The Lancet Oncology* 10, 321-322.

Bouvard, V., Baan, R.A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Straif, K., and Group, W.H.O.I.A.f.R.o.C.M.W. (2012). Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncology* 13, 339-340.

Bowie, A.G., and Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 8, 911-922.

Brennan, D.C., Agha, I., Bohl, D.L., Schnitzler, M.A., Hardinger, K.L., Lockwood, M., Torrence, S., Schuessler, R., Roby, T., Gaudreault-Keener, M., *et al.* (2005). Incidence of BK with Tacrolimus Versus Cyclosporine and Impact of Preemptive Immunosuppression Reduction. *American Journal of Transplantation* 5, 582-594.

Bressollette-Bodin, C., Coste-Burel, M., Hourmant, M., Sebille, V., Andre-Garnier, E., and Imbert-Marcille, B.M. (2005). A Prospective Longitudinal Study of BK Virus Infection in 104 Renal Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* 5, 1926-1933.

Burger-Calderon, R., Madden, V., Hallett, R.A., Gingerich, A.D., Nickleit, V., and Webster-Cyriaque, J. (2013). Replication of Oral BK Virus in Human Salivary Gland Cells. *Journal of Virology* 88, 559-573.

Butel, J.S., Arrington, A.S., Wong, C., Lednicky, J.A., and Finegold, M.J. (1999). Molecular Evidence of Simian Virus 40 Infections in Children. *The Journal of Infectious Diseases* 180, 884-887.

Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine* 5, 919-923.

Changyong, G., Sun, M., Li, H., Brockmeyer, N., and Wu, N. (2010). Simian Virus 40 Inhibits Differentiation and Maturation of Rhesus Macaque DC-SIGN<sup>+</sup>-Dendritic Cells. *European Journal of Medical Research* 15, 377-382.

Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, I., Casini, G., and Harrison, S.C. (2000). Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. *Molecular Cell* 5, 557-567.

Chen, X.S., Stehle, T., and Harrison, S.C. (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry.

Cioni, M., Leboeuf, C., Comoli, P., Ginevri, F., and Hirsch, H.H. (2016). Characterization of Immunodominant BK Polyomavirus 9mer Epitope T Cell Responses. *American Journal of Transplantation* 16, 1193-1206.

Cole, C.N. (1996). *Polyomaviridae: The Viruses and Their Replication*.

Collin, M., McGovern, N., and Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140, 22-30.

Comoli, P., Cioni, M., Basso, S., Gagliardone, C., Potenza, L., Verrina, E., Luppi, M., Zecca, M., Ghiggeri, G.M., and Ginevri, F. (2013). Immunity to Polyomavirus BK Infection: Immune Monitoring to Regulate the Balance between Risk of BKV Nephropathy and Induction of Alloimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*.

Cubitt, C.L. (2006). Molecular genetics of the BK virus. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 577, 85-95.

Cuesta, I., Rafael, N.-R., Sjors, H.W.S., Dahai, G., Xiaojiang, S.C., Ellen, F., and Jose, M.C. (2010). Conformational rearrangements of SV40 large-T antigen during early replication events. *The Journal of Molecular Biology*.

Dalianis, T., and Hirsch, H.H. (2011). BK Polyomavirus and Transformation. *Cancer Associated Viruses*, 419-432.

Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B., and Lawrence, T. (2014). Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *The EMBO Journal* 33, 1104-1116.

Damm, E.-M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., and Helenius, A. (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *The Journal of Cell Biology* 168, 477.

Davis, B.K., Wen, H., and Ting, J.P.Y. (2011). The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *Annual Reviews of Immunology* 29, 707-735.

Delboy, M.G., Roller, D.G., and Nicola, A.V. (2008). Cellular Proteasome Activity Facilitates Herpes Simplex Virus Entry at a Postpenetration Step. *Journal of Virology* 82, 3381-3390.

Doerries, K. (2006). Human Polyomavirus JC and BK Persistent Infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 577, 102-116.

Doherty, Gary J., and Lundmark, R. (2009). GRAF1-dependent endocytosis. *Biochemical Society Transactions* 37, 1061-1065.

Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* 78, 857-902.

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

Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C., Wali, R., Cubitt, C.L., and Ramos, E. (2003). BK Polyoma Virus Allograft Nephropathy: Ultrastructural Features from Viral Cell Entry to Lysis. *American Journal of Transplantation* 3, 1383-1392.

Drake III, D.R., Shawver, M.L., Hadley, A., Butz, E., Maliszewski, C., and Lukacher, A.E. (2001). Induction of Polyomavirus-Specific CD8+T Lymphocytes by Distinct Dendritic Cell Subpopulations. *Journal of Virology*.

Dugan, A.S., Eash, S., and Atwood, W.J. (2005). An N-Linked Glycoprotein with (2,3)-Linked Sialic Acid Is a Receptor for BK Virus. *Journal of Virology* 79, 14442-14445.

Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood. *The Journal of Immunology* 165, 6037-6046.

Eash, S., Manley, K., Gasparovic, M., Querbes, W., and Atwood, W.J. (2006). The human polyomaviruses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, 865-876.

Eash, S., Querbes, W., and Atwood, W.J. (2004). Infection of Vero Cells by BK Virus Is Dependent on Caveolae. *Journal of Virology* 78, 11583-11590.

Egli, A., Infanti, L., Dumoulin, A., Buser, A., Samaridis, J., Stebler, C., Gosert, R., and Hirsch, H.H. (2009). Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *Journal of Infectious Disease*.

Eriksson, M., Andreasson, K., Weidmann, J., Lundberg, K., Tegerstedt, K., Dalianis, T., and Ramqvist, T. (2011). Murine Polyomavirus Virus-Like Particles Carrying Full-Length Human PSA Protect BALB/c Mice from Outgrowth of a PSA Expressing Tumor. *PLoS ONE* 6.

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

Fickenscher, H., Hör, S., Küpers, H., Knappe, A., Wittmann, S., and Sticht, H. (2002). The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in Immunology* 23, 89-96.

Fivaz, M., Vilbois, F., Thurnheer, S., Pasquali, C., Abrami, L., Bickel, P.E., Parton, R.G., and van der Goot, G.F. (2002). Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *The EMBO Journal* 21, 3989-4000.

Fra, A.M., Masserini, M., Palestini, P., Sonnino, S., and Simons, K. (1995). A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Letters* 375, 11-14.

Frič, J., Marek, M., Hrušková, V., Holáň, V., and Forstová, J. (2008). Cellular and humoral immune responses to chimeric EGFP-pseudocapsids derived from the mouse polyomavirus after their intranasal administration. *Vaccine* 26, 3242-3251.

Froy, O. (2005). Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cellular Microbiology* 7, 1387-1397.

Fukata, M., Vamadevan, A.S., and Abreu, M.T. (2009). Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Seminars in Immunology* 21, 243-253.

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

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

Gedvilaite, A., Dorn, D.C., Sasnauskas, K., Pecher, G., Bulavaite, A., Lawatscheck, R., Staniulis, J., Dalianis, T., Ramqvist, T., Schönrich, G., *et al.* (2006). Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells. *Virology* 354, 252-260.

Gee, K., Guzzo, C., Che Mat, N.F., Ma, W., and Kumar, A. (2009). The IL-12 Family of Cytokines in Infection, Inflammation and Autoimmune Disorders. *Inflammation & Allergy - Drug Targets* 8, 40-52.

Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews Immunology* 9, 465-479.

Geijtenbeek, T.B.H., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C.F., Middel, J., Cornelissen, I.L.M.H.A., Nottet, H.S.L.M., Kewal-Ramani, V.N., Rittman, D.R., *et al.* (2000). DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells - ScienceDirect. *Cell* 100, 587-597.

Gelfand, E.W. (2012). Intravenous Immune Globulin in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *The New England Journal of Medicine*.

Gerdemann, U., Keirnan, J.M., Katari, U.L., Yanagisawa, R., Christin, A.S., Huye, L.E., Perna, S.K., Ennamuri, S., Gottschalk, S., Brenner, M.K., *et al.* (2012). Rapidly Generated Multivirus-specific Cytotoxic T Lymphocytes for the Prophylaxis and Treatment of Viral Infections - ScienceDirect. *Molecular Therapy* 20, 1622-1632.

Gerits, N., Johannessen, M., Tümmler, C., Walquist, M., Kostenko, S., Snapkov, I., van Loon, B., Ferrari, E., Hübscher, U., and Moens, U. (2015). Agnoprotein of polyomavirus BK interacts with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication. *Virology Journal*.

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

Gosert, R., Rinaldo, C.H., Funk, G.A., Egli, A., Ramos, E., Drachenberg, C.B., and Hirsch, H.H. (2008). Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 841-852.

Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P., van Strien, A., and van der Noordaa, J. (1982). The Role of BK Virus in Acute Respiratory Tract Disease and the Presence of BKV DNA in Tonsils. *Journal of Medical Virology* 10, 91-99.

Griffith, J.P., Griffith, D.L., Rayment, I., Murakami, W.T., and Caspar, D.L.D. (1992). Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature* 355, 652-654.



Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houllès, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J.-f., and Déchanet-Merville, J. (2002). Human Cytomegalovirus Binding to DC-SIGN Is Required for Dendritic Cell Infection and Target Cell trans-Infection. *Immunity* 17, 653-664.

Hammer, M.H., Brestrich, G., Andree, H., Engelmann, E., Rosenberger, C., Tillmann, H., Zwinger, S., Babel, N., Nickel, P., Volk, H.-D., *et al.* (2006). HLA Type-Independent Method to Monitor Polyoma BK Virus-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Immunity. *American Journal of Transplantation* 6, 625-631.

Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.-N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., Bullock, S., Grisotto, M., Booth, T., Taub, P., *et al.* (2009). Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 371.

Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., *et al.* (2012). Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* 37, 60-73.

Harris, K.F., Christensen, J.B., and M, J.I. (1996). BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *Journal of Virology*.

Harrison, D.M., Anna, I.P., Thomas, L., Stuart, I.M., David, V., Ken, S., Li, W., and Leonard, C. (2011). Human Dendritic Cell Subsets from Spleen and Blood Are Similar in Phenotype and Function but Modified by Donor Health Status. *The Journal of Immunology*.

Haspot, F., Lavault, A., Sinzger, C., Laib Sampaio, K., Stierhof, Y.-D., Pilet, P., Bressolette-Bodin, C., and Halary, F. (2012). Human Cytomegalovirus Entry into Dendritic Cells Occurs via a Macropinocytosis-Like Pathway in a pH-Independent and Cholesterol-Dependent Manner. *PLoS ONE* 7, e34795.

Held, T.K., Biel, S.S., Nitsche, A., Kurth, A., Chen, S., Gelderblom, H.R., and Siegert, W. (2000). Treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis and simultaneous CMV reactivation with cidofovir. *Bone Marrow Transplantation* 26.

Hemont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., and Josien, R. (2013). Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *Journal of Leukocyte Biology* 93, 599-609.

Heritage, J., Chesters, P.M., and McCance, D.J. (1981). The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *Journal of Medical Virology* 8, 143-150.

Hetzenecker, S., Helenius, A., and Krzyzaniak, M.A. (2016). HCMV Induces Macropinocytosis for Host Cell Entry in Fibroblasts. *Traffic* 17, 351-368.

Hewlett, L.J., Prescott, A.R., and Watts, C. (1994). The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *The Journal of Cell Biology* 124, 689.

Hirsch, H.H., Babel, N., Comoli, P., Friman, V., Ginevri, F., Jardine, A., Lautenschlager, I., Legendre, C., Midtvedt, K., Muñoz, P., *et al.* (2014). European perspective on human polyomavirus infection, replication and disease in solid organ transplantation. *Clinical Microbiology and Infection* 20, 74-88.

Hirsch, H.H., Knowles, W., Dickenmann, M., Passweg, J., Klimkait, T., Mihatsch, M.J., and Steiger, J. (2002). Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. - PubMed - NCBI. *New England Journal of Medicine* 347, 488-496.

Hirsch, H.H., and Randhawa, P. (2013). BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation* 13, 179-188.

Hirsch, H.H., and Steiger, J. (2003). Polyomavirus BK. *The Lancet Infectious Diseases* 3, 611-623.

Hirsch, H.H., Yakhontova, K., Lu, M., and Manzetti, J. (2015). BK Polyomavirus Replication in Renal Tubular Epithelial Cells Is Inhibited by Sirolimus, but Activated by Tacrolimus Through a Pathway Involving FKBP-12. *American Journal of Transplantation* 16, 821-832.

Hornell, T.M.C., Burster, T., Jahnsen, F.L., Pashine, A., Ochoa, M.T., Harding, J.J., Macaubas, C., Lee, A.W., Modlin, R.L., and Mellins, E.D. (2006). Human Dendritic Cell Expression of HLA-DO Is Subset Specific and Regulated by Maturation. *The Journal of Immunology* 176, 3536-3547.

