

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année 2014

N° 156

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DES DE BIOLOGIE MÉDICALE

par

Benjamin OLIVERO

Né le 21 Novembre 1986 à Aix-en-Provence

Présentée et soutenue publiquement le 28 Mai 2014

**RÉARRANGEMENTS DE LA RÉGION RÉGULATRICE NON
CODANTE DU GÉNOME VIRAL AU COURS DES
INFECTIONS À *POLYOMAVIRUS BK* EN
TRANSPLANTATION RÉNALE ADULTE : ÉTUDE
RÉTROSPECTIVE MONOCENTRIQUE**

Président : Mme le Pr. Maryvonne HOURMANT

Directeur de thèse : Mme le Dr. Céline BRESSOLLETTE-BODIN

Membres du jury : Mme le Pr. Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE
Mme le Dr. Marianne COSTE-BUREL

REMERCIEMENTS

À Madame le Professeur Maryvonne HOURMANT

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.
Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.*

À Madame le Professeur Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE

*Pour avoir accepté de faire partie de ce jury.
Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.*

À Madame le Docteur Marianne COSTE-BUREL

*Pour m'avoir accueilli dans le service de Virologie
et m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.
Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse considération.*

À Madame le Docteur Céline BRESSOLLETTE-BODIN

*Pour m'avoir fait l'honneur de me confier ce travail.
Pour tes conseils pertinents, tes compétences et ta disponibilité.
Pour avoir toujours su me guider et m'encourager devant les difficultés rencontrées.*

À Bernard BESSE

Pour ton aide, ta disponibilité et tes précieux conseils.

À Simon MAZALREY

Pour ta participation à ce travail et ta bonne humeur.

À l'ensemble du personnel du laboratoire de Virologie du CHU de Nantes

*Pour votre aide et votre gentillesse.
Pour vos nombreux encouragements lors de la réalisation des innombrables gels de polyacrylamide.*

À l'ensemble du personnel du laboratoire du CHD de La Roche-sur-Yon

*Pour votre accueil chaleureux et votre gentillesse.
Pour m'avoir accompagné et soutenu dans les derniers mois de la rédaction de ce travail.*

À mes parents et ma sœur

Pour votre soutien sans faille et pour tout l'amour que vous m'apportez malgré la distance. Que ce travail soit l'expression de mon affection et de mon estime pour vous.

À l'ensemble de mes co-internes

À Mathilde, Emilie et Boris

Pour tous ces stages d'internat passés ensemble qui n'auraient pas eu la même saveur sans le duo de choc et le trio infernal.

À Hélène, Damasie, Estelle, Myriam, Elise, Sophie, Mehdi, Matthieu, Arnaud, Clément, Damien,...

Pour tous ces bons moments passés en votre compagnie à l'hôpital et en dehors.

À Marion

Pour tes encouragements et tes conseils pertinents lors de la réalisation de ce travail. Pour ton amitié qui m'est précieuse, ton écoute et ta gentillesse.

À Valérie, Gaëlle, Johan et Benjamin

Pour toutes ces belles et heureuses années de lycée et d'études de médecine passées ensemble.

À Erwan et Thibault

Pour cette amitié qui dure depuis plus de dix ans. Pour le talent non reconnu des PPM.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	10
I. LE VIRUS BK (<i>BKPyV</i>)	11
A. FAMILLE DES <i>POLYOMAVIRIDAE</i>	11
B. STRUCTURE DU VIRUS	13
1. Le génome viral.....	14
2. Les protéines virales.....	15
C. CYCLE DE RÉPLICATION	16
1. Entrée dans la cellule.....	16
2. Cycle de réplication	17
3. Assemblage et libération.....	18
D. ÉPIDÉMIOLOGIE ET TRANSMISSION	19
1. Épidémiologie	19
2. Transmission.....	19
E. POUVOIR PATHOGÈNE	20
1. Primo-infection	20
2. Réactivation.....	20
F. NÉPHROPATHIE À <i>BKPyV</i> CHEZ LES TRANSPLANTÉS RÉNAUX	21
1. Épidémiologie des infections à <i>BKPyV</i> en transplantation rénale.....	21
2. Physiopathologie	21
3. Signes cliniques et biologiques.....	22
4. Facteurs de risque de néphropathie à <i>BKPyV</i>	23
5. Méthodes diagnostiques des infections à <i>BKPyV</i>	24
6. Traitements des infections à <i>BKPyV</i>	28
7. Stratégies de dépistage et de prise en charge des infections à <i>BKPyV</i>	30
II. LA RÉGION RÉGULATRICE NON CODANTE NCCR	32
A. RÉGION PROXIMALE PRÉCOCE	32
B. RÉGION PROXIMALE TARDIVE	33
C. RÉARRANGEMENTS DE LA RÉGION NCCR ET NÉPHROPATHIES À <i>BKPyV</i>	34
III. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	37
IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
A. MATÉRIEL	38
1. Témoin positif.....	38
2. Échantillons cliniques.....	38
3. Amorces utilisées pour l'amplification de la région NCCR.....