Hurdiss, Daniel L., Morgan, Ethan L., Thompson, Rebecca F., Prescott, Emma L., Panou, Margarita M., Macdonald, A., and Ranson, Neil A. (2016). New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure* 24, 528-536.

Izzedine, H., Launay-Vacher, V., and Deray, G. (2005). Antiviral Drug-Induced Nephrotoxicity. *American Journal of Kidney Diseases* 45, 804–817.

Jiang, M., Abend, J.R., Tsai, B., and Imperiale, M.J. (2008). Early Events during BK Virus Entry and Disassembly. *Journal of Virology* 83, 1350-1358.

Johne, R., Buck, C.B., Allander, T., Atwood, W.J., Garcea, R.L., Imperiale, M.J., Major, E.O., Ramqvist, T., and Norkin, L.C. (2011). Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Archives of Virology* 156, 1627-1634.

Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., *et al.* (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 1247.

Josephson, M.A., Gillen, D., Javaid, B., Kadambi, P., Meehan, S., Foster, P., Harland, R., Thistlethwaite, R., J., Garfinkel, M., Atwood, W., *et al.* (2006). Treatment of Renal Allograft Polyoma Bk Virus Infection with Leflunomide. *Transplantation* 81, 704-710.

Jung, Y.H., Moon, K.C., Ha, J.W., Kim, S.-J., Ha, I.-S., Cheong, H.I., and Kang, H.G. (2012). Leflunomide therapy for BK virus allograft nephropathy after pediatric kidney transplantation. *Pediatric Transplantation* 17.

Kaiko, G.E., Horvat, J.C., Beagley, K.W., and Hansbro, P.M. (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123, 326-338.

Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology* 3, 984-993.

Kassianos, A.J., Sampangi, S., Wang, X., Roper, K.E., Beagley, K., Healy, H., and Wilkinson, R. (2012). Human proximal tubule epithelial cells modulate autologous dendritic cell function. *Nephrology Dialysis Transplantation* 28, 303-312.

Kassianos, A.J., Wang, X., Sampangi, S., Afrin, S., Wilkinson, R., and Healy, H. (2015). Fractalkine–CX3CR1-dependent recruitment and retention of human CD1c+ myeloid dendritic cells by in vitro–activated proximal tubular epithelial cells. *Kidney International* 87, 1153-1163.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 11, 373-384.

Khan, M.J., Castle, P.E., Lorincz, A.T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D.R., Rush, B.B., Glass, A.G., and Schiffman, M. (2005). The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 1072-1079.

Khor, R., McElroy, L.J., and Whittaker, G.R. (2003). The Ubiquitin-Vacuolar Protein Sorting System is Selectively Required During Entry of Influenza Virus into Host Cells. *Traffic* 4, 857-868.

Knowles, W.A. (2006). Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Advances in Experimental Medicine and Biology* 577, 19-45.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 cells. *Annual Reviews of Immunology* 27, 485-517.

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

Kuypers, D.R.J. (2012). Management of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *Nature Reviews Nephrology* 8, 390-402.

Lamaze, C., Tardif, N., Dewulf, M., Vassilopoulos, S., and Blouin, C.M. (2017). The caveolae dress code: structure and signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 47, 117-125.

Langers, I., Renoux, V., Reschner, A., Touzé, A., Coursaget, P., Boniver, J., Koch, J., Delvenne, P., and Jacobs, N. (2014). Natural killer and dendritic cells collaborate in the immune response induced by the vaccine against uterine cervical cancer. *European Journal of Immunology* *44*, 3585-3595.

Lenz, A., Heine, M., Schuler, G., and Romani, N. (1993). Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *The Journal of Clinical Investigation* *92*, 2587-2596.

Lenz, P., Day, P.M., Pang, Y.Y.S., Frye, S.A., Jensen, P.N., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2001). Papillomavirus-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* *166*, 5346-5355.

Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., and Harrison, S.C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* *354*, 278-284.

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

Lim, J.P., and Gleeson, P.A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology* *89*, 836-843.

Lindstedt, M., Lundberg, K., and Borrebaeck, C.A.K. (2005). Gene Family Clustering Identifies Functionally Associated Subsets of Human In Vivo Blood and Tonsillar Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* *175*, 4839-4846.

Loo, Y.-M., and Gale, M. (2011). Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* *34*, 680-692.

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

Lundmark, R., Doherty, G.J., Howes, M.T., Cortese, K., Vallis, Y., Parton, R.G., and McMahon, H.T. (2008). The GTPase-Activating Protein GRAF1 Regulates the CLIC/GEEC Endocytic Pathway. *Current Biology* *18*, 1802-1808.

MacDonald, K.P.A., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., and Hart, D.N.J. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* *100*, 4512-4520.

Manh, T.-P.V., Alexandre, Y., Baranek, T., Crozat, K., and Dalod, M. (2013). Plasmacytoid, conventional, and monocyte-derived dendritic cells undergo a profound and convergent genetic reprogramming during their maturation. *European Journal of Immunology* *43*, 1706-1715.

Marzook, N.B., and Newsome, T.P. (2016). Viruses That Exploit Actin-Based Motility for Their Replication and Spread. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 237-261.

Masten, B.J., Olson, G.K., Tarleton, C.A., Rund, C., Schuyler, M., Mehran, R., Archibeque, T., and Lipscomb, M.F. (2006). Characterization of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells in Human Lung. *The Journal of Immunology* *177*, 7784-7793.

McCurley, N., and Mellman, I. (2010). Monocyte-Derived Dendritic Cells Exhibit Increased Levels of Lysosomal Proteolysis as Compared to Other Human Dendritic Cell Populations. *PLOS One*.

McIlroy, D., Troadec, C., Grassi, F., Samri, A., Barrou, B.t., Autran, B., Debré, P., Feuillard, J., and Hosmalin, A. (2001). Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood* *97*, 3470-3477.

Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* *8*, 935-947.

Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunology* *3*, 1135-1141.

Mercer, J., and Helenius, A. (2008). Vaccinia Virus Uses Macropinocytosis and Apoptotic Mimicry to Enter Host Cells. *Science* *320*, 531-535.

Mercer, J., Schelhaas, M., and Helenius, A. (2010). Virus entry by Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* *79*, 803-833.

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

Monier, S., Dietzen, D.J., Hastings, W.R., Lublin, D.M., and Kurzchalia, T.V. (1996). Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Letters* *388*, 143-149.

Moriyama, T., Marquez, J.P., Tetsuro, W., and Andrey, S. (2007). Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *Journal of Virology*.

Mueller, K., Schachtner, T., Sattler, A., Meier, S., Friedrich, P., Trydzenskaya, H., Hinrichs, C., Trappe, R., Thiel, A., Reinke, P., *et al.* (2011). Bk-vp3 as a New Target of Cellular Immunity in Bk Virus Infection. *Transplantation* *91*, 100-107.

Murakami, M., Gurski, K.J., Marincola, F.M., Ackland, J., and Steller, M.A. (1999). Induction of Specific CD8+ T-Lymphocytes Responses Using a Human Papillomavirus-16 E6/E7 Fusion Protein and Autologous Dendritic Cells. *Cancer Research* *59*, 1184-1187.

Nestle, F.O., Zheng, X.G., Thompson, C.B., Turka, L.A., and Nickoloff, B.J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *The Journal of Immunology* *151*, 6535-6545.

Neu, U., Allen, S.-a.A., Blaum, B.S., Liu, Y., Frank, M., Palma, A.S., Ströh, L.J., Feizi, T., Peters, T., Atwood, W.J., *et al.* (2013). A Structure-Guided Mutation in the Major Capsid Protein Retargets BK Polyomavirus. *PLOS Pathogens*.

Nickeleit, V., Hirsch, H.H., Binet, I.F., Gudat, F., Prince, O., Dalquen, P., Thiel, G., and Mihatsch, M.J. (1999). Polyomavirus Infection of Renal Allograft Recipients: From Latent Infection to Manifest Disease. *Journal of The American Society of Nephrology*.

Nickeleit, V., Hirsch, H.H., Zeiler, M., Gudat, F., Prince, O., Thiel, G., and Mihatsch, M.J. (2000). BK-virus nephropathy in renal transplants -- tubular necrosis, MHC-class II expression and rejection in a puzzling game. *Nephrology Dialysis Transplantation* *15*, 324-332.

Nonnenmacher, M., and Weber, T. (2011). Adeno-Associated Virus 2 Infection Requires Endocytosis through the CLIC/GEEC Pathway. *Cell Host & Microbe* 10, 563-576.

Ochoa, M.T., Loncaric, A., Krutzik, S.R., Becker, T.C., and Modlin, R.L. (2008). "Dermal Dendritic Cells" Comprise Two Distinct Populations: CD1+ Dendritic Cells and CD209+ Macrophages. *Journal of Investigative Dermatology* 128, 2225-2231.

Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J., and Dessel, B.H. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 19, 1257-1260.

Pagano, J.S. (1984). DNA tumor viruses. *Transplantation Proceedings* 16, 419-427.

Papadimitriou, J.C., Randhawa, P., Rinaldo, C.H., Drachenberg, C.B., Alexiev, B., and Hirsch, H.H. (2016). BK Polyomavirus Infection and Renourinary Tumorigenesis. *American Journal of Transplantation* 16, 398-406.

Papadopoulou, A., Gerdemann, U., Katari, U.L., Tzannou, I., Liu, H., Martinez, C., Leung, K., Carrum, G., Gee, A.P., Vera, J.F., *et al.* (2014). Activity of Broad-Spectrum T Cells as Treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 Infections after HSCT. *Science Translational Medicine*.

Pho, M.T., Ashok, A., and Atwood, W.J.A. (2000). JC Virus Enters Human Glial Cells by Clathrin-Dependent Receptor-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology* 74, 2288-2292.

Pietropaolo, V., Bellizzi, A., Anzivino, E., Iannetta, M., Zingaropoli, M.A., Rodio, D.M., Morreale, M., Pontecorvo, S., Francia, A., Vullo, V., *et al.* (2015). Human polyomavirus JC replication and non-coding control region analysis in multiple sclerosis patients under natalizumab treatment. *Journal of NeuroVirology* 21, 653-665.

Pipas, J.M. (1992). Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *Journal of Virology*.



Pollara, G., Kwan, A., Newton, P.J., Handley, M.E., Chain, B.M., and Katz, D.R. (2005). Dendritic cells in viral pathogenesis : protective or defective? *International Journal of Experimental Pathology*, 187-204.

Polo, C., Pérez, J.L., Mielnichuck, A., Fedele, C.G., Niubo, J., and Tenorio, A. (2004). Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. *Clinical Microbiology and Infection* 10, 640-644.

Purighalla, R., Shapiro, R., McCauley, J., and Randhawa, P. (1995). BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *American Journal of Kidney Diseases* 26, 671-673.

Racoosin, E.L., and Swanson, J.A. (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *The Journal of Cell Biology* 121, 1011.

Radha, R., Jordan, S., Puliyaanda, D., Bunnapradist, S., Petrosyan, A., Amet, N., and Toyoda, M. (2004). Cellular Immune Responses to Cytomegalovirus in Renal Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* 5, 110-117.

Raftery, M.J., Schwab, M., Eibert, S.M., Samstag, Y., Walczak, H., and Schönrich, G. (2001). Targeting the Function of Mature Dendritic Cells by Human Cytomegalovirus: A Multilayered Viral Defense Strategy - ScienceDirect. *Immunity* 15, 997-1009.

Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., and Richmond, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Experimental Cell Research* 317, 575-589.

Ramos, E., Drachenberg, C.B., Portocarrero, M., Wali, R., Klassen, D.K., Fink, J.C., Farney, A., Hirsch, H., Papadimitriou, J.C., Cangro, C.B., *et al.* (2002). BK virus nephropathy diagnosis and treatment: experience at the University of Maryland Renal Transplant Program. *Cinical Transplantation*, 143-153.

Randhawa, P., Pastrana, D.V., Zeng, G., Huang, Y., Shapiro, R., Sood, P., Puttarajappa, C., Berger, M., Hariharan, S., and Buck, C.B. (2015). Commercially Available Immunoglobulins Contain Virus Neutralizing Antibodies Against All Major Genotypes of Polyomavirus BK. *American Journal of Transplantation* 15, 1014-1020.

Randhawa, P.S., Finkelstein, S., Scantlebury, V., Shapiro, R., Vivas, C., Jordan, M., Picken, M.M., and Demetris, A.J. (1999). Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 67, 103-109.

Ranzi, A.D., Prolla, J.C., Keitel, E., Brackmann, R., Kist, R., Tavares dos Santos, G., and Bica, C.G. (2012). The Role of Urine Cytology for 'Decoy Cells' as a Screening Tool in Renal Transplant Recipients. *Acta Cytologica* 56, 543-547.

Renner, F.C., Dietrich, H., Bulut, N., Celik, D., Freitag, E., Gaertner, N., Karoui, S., Mark, J., Raatz, C., Weimer, R., *et al.* (2013). The Risk of Polyomavirus-Associated Graft Nephropathy Is Increased by a Combined Suppression of CD8 and CD4 Cell-Dependent Immune Effects. *Transplantation Proceedings* 45, 1608-1610.

Rinaldo, C.H., Gosert, R., Bernhoff, E., Finstad, S., and Hirsch, H.H. (2010). 1-O-Hexadecyloxypropyl Cidofovir (CMX001) Effectively Inhibits Polyomavirus BK Replication in Primary Human Renal Tubular Epithelial Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 4714-4722.

Rinaldo, C.H., Tylden, G.D., and Sharma, B.N. (2013). The human polyomavirus BK (BKPyV): virological background and clinical implications. *Apmis* 121, 728-745.

Rock, K.L., York, I.A., and Goldberg, A.L. (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nature Immunology* 5, 670-677.

Roth, T.F., and Porter, K.R. (1964). YOLK PROTEIN UPTAKE IN THE OOCYTE OF THE MOSQUITO AEDES AEGYPTI. L. *The Journal of Cell Biology* 20, 313.

Rudolf, M.P., Fausch, S.C., Da Silva, D.M., and Kast, W.M. (2001). Human Dendritic Cells Are Activated by Chimeric Human Papillomavirus Type-16 Virus-Like Particles and Induce Epitope-Specific Human T Cell Responses In Vitro. *The Journal of Immunology* 166, 5917-5924.

Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G., and Mayor, S. (2002). GPI-Anchored Proteins Are Delivered to Recycling Endosomes via a Distinct cdc42-Regulated, Clathrin-Independent Pinocytic Pathway. *Developmental Cell* 2, 411-423.

Sahoo, M.K., Tan, S.K., Chen, S.F., Kapusinszky, B., Concepcion, K.R., Kjelson, L., Mallempati, K., Farina, H.M., Fernández-Viña, M., Tyan, D., *et al.* (2015). Limited Variation in BK Virus T-Cell Epitopes Revealed by Next-Generation Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 53, 3226-3233.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *The Journal of Experimental Medicine* 179, 1109-1118.

Santin, A.D., Hermonat, P.L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Zhan, D., Pecorelli, S., Parham, G.P., and Cannon, M.J. (1999). Induction of Human Papillomavirus-Specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Lymphocytes by E7-Pulsed Autologous Dendritic Cells in Patients with Human Papillomavirus Type 16- and 18-Positive Cervical Cancer. *Journal of Virology*, 5402-5410.

Schachtner, T., Müller, K., Stein, M., Diezemann, C., Sefrin, A., Babel, N., and Reinke, P. (2011). BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy. *American Journal of Transplantation* 11, 2443-2452.

Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., *et al.* (2013). IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b<sup>+</sup> Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity* 38, 970-983.

Schmid, E.M., and McMahon, H.T. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* 448, 883-888.

Schmitt, C., Raggub, L., Linnenweber-Held, S., Adams, O., Schwarz, A., and Heim, A. (2014). Donor origin of BKV replication after kidney transplantation. *Journal of Clinical Virology* 59, 120-125.

Schwalter, R.M., Pastrana, D.V., Pumphrey, K.A., Moyer, A.L., and Buck, C.B. (2010). Merkel Cell Polyomavirus and Two Previously Unknown Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin. *Cell Host & Microbe* 7, 509-515.

Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kühn, J., Hengel, H., and Ehlers, B. (2011). A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus. *Journal of Virology* 85, 4586-4590.

Seemayer, C.A., Norbert, H.S., Ursula, D., Fred, G., Stefan, S., Hans, H.H., and Michael, J.M. (2008). BK virus large T and VP-1 expression in infected human renal allografts. *Nephrology Dialysis Transplantation*.

Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013). Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* 38, 336-348.

Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 653.

Siebrasse, E.A., Reyes, A., Lim, E.S., Zhao, G., Mkakosya, R.S., Manary, M.J., Gordon, J.I., and Wang, D. (2012). Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool. *Journal of Virology* 86, 10321-10326.

Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* 284, 1835-1837.

Sol-Foulon, N., Moris, A., Nobile, C., Boccaccio, C., Engering, A., Abastado, J.-P., Heard, J.-M., van Kooyk, Y., and Schwartz, O. (2002). HIV-1 Nef-Induced Upregulation of DC-SIGN in Dendritic Cells Promotes Lymphocyte Clustering and Viral Spread. *Immunity* 16, 145-155.

Solis, M., Velay, A., Porcher, R., Domingo-Calap, P., Soulier, E., Joly, M., Meddeb, M., Kack-Kack, W., Moulin, B., Bahram, S., *et al.* (2017). Neutralizing Antibody-Mediated Response and Risk of BK Virus-Associated Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, ASN.2017050532.

Song, T.-R., Rao, Z.-S., Qiu, Y., Liu, J.-P., Huang, Z.-L., Wang, X.-D., and Lin, T. (2016). Fluoroquinolone prophylaxis in preventing BK polyomavirus infection after renal transplant: A systematic review and meta-analysis. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 32, 152-159.

Sorkin, A. (2004). Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 392-399.

Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of Experimental Medicine* 137, 1142.

Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *The Journal of Experimental Medicine* 139, 380.

Takemoto, K.K., and Mullarkey, M.F. (1973). Human Papovavirus, BK Strain: Biological Studies Including Antigenic Relationship to Simian Virus 40. *Journal of Virology*.

Trydzenskaya, H., Juerchott, K., Lachmann, N., Kotsch, K., Kunert, K., Weist, B., Schönemann, C., Schindler, R., Nickel, P., Melzig, M.F., *et al.* (2013). The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients. *Kidney International* 84, 359–365.

Trydzenskaya, H., Sattler, A., Müller, K., Schachtner, T., Dang-Heine, C., Friedrich, P., Nickel, P., Hoerstrup, J., Schindler, R., Thiel, A., *et al.* (2011). Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity. *Transplantation* 92, 1269-1277.

Tzannou, I., Papadopoulou, A., Naik, S., Leung, K., Martinez, C.A., Ramos, C.A., Carrum, G., Sasa, G., Lulla, P., Watanabe, A., *et al.* (2017). Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Journal of Clinical Oncology*.

Van den Bergh, J.M.J., Guerti, K., Willemsen, Y., Lion, E., Cools, N., Goossens, H., Vorsters, A., Van Tendeloo, V.F.I., Anguille, S., Van Damme, P., *et al.* (2014). HPV vaccine stimulates cytotoxic activity

of killer dendritic cells and natural killer cells against HPV-positive tumour cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 18, 1372-1380.

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

Velásquez-Lopera, M.M., Correa, L.A., and García, L.F. (2008). Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes. *Clinical & Experimental Immunology* 154, 107-114.

Vu, D., Shah, T., Ansari, J., Naraghi, R., and Min, D. (2015). Efficacy of Intravenous Immunoglobulin in the Treatment of Persistent BK Viremia and BK Virus Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings* 47, 394-398.

Wang, X.-N., McGovern, N., Gunawan, M., Richardson, C., Windebank, M., Siah, T.-W., Lim, H.-Y., Fink, K., Yao Li, J.L., Ng, L.G., *et al.* (2014). A Three-Dimensional Atlas of Human Dermal Leukocytes, Lymphatics, and Blood Vessels. *Journal of Investigative Dermatology* 134, 965-674.

Weiss, A.S., Jane, G., Larry, C., Patrick, K., and Alexander, C.W. (2008). Aggressive Immunosuppression Minimization Reduces Graft Loss Following Diagnosis of BK Virus-Associated Nephropathy: A Comparison of Two Reduction Strategies. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*.

Weist, B.J.D., Schmueck, M., Fuehrer, H., Sattler, A., Reinke, P., and Babel, N. (2014). The role of CD4+T cells in BKV-specific T cell immunity. *Medical Microbiology and Immunology* 203, 395-408.

Williams, J.W., Javaid, B., Kadambi, P.V., Gillen, D., Harland, R., Thistlewaite, J.R., Garfinkel, M., Foster, P., Atwood, W., Millis, J.M., *et al.* (2005). Leflunomide for Polyomavirus Type BK Nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 352, 1157-1158.

Wojciechowski, D., Chanda, R., Chandran, S., Lee, B., Webber, A., Macaraig, M., Tomlanovich, S., and Vincenti, F. (2012). Ciprofloxacin Prophylaxis in Kidney Transplant Recipients Reduces Bk Virus Infection at 3 Months But Not at 1 Year. *Transplantation* 94, 1117-1123.

Woltman, A.M., de Fijter, J.W., Zuidwijk, K., Vlug, A.G., Bajema, I.M., van der Kooij, S.W., van Ham, V., and van Kooten, C. (2007). Quantification of dendritic cell subsets in human renal tissue under normal and pathological conditions. *Kidney International* 71, 1001-1008.

Womer, K.L., Huang, Y., Herren, H., Dibadj, K., Peng, R., Murawski, M., Shraybman, R., Patton, P., Clare-Salzler, M.J., and Kaplan, B. (2010). Dendritic Cell Deficiency Associated With Development of BK Viremia and Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *Transplantation* 89, 115-123.

Womer, K.L., Peng, R., Patton, P.R., Murawski, M.R., Bucci, M., Kaleem, A., Schold, J., Efron, P.A., Hemming, A.W., Srinivas, T.R., *et al.* (2005). The effects of renal transplantation on peripheral blood dendritic cells. *Clinical Transplantation* 19, 659-667.

Yaneva, R., Schneeweiss, C., Zacharias, M., and Springer, S. (2009). Peptide binding to MHC class I and II proteins: New avenues from new methods. *Molecular Immunology* 47, 649-657.

Yapici, U., Kers, J., Slavujevic-Letic, I., Stokman, G., Roelofs, J.J.T.H., van Aalderen, M.C., Groothoff, J.W., de Boer, O.J., van der Pant, K.A.M.I., Claessen, N., *et al.* (2015). Intra-graft Blood Dendritic Cell Antigen-1-Positive Myeloid Dendritic Cells Increase during BK Polyomavirus-Associated Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 27, 2502-2510.

Zeng, G., Huang, Y., Huang, Y., Lyu, Z., Lesniak, D., and Randhawa, P. (2016). Antigen-Specificity of T Cell Infiltrates in Biopsies With T Cell-Mediated Rejection and BK Polyomavirus Viremia: Analysis by Next Generation Sequencing. *American Journal of Transplantation* 16, 3131-3138.

Zhao, L., Marciano, A.T., Rivet, C.R., and Imperiale, M.J. (2016). Caveolin- and clathrin-independent entry of BKPyV into primary human proximal tubule epithelial cells. *Virology* 492, 66-72.

Zhou, W., Sharma, M., Martinez, J., Srivastava, T., Diamond, D.J., Knowles, W., and Lacey, S.F. (2007). Functional Characterization of BK Virus-Specific CD4+ T Cells with Cytotoxic Potential in Seropositive Adults. *Viral Immunology* 20, 379-388.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., *et al.* (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, 74-80.

Zuidwijk, K., de Fijter, J.W., Mallat, M.J.K., Eikmans, M., van Groningen, M.C., Goemaere, N.N., Bajema, I.M., and van Kooten, C. (2012). Increased influx of myeloid dendritic cells during acute rejection is associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy and predicts poor outcome. *Kidney International* 81, 64-75.



# **ANNEXE**



## **Brevet**

### **Méthodes et composition pour un traitement dirigé par l'ARN de l'infection à polyomavirus BK (BKPyV)**

Un projet collaboratif mené avec le Dr Fabienne Haspot lors de mon doctorat a mené au développement d'une stratégie d'inhibition de la réplication du BKPyV en adaptant la technologie des ARN guides (gRNA) couplés à la nucléase Cas9. Les constructions génomiques ont été enfermées dans des vecteurs lentiviraux et ont servi à transduire des hRPTEC. Ce projet a abouti au dépôt d'un brevet dont le document est joint ci-après.

Brièvement, les gRNA indispensables au fonctionnement de la Cas9 ont été développés pour cibler le gène précoce du LTag du BKPyV. Sans cette protéine, ou avec une protéine mal conformée, le virus ne devrait pouvoir se répliquer. La coupure d'un plasmide du génome du BKPyV par le gRNA et la Cas9 a été vérifiée par un test à l'endonucléase T7. L'inhibition de la réplication virale dans des hRPTEC transduites ou non par le vecteur lentiviral a été vérifiée par marquage immunocytofluorescent du LTag. Enfin, nous avons infecté des hRPTEC non transduites avec les surnageants des cultures de l'expérience précédente afin d'attester la moindre libération de virions par les cellules dont la réplication du virus était inhibée par notre stratégie. Ainsi, nous avons vérifié que notre couple gRNA/Cas9 a bien une action inhibitrice de la réplication du virus, ce qui empêche la production de virions par les cellules « protégées ».

Sur ce projet collaboratif, j'ai réalisé les expériences *in vitro* de transduction, infection et ré-infection des hRPTEC et les marquages immunocytofluorescents du LTag.



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

## Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000378219	
Application number	EP16306588.1	
File No. to be used for priority declarations	EP16306588	
Date of receipt	30 November 2016	
Your reference	HASPOT16389MS	
Applicant	INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)	
Country	FR	
Title	METHODS AND COMPOSITIONS FOR RNA-GUIDED TREATMENT OF HUMAN BK POLYOMA VIRUS (BK-PyV) INFECTION	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf\text_16389_EP.pdf (26 p.) SEQLTXT.txt\sequences listing_HASPOT16389.ST25.txt	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdf\drawings_16389_E P.pdf (2 p.)
Submitted by	EMAIL=patents@inserm-transfert.fr,CN=Denise HIRSCH,O=SOCIETE INSERM TRANSFERT,C=FR	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	30 November 2016, 17:42:42 (CET)	
Official Digest of Submission	84:06:84:43:C4:2D:ED:D5:86:9B:75:09:26:EF:04:0D:83:DE:8C:E9	

/INPI, section dépôt/

## **METHODS AND COMPOSITIONS FOR RNA-GUIDED TREATMENT OF HUMAN BK POLYOMA VIRUS (BK-PyV) INFECTION**

---

5           **FIELD OF THE INVENTION:**

The invention relates to fields of virology and more particularly to methods and compositions for treatment of BK Polyoma Virus (BK-PyV) infection.

10           **BACKGROUND OF THE INVENTION:**

BK virus (BKPyV) infects as many as 90% of the population during childhood without any clinical manifestation unless the immune system has been compromised. Asymptomatic reactivations, with urinary shedding, are described in 5-10% of healthy individuals and symptomatic reactivations will depend on the immune state of the patient. For instance, within 6 weeks' post-transplantation, as many as 15% of allogeneic hematopoietic stem cell transplanted patients (HSCT) will develop BKV-associated hemorrhagic cystitis (BK-HC), predominantly of higher grade (4 to 5). BK-associated HC has therefore been associated with increased morbidity in HSCT recipients. One to 10% of kidney-transplanted patient will face a polyomavirus-associated nephropathy (PyVAN) and will need to reduce their immunosuppressive treatment jeopardizing the survival of the kidney graft itself. There is no antiviral drug with proven clinical efficiency against BKPyV. Indeed, polyomaviruses use the cellular DNA polymerase for replication and are therefore uncontrolled by the anti-viral DNA polymerase. Thus, there is a need to identify new strategies to fight BKPyV infection.

25           **SUMMARY OF THE INVENTION:**

The invention relates to a method of inactivating a BK Polyomavirus (BK-PyV) in cells or organ, comprising exposing cells or the organ to a composition comprising an isolated nucleic acid encoding a gene editing complex comprising a CRISPR-associated endonuclease and a guide RNA, wherein the guide RNA is complementary to a target nucleic acid sequence within the BK-PyV large T antigen (Ag-T) gene. In particular, the present invention is defined by claims.

## **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:**

Inventors hypothesize that the BKPyV's genome itself can be a new therapeutic target using innovative gene editing strategy. The present invention is based on the discovery that inventors could eliminate or invalidate the BK-PyV genome from BK infected cells by using the RNA-guided Clustered Regularly Interspace Short Palindromic Repeat (CRISPR)-Cas 9  
5 nuclease system (Cas9/gRNA) in single and multiplex configurations. The inventors identified highly specific target within large tumor antigen (Ag-T) gene that was efficiently edited by Cas9/gRNA, inactivating viral gene expression and replication in infected cells.

Indeed, they cloned a gRNA targeting Ag-T gene in plasmid allowing lentiviral  
10 production in order to validate their strategy on infected cells. The present results suggest that Cas9/gRNA can be engineered to provide a specific, efficacious prophylactic and therapeutic approach against BK-PyV. Interestingly, such an approach is not only useful for definitively treating BK-PyV-infected patients but could be used to purge a transplanted organ reducing therefore the risk of the transmission of a BK-PyV infection from an BK-PyV-infected donor  
15 to a recipient in need thereof by pretreating the graft.

Accordingly, in a first aspect the invention relates to a method of inactivating a BK Polyomavirus (BK-PyV) in cells or organ, comprising exposing cells or the organ to a composition comprising an isolated nucleic acid encoding a gene editing complex comprising  
20 a CRISPR-associated endonuclease and a guide RNA, wherein the guide RNA is complementary to a target nucleic acid sequence within the BK-PyV large T antigen (Ag-T) gene.

In particular, the invention relates to an isolated nucleic acid sequence encoding a gene editing complex comprising a sequence encoding a CRISPR-associated endonuclease and one  
25 or more guide RNA, wherein the guide RNA is complementary to a target nucleic acid sequence within the BK-PyV large tumor antigen (Ag-T) gene.

As used herein, the term "an isolated nucleic acid sequence" includes nucleic acids encoding a CRISPR-associated endonuclease, e.g., Cas9, and a guide RNA that is complementary to a target nucleic acid sequence within the Ag-T BK-PyV gene. An  
30 "isolated" nucleic acid can be, for example, a naturally-occurring DNA molecule or a fragment thereof, provided that at least one of the nucleic acid sequences normally found immediately flanking that DNA molecule in a naturally-occurring genome is removed or absent. Thus, an isolated nucleic acid includes, without limitation, a DNA molecule that exists as a separate molecule, independent of other sequences (e.g., a chemically synthesized nucleic

acid, or a cDNA or genomic DNA fragment produced by the polymerase chain reaction (PCR) or restriction endonuclease treatment). An isolated nucleic acid also refers to a DNA molecule that is incorporated into a vector, an autonomously replicating plasmid, a virus, or into the genomic DNA of a prokaryote or eukaryote. In addition, an isolated nucleic acid can include an engineered nucleic acid such as a DNA molecule that is part of a hybrid or fusion nucleic acid. A nucleic acid existing among many (e.g., dozens, or hundreds to millions) of other nucleic acids within, for example, cDNA libraries or genomic libraries, or gel slices containing a genomic DNA restriction digest, is not an isolated nucleic acid. Isolated nucleic acid molecules can be produced by standard techniques. For example, polymerase chain reaction (PCR) techniques can be used to obtain an isolated nucleic acid containing a nucleotide sequence described herein, including nucleotide sequences encoding a polypeptide described herein. PCR can be used to amplify specific sequences from DNA as well as RNA, including sequences from total genomic DNA or total cellular RNA. Various PCR methods are described in, for example, PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach and Dveksler, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Generally, sequence information from the ends of the region of interest or beyond is employed to design oligonucleotide primers that are identical or similar in sequence to opposite strands of the template to be amplified.

Various PCR strategies also are available by which site-specific nucleotide sequence modifications can be introduced into a template nucleic acid. Isolated nucleic acids also can be chemically synthesized, either as a single nucleic acid molecule (e.g., using automated DNA synthesis in the 3' to 5' direction using phosphoramidite technology) or as a series of oligonucleotides. For example, one or more pairs of long oligonucleotides (e.g., >50-100 nucleotides) can be synthesized that contain the desired sequence, with each pair containing a short segment of complementarity (e.g., about 15 nucleotides) such that a duplex is formed when the oligonucleotide pair is annealed. DNA polymerase is used to extend the oligonucleotides, resulting in a single, double-stranded nucleic acid molecule per oligonucleotide pair, which then can be ligated into a vector. The nucleic acid sequences of the invention include nucleic acids encoding a CRISPR-associated endonuclease, e.g., Cas9, and a guide RNA that is complementary to a target nucleic acid sequence within the Ag-T BK-PyV gene. The nucleic acid sequences of the invention include sequence encoding a guide RNA (gRNA) comprising a sequence that is complementary to a target nucleic acid sequence within the coding region of the large tumor antigen (Ag-T) gene.

As used herein, the term "BK Polyomavirus" (BK-PyV) refers to a viral genus of the viral family known as Polyomaviridae. It is a small double stranded DNA virus. The BK virus

genome consists of a non-coding control region National Coalition for Cancer Research (NCCR), the early coding region that transcribes the T antigen, and the late coding region, which codes for the viral capsid proteins (VP-1, VP-2, VP-3) and agnoprotein. The National Coalition for Cancer Research contains the origin of replication as well as enhancer elements that can modulate viral transcription. T antigen binds to tumor suppressor proteins Rb and p53, and initiates the cell cycle in host cells. VP-1, VP-2, and VP-3 are structural proteins that make up the viral capsid. VP-1 interacts with cellular receptors and promotes viral entry.

As used herein, the term “CRISPR-associated endonuclease” has its general meaning in the art and refers to clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated which are the segments of prokaryotic DNA containing short repetitions of base sequences. In bacteria the CRISPR/Cas loci encode RNA-guided adaptive immune systems against mobile genetic elements (viruses, transposable elements and conjugative plasmids). Three types (I-III) of CRISPR systems have been identified. CRISPR clusters contain spacers, the sequences complementary to antecedent mobile elements. CRISPR clusters are transcribed and processed into mature CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) RNA (crRNA). The CRISPR-associated endonuclease, Cas9, belongs to the type II CRISPR/Cas system and has strong endonuclease activity to cut target DNA. Cas9 is guided by a mature crRNA that contains about 20 base pairs (bp) of unique target sequence (called spacer) and a trans-activated small RNA (tracrRNA) that serves as a guide for ribonuclease III-aided processing of pre-crRNA. The crRNA:tracrRNA duplex directs Cas9 to target DNA via complementary base pairing between the spacer on the crRNA and the complementary sequence (called protospacer) on the target DNA. Cas9 recognizes a trinucleotide (NGG) protospacer adjacent motif (PAM) to specify the cut site (the 3rd nucleotide from PAM). The crRNA and tracrRNA can be expressed separately or engineered into an artificial fusion small guide RNA (sgRNA) via a synthetic stem loop to mimic the natural crRNA/tracrRNA duplex. Such sgRNA, like shRNA, can be synthesized or in vitro transcribed for direct RNA transfection or expressed from U6 or H1-promoted RNA expression vector, although cleavage efficiencies of the artificial sgRNA are lower than those for systems with the crRNA and tracrRNA expressed separately. In some embodiments, the CRISPR-associated endonuclease can be a Cas9 nuclease. The Cas9 nuclease can have a nucleotide sequence identical to the wild type *Streptococcus pyogenes* sequence. In some embodiments, the CRISPR-associated endonuclease can be a sequence from other species, for example other *Streptococcus species*, such as *thermophilus*; *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, or other sequenced bacteria genomes and archaea, or other prokaryotic microorganisms. Alternatively, the wild type



*Streptococcus pyrogenes* Cas9 sequence can be modified. The nucleic acid sequence can be codon optimized for efficient expression in mammalian cells, i.e., "humanized." A humanized Cas9 nuclease sequence can be for example, the Cas9 nuclease sequence encoded by any of the expression vectors listed in Genbank accession numbers KM099231.1 GL669193757; 5 KM099232.1 GL669193761; or KM099233.1 GL669193765. Alternatively, the Cas9 nuclease sequence can be for example, the sequence contained within a commercially available vector such as PX330 or PX260 from Addgene (Cambridge, MA). In some embodiments, the Cas9 endonuclease can have an amino acid sequence that is a variant or a fragment of any of the Cas9 endonuclease sequences of Genbank accession numbers 10 KM099231.1 GL669193757; KM099232.1; GL669193761; or KM099233.1 GL669193765 or Cas9 amino acid sequence of PX330 or PX260 (Addgene, Cambridge, MA). The Cas9 nucleotide sequence can be modified to encode biologically active variants of Cas9, and these variants can have or can include, for example, an amino acid sequence that differs from a wild type Cas9 by virtue of containing one or more mutations (e.g., an addition, deletion, or 15 substitution mutation or a combination of such mutations). One or more of the substitution mutations can be a substitution (e.g., a conservative amino acid substitution). For example, a biologically active variant of a Cas9 polypeptide can have an amino acid sequence with at least or about 50% sequence identity (e.g., at least or about 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to a wild type Cas9 polypeptide. 20 Conservative amino acid substitutions typically include substitutions within the following groups: glycine and alanine; valine, isoleucine, and leucine; aspartic acid and glutamic acid; asparagine, glutamine, serine and threonine; lysine, histidine and arginine; and phenylalanine and tyrosine. The Cas9 nuclease sequence can be a mutated sequence. For example the Cas9 nuclease can be mutated in the conserved FinH and RuvC domains, which are involved in 25 strand specific cleavage. For example, an aspartate-to-alanine (D10A) mutation in the RuvC catalytic domain allows the Cas9 nickase mutant (Cas9n) to nick rather than cleave DNA to yield single-stranded breaks, and the subsequent preferential repair through HDR can potentially decrease the frequency of unwanted indel mutations from off-target double-stranded breaks. The polypeptides that are biologically active variants of a CRISPR-associated endonuclease can be characterized in terms of the extent to which their sequence is 30 similar to or identical to the corresponding wild-type polypeptide. For example, the sequence of a biologically active variant can be at least or about 80% identical to corresponding residues in the wild-type polypeptide. For example, a biologically active variant of a CRISPR-associated endonuclease can have an amino acid sequence with at least or about

80% sequence identity (e.g., at least or about 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, or 99% sequence identity) to a CRISPR-associated endonuclease or to a homolog or ortholog thereof. A biologically active variant of a CRISPR-associated endonuclease polypeptide will retain sufficient biological activity to be useful in the present methods. The biologically active variants will retain sufficient activity to function in targeted DNA cleavage. The biological activity can be assessed in ways known to one of ordinary skill in the art and includes, without limitation, *in vitro* cleavage assays or functional assays.

As used herein, the term “gene editing” refers to a genetic engineering in which DNA is inserted, deleted or replaced in the genome of a living organism using engineered nucleases. In the context of the invention, the gene editing complex comprises a CRISPR-associated nuclease, e.g., Cas9, and a guide RNA complementary to the BK-PyV Ag-T target sequence, for example, within the ATG region of the BK-PyV Ag-T gene. The gene editing complex can introduce various mutations into the viral DNA. The mechanism by which such mutations inactivate the virus can vary, for example the mutation can affect viral replication, viral gene expression. The mutations may be located in regulatory sequences or structural gene sequences and result in defective production of BK-PyV. The mutation can comprise a deletion. The size of the deletion can vary from a single nucleotide base pair to about 10,000 base pairs. In some embodiments, the deletion can include all or substantially all of the viral sequence. In some embodiments the deletion can include the entire viral sequence. The mutation can comprise an insertion that is the addition of one or more nucleotide base pairs to the viral sequence. The size of the inserted sequence also may vary, for example from about one base pair to about 300 nucleotide base pairs. The mutation can comprise a point mutation, that is, the replacement of a single nucleotide with another nucleotide. Useful point mutations are those that have functional consequences, for example, mutations that result in the conversion of an amino acid codon into a termination codon or that result in the production of a nonfunctional protein.

As used herein, the term “one or more guide RNA” refers to the RNAs that guide the insertion or deletion of residues. In the context of the invention, the guide RNA is used for recruiting Cas9 to specific genomic loci. In some embodiments, the guide RNA can be a sequence complementary to a coding or a non-coding sequence. For example, the guide RNA can be sequence complimentary to an Ag-T BK-PyV sequence, such as a protein coding sequence or a regulatory sequence. Exemplary guide RNA sequence that target the Ag-T is shown in Table 1. In particular the guide RNA has the sequence comprises SEQ ID NO: 1 (= gRNA#1).

Name gRNA	Sequence 5'-3'	SED ID N°
gRNA#1	CCTTTGTCAGGGTGAAATTC	1

Table 1

In another embodiment, the guide RNA sequence comprises a sequence consisting of SEQ ID NO: 1.

The invention is not so limiting however, and the guide RNA sequences can be selected to target any variant or mutant BK-PyV sequence. In some embodiments, the guide RNA can include a variant sequence or quasi-species sequence. In some embodiments, the guide RNA can be a sequence corresponding to a sequence in the genome of the virus harbored by the subject undergoing treatment. Thus for example, the sequence of the particular Ag-T gene in the BK-PyV virus harbored by the subject can be obtained and guide RNAs complementary to the patient's particular sequences can be used. The guide RNA sequence can be a sense or anti-sense sequence. The complementary target sequence to the guide RNA sequence includes a proto-spacer adjacent motif (PAM) which is sensed by the Cas9. The sequence of the PAM can vary depending upon the specificity requirements of the CRISPR endonuclease used. In the CRISPR-Cas system derived from *S. pyogenes*, the target DNA typically immediately precedes a 5'-NGG proto-spacer adjacent motif (PAM). Thus, for the *S. pyogenes* Cas9, the PAM sequence can be AGG, TGG, CGG or GGG. Other Cas9 orthologs may have different PAM specificities. The specific sequence of the guide RNA may vary, but, regardless of the sequence, useful guide RNA sequences will be those that minimize off-target effects while achieving high efficiency and complete ablation of the BK-PyV genome. The length of the guide RNA sequence can vary from about 19 to about 60 or more nucleotides, for example about 19, about 20, about 21, about 22, about 23, about 24, about 25, about 26, about 27, about 28, about 29, about 30, about 31, about 32, about 33, about 34, about 35, about 36, about 37, about 38, about 39, about 40, about 45, about 50, about 55, about 60 or more nucleotides. Useful selection methods identify regions having extremely low homology between the foreign viral genome and host cellular genome including endogenous retroviral DNA, include bioinformatic screening using 12-bp+NGG target-selection criteria to exclude off-target human transcriptome or (even rarely) untranslated-genomic sites, Sanger sequencing and SURVEYOR assay, to identify and exclude potential off-target effects. The guide RNA sequence can be configured as a single sequence or as a combination of one or more different sequences, e.g., a multiplex configuration. Multiplex configurations can include combinations of two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, or more different guide RNAs.

In some embodiments, the RNA molecules e.g. crRNA, tracrRNA, gRNA are engineered to comprise one or more modified nucleobases. For example, known modifications of RNA molecules can be found, for example, in Genes VI, Chapter 9 ("Interpreting the Genetic Code"), Lewis, ed. (1997, Oxford University Press, New York),  
5 and Modification and Editing of RNA, Grosjean and Benne, eds. (1998, ASM Press, Washington DC). Modified RNA components include the following: 2'-O-methylcytidine; 5-methylcytidine; 5,2'-O-dimethylcytidine; 5-hydroxymethylcytidine; 5-formylcytidine; 3-methylcytidine; 2-thiocytidine; lysidine; 2'-O-methyluridine; 2-thiouridine; 2-thio-2'-O-methyluridine; 3,2'-O-dimethyluridine; 4-thiouridine; 5-methyl-2-thiouridine; 5-  
10 hydroxyuridine; 5-methoxyuridine; dihydrouridine; inosine; 2'-O-methyl inosine; 1-methyl inosine; and 1-methyl guanosine.

As used herein, the term "large tumor antigen (Ag-T) gene" refers to a gene that is believed to be essential for viral genome replication and late protein expression. The naturally occurring Ag-T protein have amino acid sequences as shown in UniProt Accession number  
15 P03071.

In another aspect, the invention relates to an expression vector comprising an isolated nucleic acid sequence of the invention as above-described.

When the nucleic acid sequences are administered in an expression vector, the guide  
20 RNAs can be encoded by a single vector. Alternatively, multiple vectors can be engineered to each include two or more different guide RNAs. Useful configurations will result in the cleavage and error-prone reparation of viral sequences resulting in the ablation of BK-PyV genome or of Ag-T protein expression. Thus, the use of one or more different guide RNAs promotes excision of the viral sequences between the cleavage sites recognized by the  
25 CRISPR endonuclease. The excised region can vary in size from a single nucleotide to several thousand nucleotides.

When the nucleic acid sequences are contained within an expression vector, the CRISPR endonuclease can be encoded by the same nucleic acid or vector as the guide RNA sequences. Alternatively or in addition, the CRISPR endonuclease can be encoded in a  
30 physically separate nucleic acid from the guide RNA sequences or in a separate vector.

Recombinant constructs are also provided herein and can be used to transform cells in order to express Cas9 and/or a guide RNA complementary to a target sequence in large-T gene. A recombinant nucleic acid construct comprises a nucleic acid encoding a Cas9 and/or a guide RNA complementary to a target sequence in BK-PyV Ag-T as described herein,

operably linked to a regulatory region suitable for expressing the Cas9 and/or a guide RNA complementary to a target sequence in BK-PyV gene in the cell. It will be appreciated that a number of nucleic acids can encode a polypeptide having a particular amino acid sequence. The degeneracy of the genetic code is well known in the art. For many amino acids, there is  
5 more than one nucleotide triplet that serves as the codon for the amino acid. For example, codons in the coding sequence for Cas9 can be modified such that optimal expression in a particular organism is obtained, using appropriate codon bias tables for that organism.

Vectors containing nucleic acids such as those described herein also are provided. A "vector" is a replicon, such as a plasmid, phage, or cosmid, into which another DNA segment  
10 may be inserted so as to bring about the replication of the inserted segment. Generally, a vector is capable of replication when associated with the proper control elements. Suitable vector backbones include, for example, those routinely used in the art such as plasmids, viruses, artificial chromosomes, BACs, YACs, or PACs. The term "vector" includes cloning and expression vectors, as well as viral vectors and integrating vectors. An "expression  
15 vector" is a vector that includes a regulatory region. A wide variety of host/expression vector combinations may be used to express the nucleic acid sequences described herein. Suitable expression vectors include, without limitation, plasmids and viral vectors derived from, for example, bacteriophage, baculo viruses, and retroviruses. Numerous vectors and expression systems are commercially available from such corporations as Novagen (Madison, WI),  
20 Clontech (Palo Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA), and Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA).

The vectors provided herein also can include, for example, origins of replication, scaffold attachment regions (SARs), and/or markers. A marker gene can confer a selectable phenotype on a host cell. For example, a marker can confer biocide resistance, such as  
25 resistance to an antibiotic (e.g., kanamycin, G418, bleomycin, or hygromycin). As noted above, an expression vector can include a tag sequence designed to facilitate manipulation or detection (e.g., purification or localization) of the expressed polypeptide. Tag sequences, such as green fluorescent protein (GFP), glutathione S-transferase (GST), polyhistidine, c-myc, hemagglutinin, or Flag™ tag (Kodak, New Haven, CT) sequences typically are expressed as a  
30 fusion with the encoded polypeptide. Such tags can be inserted anywhere within the polypeptide, including at either the carboxyl or amino terminus.

Additional expression vectors also can include, for example, segments of chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences. Suitable vectors include derivatives of SV40 and known bacterial plasmids, e.g., E. coli plasmids col El, pCRI,

pBR322, pMal-C2, pET, pGEX, pMB9 and their derivatives, plasmids such as RP4; phage DNAs, e.g., the numerous derivatives of phage 1, e.g., NM989, and other phage DNA, e.g., M13 and filamentous single stranded phage DNA; yeast plasmids such as the 2 $\mu$  plasmid or derivatives thereof, vectors useful in eukaryotic cells, such as vectors useful in insect or mammalian cells; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, such as plasmids that have been modified to employ phage DNA or other expression control sequences. Yeast expression systems can also be used. For example, the non-fusion pYES2 vector (XbaI, SphI, Shol, NotI, GstXI, EcoRI, BstXI, BamHI, Sad, KpnI, and HindIII cloning sites; Invitrogen) or the fusion pYESHisA, B, C (XbaI, SphI, Shol, NotI, BstXI, EcoRI, BamHI, Sad, KpnI, and HindIII cloning sites, N-terminal peptide purified with ProBond resin and cleaved with enterokinase; Invitrogen), to mention just two, can be employed according to the invention. A yeast two-hybrid expression system can also be prepared in accordance with the invention.

The vector can also include a regulatory region. The term "regulatory region" refers to nucleotide sequences that influence transcription or translation initiation and rate, and stability and/or mobility of a transcription or translation product. Regulatory regions include, without limitation, promoter sequences, enhancer sequences, response elements, protein recognition sites, inducible elements, protein binding sequences, 5' and 3' untranslated regions (UTRs), transcriptional start sites, termination sequences, polyadenylation sequences, nuclear localization signals, and introns.

As used herein, the term "operably linked" refers to positioning of a regulatory region and a sequence to be transcribed in a nucleic acid so as to influence transcription or translation of such a sequence. For example, to bring a coding sequence under the control of a promoter, the translation initiation site of the translational reading frame of the polypeptide is typically positioned between one and about fifty nucleotides downstream of the promoter. A promoter can, however, be positioned as much as about 5,000 nucleotides upstream of the translation initiation site or about 2,000 nucleotides upstream of the transcription start site. A promoter typically comprises at least a core (basal) promoter. A promoter also may include at least one control element, such as an enhancer sequence, an upstream element or an upstream activation region (UAR). The choice of promoters to be included depends upon several factors, including, but not limited to, efficiency, selectability, inducibility, desired expression level, and cell- or tissue-preferential expression. It is a routine matter for one of skill in the art to modulate the expression of a coding sequence by appropriately selecting and positioning promoters and other regulatory regions relative to the coding sequence.

Vectors include, for example, viral vectors (such as adenoviruses ("Ad"), adeno-associated viruses (AAV), and vesicular stomatitis virus (VSV) and retroviruses), liposomes and other lipid-containing complexes, and other macromolecular complexes capable of mediating delivery of a polynucleotide to a host cell. Vectors can also comprise other components or functionalities that further modulate gene delivery and/or gene expression, or that otherwise provide beneficial properties to the targeted cells.

A "recombinant viral vector" refers to a viral vector comprising one or more heterologous gene products or sequences. Since many viral vectors exhibit size-constraints associated with packaging, the heterologous gene products or sequences are typically introduced by replacing one or more portions of the viral genome. Such viruses may become replication-defective, requiring the deleted function(s) to be provided in trans during viral replication and encapsidation (by using, e.g., a helper virus or a packaging cell line carrying gene products necessary for replication and/or encapsidation). Modified viral vectors in which a polynucleotide to be delivered is carried on the outside of the viral particle have also been described (see, e.g., Curiel, D T, et al. PNAS 88: 8850-8854, 1991).

Suitable nucleic acid delivery systems include recombinant viral vector, typically sequence from at least one of an adenovirus, adenovirus-associated virus (AAV), helper-dependent adenovirus, retrovirus, or hemagglutinating virus of Japan-liposome (HVJ) complex. In some embodiments, the vector is an AAV vector. As used herein, the term "AAV vector" means a vector derived from an adeno-associated virus serotype, including without limitation, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, and mutated forms thereof. AAV vectors can have one or more of the AAV wild-type genes deleted in whole or part, preferably the rep and/or cap genes, but retain functional flanking ITR sequences. Retroviruses may be chosen as gene delivery vectors due to their ability to integrate their genes into the host genome, transferring a large amount of foreign genetic material, infecting a broad spectrum of species and cell types and for being packaged in special cell-lines. In order to construct a retroviral vector, a nucleic acid encoding a gene of interest is inserted into the viral genome in the place of certain viral sequences to produce a virus that is replication-defective. In order to produce virions, a packaging cell line is constructed containing the gag, pol, and/or env genes but without the LTR and/or packaging components. When a recombinant plasmid containing a cDNA, together with the retroviral LTR and packaging sequences is introduced into this cell line (by calcium phosphate precipitation for example), the packaging sequence allows the RNA transcript of the recombinant plasmid to be packaged into viral particles, which are then secreted into the

culture media. The media containing the recombinant retroviruses is then collected, optionally concentrated, and used for gene transfer. Retroviral vectors are able to infect a broad variety of cell types. Lentiviruses are complex retroviruses, which, in addition to the common retroviral genes gag, pol, and env, contain other genes with regulatory or structural function.

5 The higher complexity enables the virus to modulate its life cycle, as in the course of latent infection. Some examples of lentivirus include the Human Immunodeficiency Viruses (HIV 1, HIV 2) and the Simian Immunodeficiency Virus (SIV). Lentiviral vectors have been generated by multiply attenuating the HIV virulence genes, for example, the genes env, vif, vpr, vpu and nef are deleted making the vector biologically safe. Lentiviral vectors are known

10 in the art, see, e.g., U.S. Pat. Nos. 6,013,516 and 5,994,136, both of which are incorporated herein by reference. In general, the vectors are plasmid-based or virus-based, and are configured to carry the essential sequences for incorporating foreign nucleic acid, for selection and for transfer of the nucleic acid into a host cell. The gag, pol and env genes of the vectors of interest also are known in the art. Thus, the relevant genes are cloned into the

15 selected vector and then used to transform the target cell of interest. Recombinant lentivirus capable of infecting a non-dividing cell wherein a suitable host cell is transfected with two or more vectors carrying the packaging functions, namely gag, pol and env, as well as rev and tat is described in U.S. Pat. No. 5,994,136, incorporated herein by reference. This describes a first vector that can provide a nucleic acid encoding a viral gag and a pol gene and another

20 vector that can provide a nucleic acid encoding a viral env to produce a packaging cell. Introducing a vector providing a heterologous gene into that packaging cell yields a producer cell which releases infectious viral particles carrying the foreign gene of interest. The env preferably is an amphotropic envelope protein that allows transduction of cells of human and other species. Typically, the nucleic acid molecule or the vector of the present invention

25 include "control sequences", which refers collectively to promoter sequences, polyadenylation signals, transcription termination sequences, upstream regulatory domains, origins of replication, internal ribosome entry sites ("IRES"), enhancers, and the like, which collectively provide for the replication, transcription and translation of a coding sequence in a recipient cell. Not all of these control sequences need always be present so long as the

30 selected coding sequence is capable of being replicated, transcribed and translated in an appropriate host cell. Another nucleic acid sequence, is a "promoter" sequence, which is used herein in its ordinary sense to refer to a nucleotide region comprising a DNA regulatory sequence, wherein the regulatory sequence is derived from a gene which is capable of binding RNA polymerase and initiating transcription of a downstream (3'-direction) coding sequence.



Transcription promoters can include "inducible promoters" (where expression of a polynucleotide sequence operably linked to the promoter is induced by an analyte, cofactor, regulatory protein, etc.), "repressible promoters" (where expression of a polynucleotide sequence operably linked to the promoter is induced by an analyte, cofactor, regulatory protein, etc.), and "constitutive promoters".

In another aspect, the invention relates to a composition comprising an isolated nucleic acid sequence encoding a gene editing complex comprising a sequence encoding a CRISPR-associated endonuclease and one or more guide RNA, wherein the guide RNA is complementary to a target nucleic acid sequence within the BK-PyV Ag-T gene as above-described or an expression vector comprising thereof.

Alternatively, the invention relates to a composition comprising a CRISPR-associated endonuclease and an isolated nucleic acid sequence encoding one or more guide RNA, wherein the guide RNA is complementary to a target nucleic acid sequence within the BK-PyV Ag-T gene as above-described.

When the CRISPR-associated endonuclease such as Cas9 is administered as a polypeptide, the bonds between the amino acid residues can be conventional peptide bonds or another covalent bond (such as an ester or ether bond), and the polypeptides can be modified by amidation, phosphorylation or glycosylation. A modification can affect the polypeptide backbone and/or one or more side chains. Chemical modifications can be naturally occurring modifications made *in vivo* following translation of an mRNA encoding the polypeptide (e.g., glycosylation in a bacterial host) or synthetic modifications made *in vitro*. A biologically active variant of a CRISPR-associated endonuclease can include one or more structural modifications resulting from any combination of naturally occurring (i.e., made naturally *in vivo*) and synthetic modifications (i.e., naturally occurring or non-naturally occurring modifications made *in vitro*). Examples of modifications include, but are not limited to, amidation (e.g., replacement of the free carboxyl group at the C-terminus by an amino group); biotinylation (e.g., acylation of lysine or other reactive amino acid residues with a biotin molecule); glycosylation (e.g., addition of a glycosyl group to either asparagines, hydroxylysine, serine or threonine residues to generate a glycoprotein or glycopeptide); acetylation (e.g., the addition of an acetyl group, typically at the N-terminus of a polypeptide); alkylation (e.g., the addition of an alkyl group); isoprenylation (e.g., the addition of an isoprenoid group); lipoylation (e.g. attachment of a lipoate moiety); and phosphorylation (e.g., addition of a phosphate group to serine, tyrosine, threonine or histidine).

The amino acid residues in the CRISPR-associated endonuclease sequence such as in the Cas9 amino acid sequence can be non-naturally occurring amino acid residues. Naturally occurring amino acid residues include those naturally encoded by the genetic code as well as non-standard amino acids (e.g., amino acids having the D-configuration instead of the L-configuration). The polypeptides can also include amino acid residues that are modified versions of standard residues (e.g. pyrrolysine can be used in place of lysine and selenocysteine can be used in place of cysteine). Non-naturally occurring amino acid residues are those that have not been found in nature, but that conform to the basic formula of an amino acid and can be incorporated into a polypeptide.

5

In another aspect, the invention relates to a method of inactivating a BK-PyV in a cell, comprising exposing cells to a composition comprising an isolated nucleic acid encoding a gene editing complex comprising a CRISPR-associated endonuclease and one or more guide RNA, wherein the guide RNA is complementary to a target nucleic acid sequence within the BK-PyV Ag-T gene.

10

In still another aspect, the invention relates to a method of inactivating a BK-PyV in a cell, comprising exposing cells to a composition comprising a CRISPR-associated endonuclease and one or more guide RNA, wherein the guide RNA is complementary to a target nucleic acid sequence within the BK-PyV Ag-T gene.

15

The methods can include exposing cells to a composition comprising an isolated nucleic acid encoding a gene editing complex comprising a CRISPR-associated endonuclease and one or more guide RNAs wherein the guide RNA is complementary to a target nucleic acid sequence in the BK-PyV Ag-T gene. The contacting step can take place *in vivo*, that is, the compositions can be administered directly to a subject having BK-PyV infection. The methods are not so limited however, and the contacting step can take place *ex vivo*. For example, a cell or plurality of cells, or a tissue explant or a graft, can be removed from a donor having an BK-PyV infection and placed in culture, and then contacted with a composition comprising a CRISPR-associated endonuclease and a guide RNA wherein the guide RNA is complementary to the nucleic acid sequence in the BK-PyV Ag-T gene. As described above, composition can be a nucleic acid encoding a CRISPR-associated endonuclease and a guide RNA wherein the guide RNA is complementary to the nucleic acid sequence in the BK-PyV Ag-T gene; an expression vector comprising the nucleic acid

20

25

30

sequence; or a pharmaceutical composition comprising a nucleic acid encoding a CRISPR-associated endonuclease and a guide RNA wherein the guide RNA is complementary to the nucleic acid sequence in the BK-PyV Ag-T gene; or an expression vector comprising the nucleic acid sequence. In some embodiments, the gene editing complex can comprise a  
5 CRISPR-associated endonuclease polypeptide and a guide RNA wherein the guide RNA is complementary to the nucleic acid sequence in the BK-PyV Ag-T gene.

In one embodiment, the method further comprises treating said cells, tissue or organ with a therapeutically effective amount of an anti-BK-PyV agent.

10 In a particular embodiment, the anti- BK-PyV agent is selected from the group consisting of Leflunomide, Cidofovir and Ciprofloxacin or injection of T-cell therapy.

Regardless of whether compositions are administered as nucleic acids or polypeptides, they are formulated in such a way as to promote uptake by the human cell. Useful vector  
15 systems and formulations are described above. In some embodiments the vector can deliver the compositions to a specific cell type. The invention is not so limited however, and other methods of DNA delivery such as chemical transfection, using, for example calcium phosphate, DEAE dextran, liposomes, lipoplexes, surfactants, and perfluoro chemical liquids are also contemplated, as are physical delivery methods, such as electroporation, micro  
20 injection, ballistic particles, and "gene gun" systems.

Standard methods, for example, immunoassays to detect the CRISPR-associated endonuclease, or nucleic acid-based assays such as PCR to detect the gRNA, can be used to confirm that the complex has been taken up and expressed by the cell into which it has been  
25 introduced. The engineered cells can then be reintroduced into the subject from whom they were derived as described below.

In other embodiments, the compositions comprise a cell which has been transformed or transfected with one or more Cas9/gRNA vectors. In some embodiments, the methods of the invention can be applied *ex vivo*. That is, a donor's graft or donor's cells can be removed from the body and treated/perfused/ cultured with the compositions to excise/ knock-out BK-  
30 PyV sequences and the treated organ grafted or the cultured cells injected to the recipient's body. The cells can be the subject's cells or they can be haplotype matched or a cell line. The cells can be irradiated to prevent replication. In some embodiments, the cells are human leukocyte antigen (HLA)-matched, autologous, cell lines, or combinations thereof. In other embodiments the cells can be stem cells. For example, embryonic stem cells or artificial

pluripotent stem cells (induced pluripotent stem cells (iPS cells)). Embryonic stem cells (ES cells) and artificial pluripotent stem cells (induced pluripotent stem cell, iPS cells) have been established from many animal species, including humans. These types of pluripotent stem cells would be the most useful source of cells for regenerative medicine because these cells are capable of differentiation into almost all of the organs by appropriate induction of their differentiation, with retaining their ability of actively dividing while maintaining their pluripotency. iPS cells, in particular, can be established from self-derived somatic cells, and therefore are not likely to cause ethical and social issues, in comparison with ES cells which are produced by destruction of embryos. Further, iPS cells, which are self-derived cell, make it possible to avoid rejection reactions, which are the biggest obstacle to regenerative medicine or transplantation therapy.

Transduced cells are prepared for reinfusion according to established methods. After a period of about 2-4 weeks in culture, the cells may number between  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^{10}$ . In this regard, the growth characteristics of cells vary from patient to patient and from cell type to cell type. About 72 hours prior to reinfusion of the transduced cells, an aliquot is taken for analysis of phenotype, and percentage of cells expressing the therapeutic agent. For administration, cells of the invention can be administered at a rate determined by the LD<sub>50</sub> of the cell type, and the side effects of the cell type at various concentrations, as applied to the mass and overall health of the patient. Administration can be accomplished via single or divided doses. Adult stem cells may also be mobilized using exogenously administered factors that stimulate their production and egress from tissues or spaces that may include, but are not restricted to, bone marrow or adipose tissues.

In another aspect, the invention relates to a method of reducing the risk of the transmission of a BK-PyV infection from an BK-PyV-infected donor to a recipient in need thereof, comprising treating cells, tissue or organ obtained from said donor with a therapeutically effective amount of at least one isolated nucleic acid sequence of the invention.

In the context of the invention, the risk of transmission of BK-PyV infection shall be reduced. The term "reducing the risk", as used herein, refers to minimizing the probability according to which the recipient as referred to herein will be infected by BK-PyV virus during a transplantation.

As used herein, the term "transmission" refers to a step of passing of a pathogen causing communicable disease from an infected host individual or group to a particular

individual or group, regardless of whether the other individual was previously infected. There are different types of transmission, for example airborne, droplet, fecal-oral, sexual, oral sexual, oral, direct contact etc. In a particular embodiment, the subjects who are transplanted are under immunosuppression treatment, accordingly, they are susceptible to have the transmission of BK-PyV virus than a healthy subject.

In one embodiment, the method further comprises treating said cells, tissue or organ with a therapeutically effective amount of an anti-BK-PyV agent.

In a particular embodiment, the anti-BK-PyV agent is selected from the group consisting of Leflunomide, Cidofovir and Ciprofloxacin or injection of T-cell therapy.

In a particular embodiment, the invention relates to a method of preventing or treating BK Polyomavirus (BK-PyV) infection in a subject in need thereof, comprising a step of administering said subject with a therapeutically effective amount of at least one isolated nucleic acid sequence of the invention which is inserted or not into a vector.

As used herein, the terms "treating" or "treatment" refer to both prophylactic or preventive treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of subject at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as subject who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of such treatment. By "therapeutic regimen" is meant the pattern of treatment of an illness, e.g., the pattern of dosing used during therapy. A therapeutic regimen may include an induction regimen and a maintenance regimen. The phrase "induction regimen" or "induction period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a subject during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a "loading regimen", which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen, administering a drug more frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase "maintenance regimen" or "maintenance period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a subject during treatment of an illness, e.g., to keep the subject in remission for long periods of time (months or years). A

maintenance regimen may employ continuous therapy (e.g., administering a drug at a regular intervals, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., pain, disease manifestation, etc.]).

5           As used herein, the term “subject” refers to any mammals, such as a rodent, a feline, a canine, and a primate. Particularly, in the present invention, the subject is a human having a BK-PyV infection or is at risk for contracting a BK-PyV infection. In a particular embodiment, the subject is a transplanted subject.. The term “transplanted subject” also called as grafted subject or recipient, refers to a subject who has received either an organ  
10 transplantation or cells transplantation. In a particular embodiment, the invention is suitable when the virus BK-PyV is reactivated in transplanted subject The term “transplantation” refers to the procedure of replacing diseased organs, parts of organs, tissues, or cells by healthy organs, tissues, or cells. The transplanted organ, tissue or cells can be obtained either from the subject himself (= autograft), from another human donor (= allograft) or from an  
15 animal (= xenograft). Transplanted organs may be artificial or natural, whole (such as kidney, heart and liver, hematopoietic stem cells) or partial (such as heart valves, skin and bone).

By a "therapeutically effective amount" is meant a sufficient amount of the isolated nucleic acid (or the vector containing the isolated nucleic acid) to prevent for use in a transplanted cases at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will  
20 be understood that the total daily usage of the compounds and compositions of the present invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular patient will depend upon a variety of factors including the age, body weight, general health, sex and diet of the patient; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the  
25 specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific polypeptide employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well known within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage  
30 of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Preferably, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the patient to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, preferably from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient.

An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 100 mg/kg of body weight per day.

The compositions of the invention can be prepared in a variety of ways known to one of ordinary skill in the art. Regardless of their original source or the manner in which they are obtained, the compositions of the invention can be formulated in accordance with their use. For example, the nucleic acids and vectors described above can be formulated within compositions for application to cells in tissue culture or for administration to a patient or subject. Any of the pharmaceutical compositions of the invention can be formulated for use in the preparation of a medicament, and particular uses are indicated below in the context of treatment, e.g., the. When employed as pharmaceuticals, any of the nucleic acids and vectors can be administered in the form of pharmaceutical compositions. These compositions can be prepared in a manner well known in the pharmaceutical art, and can be administered by a variety of routes, depending upon whether local or systemic treatment is desired and upon the area to be treated. Administration may be topical (including ophthalmic and to mucous membranes including intranasal, vaginal, intravesical and rectal delivery), pulmonary {e.g., by inhalation or insufflation of powders or aerosols, including by nebulizer; intratracheal, intranasal, epidermal and transdermal), ocular, oral or parenteral. Parenteral administration includes intravenous, intraarterial, subcutaneous, intraperitoneal or intramuscular intravesical injection or infusion; or intracranial, e.g., intrathecal or intraventricular administration. Also the administration can be done *ex vivo*, i.e. during the perfusion of the transplanted organ.

Parenteral administration can be in the form of a single bolus dose, or may be, for example, by a continuous perfusion pump. Pharmaceutical compositions and formulations for topical administration may include transdermal patches, ointments, lotions, creams, gels, drops, suppositories, sprays, liquids, powders, and the like. Conventional pharmaceutical carriers, aqueous, powder or oily bases, thickeners and the like may be necessary or desirable. This invention also includes pharmaceutical compositions which contain, as the active ingredient, nucleic acids and vectors described herein in combination with one or more pharmaceutically acceptable carriers. As used herein, the terms "pharmaceutically acceptable" (or "pharmacologically acceptable") refer to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to an animal or a human, as appropriate. The term "pharmaceutically acceptable carrier," as used herein, includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial, isotonic and absorption delaying agents, buffers, excipients, binders, lubricants, gels, surfactants and the like, that may be used as media for a pharmaceutically acceptable substance. In making the

compositions of the invention, the active ingredient is typically mixed with an excipient, diluted by an excipient or enclosed within such a carrier in the form of, for example, a capsule, tablet, sachet, paper, or other container. When the excipient serves as a diluent, it can be a solid, semisolid, or liquid material (e.g., normal saline), which acts as a vehicle, carrier or medium for the active ingredient. As is known in the art, the type of diluent can vary depending upon the intended route of administration. The nucleic acid sequences of the invention can be delivered to an appropriate cell of a subject. This can be achieved by, for example, the use of a polymeric, biodegradable microparticle or microcapsule delivery vehicle, sized to optimize phagocytosis by phagocytic cells such as macrophages. For example, PLGA (poly-lacto-co-glycolide) microparticles approximately 1-10  $\mu\text{m}$  in diameter can be used. The polynucleotide is encapsulated in these microparticles, which are taken up by macrophages and gradually biodegraded within the cell, thereby releasing the polynucleotide. Once released, the DNA is expressed within the cell. A second type of microparticle is intended not to be taken up directly by cells, but rather to serve primarily as a slow-release reservoir of nucleic acid that is taken up by cells only upon release from the micro-particle through biodegradation. These polymeric particles should therefore be large enough to preclude phagocytosis (i.e., larger than  $5\mu\text{m}$  and preferably larger than  $20\mu\text{m}$ ). Another way to achieve uptake of the nucleic acid is using liposomes, prepared by standard methods. The nucleic acids can be incorporated alone into these delivery vehicles or co-incorporated with tissue-specific antibodies. Alternatively, one can prepare a molecular complex composed of a plasmid or other vector attached to poly-L-lysine by electrostatic or covalent forces. Poly-L-lysine binds to a ligand that can bind to a receptor on target cells. Delivery of "naked DNA" (i.e., without a delivery vehicle) to an intramuscular, intradermal,, intravesical or subcutaneous site, is another means to achieve in vivo expression. In the relevant polynucleotides (e.g., expression vectors) the nucleic acid sequence encoding an isolated nucleic acid sequence comprising a sequence encoding a CRISPR-associated endonuclease and a guide RNA is operatively linked to a promoter or enhancer-promoter combination.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.



**FIGURES:**

**Figure 1: gRNA anti-BK efficiently cuts ag-T PCR product.** Purified anti-BK gRNA and Cas9 are mixed 10min at 37°C and then incubated 1Hour at 37°C with Ag-T PCR amplicon.

5 **Figure 2: Anti-BK gRNA CAS9 transduced HRPTEC cells are protected from BK-PyV infection and produced less viral progenies.** A) HRPTEC cells transduced or not with lentiviral vectors are infected with BK-PyV during two hours and analysed seven days later for the expression of Ag-T. B) those cells were then subjected to freeze and thaw cycles, supernatants were then placed over a monolayer of HRPTEC for trans infection  
10 experiment. Expression of Ag-T is shown three days later.

**Material & Methods**

*Design and cloning of gRNA:* gRNA targeting the BK-PyV Ag-T gene was designed  
15 following Mali *et al.* 2013, GN<sub>(19-21)</sub>GG to be as close as possible to the ATG of the Ag-T gene (gRNA#1). gRNA#1 was cloned in the pX330 from Addgene (CRISPR pX330-U6-(gRNA)-FLAGXnlsCas9nls) as previously described.

Selected gRNA is working with the spCas9 (*Cas9 Nuclease, S. pyogenes*).

20 **Table 1: Information regarding the selected gRNA anti-BK-PyV:**

Name	Sequence 5'-3' (short trinucleotide protospacer adjacent motif ( <b>PAM</b> ))	Strand
gRNA#1	CCCCCTTTGTCAGGGTGAAATTC	-

*Validation of the gRNA:* gRNA was cloned in the pX330 and retrotranscribed thanks to floating primers with T7 promoters. PCR amplification with T7 floating primers and lower  
25 primer were done using the MEGA Short Script (Life technology) according to the manufacture protocol. gRNA was then purified using the kit MegaClear (Ambion) according to the manufacture protocol, and were validated using the Cas9 Nuclease #M0386S (NEB) on a PCR product harboring the target site.

gRNA was then cloned into a plasmid allowing the production of lentivirus.

30 *Cells and virus:* HRPTEC cells cultured in P24-well in EpiCM 5% Fetal bovine serum (FBS) and in EpiCM 0.5% FBS for the transduction with lentiviral vector encoding

gRNA#1/Cas9-GFP at a MOI of five. Six hours after transduction, HRPTEC were again cultured in EpiCM 5% FBS. Percentage of transduced cells was assessed by FACS two days later based on their GFP expression. Two days' post transduction, cells were BK-PyV infected at a MOI of 0.1 during 6 hours and then cultured in fresh medium

5

*Trans-infection experiments:* seven days post-BK-PyV infection, transduced HRPTEC and their supernatant were harvested and subject to three freeze/thaw cycles of one hour each. Then lysate was centrifuged 15 minutes at 5000rpm 4°C, supernatant was then put over new non-transduced HRPTEC layer.

10

*Ag-T staining:* three days' post infection or trans-infection, HRPTEC were fixed and permeabilized 20min at -20°C in 100% Methanol, saturated in PBS 3% FBS 0.1% Tween20 30 min at room temperature (RT) and stained for Ag-T with pAb416 Ab 1 hour at RT. Cells were washed with PBS and anti-mouse IgG Alexa Fluor 568 was used to reveal the primary Ab for 40 minutes at RT. The percentage of Ag-T positive cells is calculated with a HCS  
15 Arrayscan device.

## **Results**

*gRNA is efficient on PCR product:* the selected gRNA was retrotranscribed and mixed with Cas9 and a PCR product harboring the target site for two hours at RT to validate their efficiency. gRNA was functional as shown by the digestion of the PCR product (Figure  
20 1).

### ***gRNA efficient affects BK-PyV infection and virus cycle.***

Our lentiviral vector encoding our strategy efficiently transduced HRPTEC cell, same is true for the control only harboring the Cas9 without gRNA. Two days later, cells were  
25 BKPyV-infected and then cultured for three days. As shown in Figure 2A, five percent of non-treated cells (No Tr), infected with BK-PyV are positively stained for Ag-T. Seven percent of HRPTEC transduced with Cas9-GFP control lentiviral vector (LV) were infected with the BK-PyV as revealed by the Ag-T staining. Finally, when HRPTEC cells are transduced with lentiviral vector harboring the anti-BK-gRNA and the Cas9 only 1.5 percent  
30 of the cells are Ag-T positive.

HRPTEC cells, transduced or not with LV anti-BK Cas9-GFP or with LV Cas9-GFP are then infected with BK-PyV, then we used those cells to assess the effect of our strategy on viral progenies as mentioned in the method section with a trans infection protocol. As shown in Figure 2B, non-transduced HRPTEC and HRPTEC transduced with Cas9-GFP alone

produce viral progenies allowing the transinfection of 30% of the cells. When HRPTEC were transduced with our anti-BK Cas9-GFP strategy, only 5% of the cells were trans-infected. In conclusion, our strategy efficiently targets BK-PyV genome and affects the production of new virions. This small amount of viral production might be due to the fact that not all HRPTEC  
5 cells were transduced with our LV anti-BK Cas9-GFP.

### **REFERENCES:**

Throughout this application, various references describe the state of the art to which  
10 this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM;  
RNA-guided human genome engineering via Cas9; Science. 2013 Feb 15;339(6121):823-6.

15

**CLAIMS:**

- 5 1. A method of inactivating a BK Polyomavirus (BK-PyV) in cells or organ, comprising exposing the cell or the organ to a composition comprising an isolated nucleic acid encoding a gene editing complex comprising a CRISPR-associated endonuclease and a guide RNA, wherein the guide RNA is complementary to a target nucleic acid sequence within the BK-PyV large T antigen (Ag-T) gene.
- 10 2. The method of claim 1, wherein the guide RNA sequence comprises a sequence consisting of SEQ ID NO: 1.
3. The method of claim 1 or 2, wherein the cell is an infected cell or an infected organ.
4. The method of any of claims 1-3, wherein the inactivating is *in vivo*.
5. The method of any of claims 1-3, wherein the inactivating is *ex vivo*.
- 15 6. The method of claim 5, wherein the cell/organ comprises cultured cells, tissue or organ obtained from a donor having a BK-PyV infection or to an individual BKPyV infected whose BK-PyV damaged-organ can be targeted directly *in vivo*.
7. The method of claim 6, wherein the cultured cells, tissue or organ obtained from the donor is transplanted into a recipient following the exposing step.
- 20 8. The method of any of claims 1-7, wherein the gene editing complex introduces one or more mutations in the proviral DNA (e.g. a deletion, an insertion, or a point mutation) and wherein the mutation inactivates viral replication or viral gene expression.
- 25 9. An isolated nucleic acid sequence encoding a gene editing complex comprising a CRISPR-associated endonuclease and one or more guide RNA, wherein the guide RNA is complementary to a target nucleic acid sequence within the BK-PyV Ag-T gene.
10. The isolated nucleic acid sequence of claim 9, wherein the guide RNA has the sequence comprising or consisting of SEQ ID NO: 1 (= gRNA#1).

11. An expression vector comprising the nucleic acid sequence of claim 9 or 10.
12. A composition comprising the nucleic acid sequence of claim 9 or 10, or the expression vector of claim 11.
13. A method of reducing the risk of the transmission of a BK-PyV infection from a BK-PyV- infected donor to a recipient in need thereof, comprising treating cells, tissue or organ obtained from said donor with a therapeutically effective amount of at least one isolated nucleic acid sequence of claim 9.
14. The method of claim 14, further comprising treating said cells, tissue or organ with a therapeutically effective amount of an anti-BK-PyV agent selected from the group consisting of Leflunomide, Cidofovir and Ciprofloxacin or injection of T-cell therapy.
15. A method of preventing or treating BK Polyomavirus (BK-PyV) infection in a subject in need thereof, comprising a step of administering said subject with a therapeutically effective amount of at least one isolated nucleic acid sequence according to claim 9 which is inserted or not into a vector.

5

10

15

20

25

30

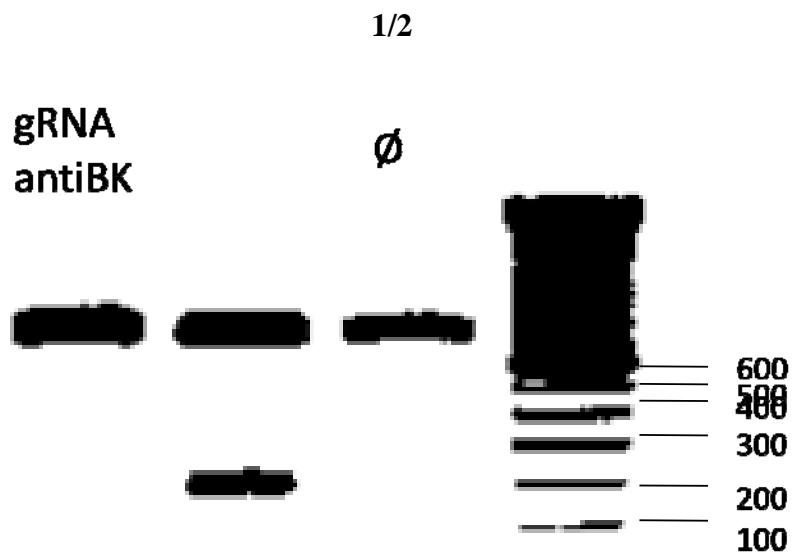
**ABSTRACT OF THE INVENTION**

**METHODS AND COMPOSITIONS FOR RNA-GUIDED TREATMENT OF HUMAN  
BK POLYOMA VIRUS (BK-PyV) INFECTION**

5

The invention relates to methods and compositions for treatment of BK-PyV infection. The compositions include isolated nucleic acid sequences comprising a CRISPR-associated endonuclease and a guide RNA, wherein the guide RNA is complementary to a particular target sequence in the BK-PyV genome.

10



**Figure 1**

A

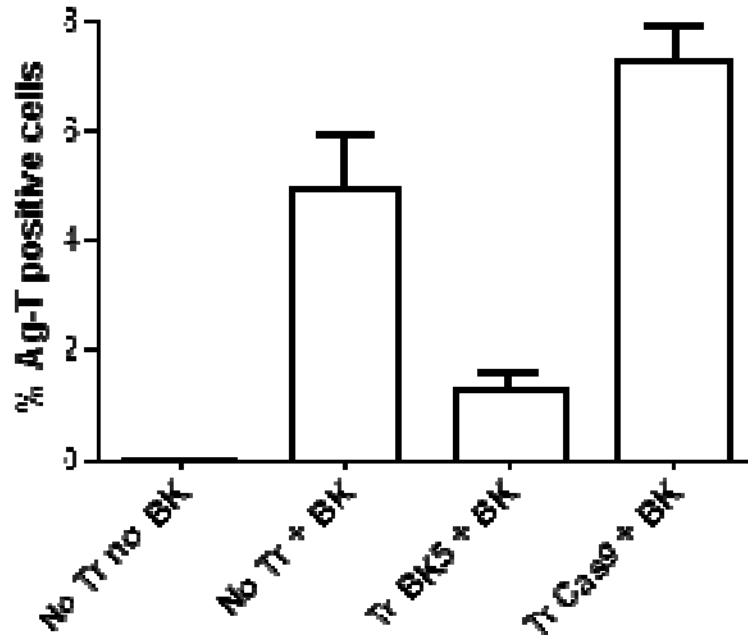


Figure 2A

B

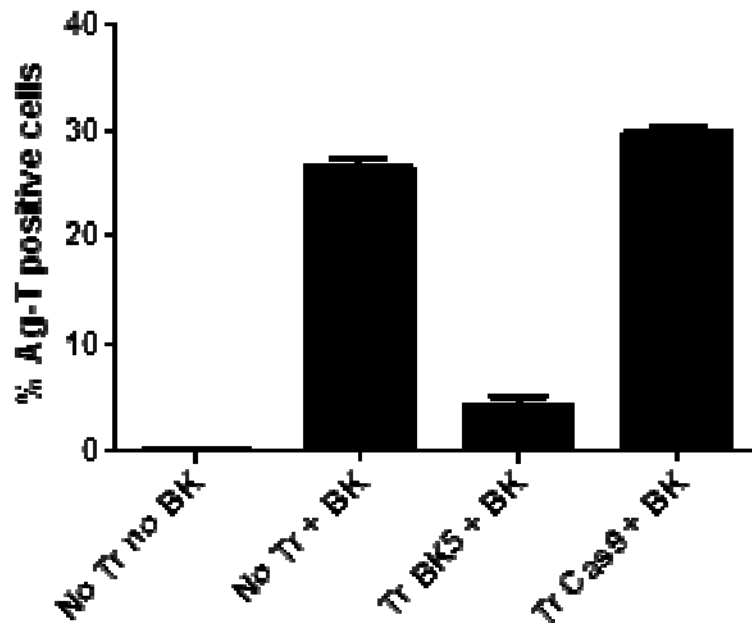


Figure 2B





# Thèse de Doctorat

Mathieu SIKORSKI

## De l'implication des cellules dendritiques myéloïdes humaines dans la physiopathologie de l'infection à polyomavirus BK

Of human myeloid dendritic cells involvement into pathophysiology of the BK polyomavirus infection

### Résumé

Le polyomavirus BK (BKPyV) est un virus ubiquitaire humain infectant environ 80% de la population mondiale. La primo-infection conduit à une persistance du virus à bas bruit dans les epithelia rénaux-urinaire. Le virus peut rester ainsi tout au long de la vie de l'individu infecté sans causer de complications. C'est un virus de l'immunodéprimé : il est la première cause d'origine infectieuse de perte de greffon chez les patients transplantés rénaux, qui reçoivent un traitement immunosuppresseur pour diminuer les risques de rejet. Chez ces patients, il se réactive et se réplique activement, causant une maladie appelée néphropathie associée au polyomavirus (PVAN). Pendant des étapes précoces de cette pathologie, le virus est retrouvé dans le sang des patients, on parle de virémie. Son maintien est corrélé à un mauvais pronostic pour les patients. Le génome du BKPyV a été détecté dans les cellules immunitaires sanguines, sans pour autant identifier une population cellulaire particulière comme porteuse du génome.

Les cellules dendritiques myéloïdes (mDC), des acteurs primordiaux de l'induction et la polarisation des réponses immunes, ont été mises en évidence dans le rein, à proximité des sites de réactivation du BKPyV. Aussi, il a été montré que ces cellules infiltraient spécifiquement le rein lors d'une PVAN, sans pour autant qu'un rôle leur soit attribué. Enfin, elles ont été montrées comme étant détournées de leur fonction initiale par plusieurs virus pour aider leur infection. Basé sur ces arguments, nous avons posé la question d'une implication des mDC dans la sortie du virus du rein, conduisant *in fine* à l'établissement de la virémie. En testant cette hypothèse, nous avons mis en évidence la capacité des mDC humaines à fixer, internaliser et transmettre le BKPyV à des cellules permissives. Étonnamment, cette interaction ne conduit pas à la maturation des mDC immatures, posant la question d'un éventuel mécanisme d'échappement immunitaire lié au virus. Une étude plus approfondie chez des patients transplantés rénaux permettra de clarifier d'autant plus le rôle que peuvent avoir ces cellules dans cette infection.

### Mots clés

Transplantation rénale, interaction hôte-pathogène, polyomavirus BK, cellules dendritiques

### Abstract

The BK polyomavirus (BKPyV) is a ubiquitous human virus infecting 80% of the worldwide population. The primo-infection leads to a low-level and long-lasting persistence of the virus in the reno-urinary epithelia. The BKPyV reactivates in immunocompromised individuals like HIV-diseased patients or allograft recipients. It is the first infectious cause of graft loss in kidney transplanted (KTx) patients who receive immunosuppressive drugs to impair organ rejection. In KTx patients, the virus reactivates and replicates actively, leading to a disease called polyomavirus associated nephropathy (PVAN). During early steps of this pathology, the virus is found in the blood of patients, i.e. viremia. Long-lasting viremia is correlated with a poor outcome for patients. The BKPyV genome has been detected in blood immune cells, yet not identifying a particular cell population associated with the viral genome. Myeloid dendritic cells (mDC), key players in the induction and polarization of immune responses, have been described in kidney, next to BKPyV reactivation sites. Also, it has been shown that these cells infiltrate specifically the kidney during PVAN. Finally, they have been shown to be hijacked from their original function by several viruses to help their infection. Based on these observations, we wondered if mDC could be involved in the viruria, i.e. virus in the urines, to viremia transition. By investigating this hypothesis, we have shown that human mDC can bind, internalize and transmit BKPyV to permissive cells. Surprisingly, this interaction does not lead to maturation of immature mDC, asking the question of a putative immune evasion mechanism of the virus. An extensive study in kidney transplant recipients will allow clarification of the role that mDC could have in this infection.

### Key Words

Kidney transplantation, host-pathogen interaction, BK polyomavirus, dendritic cells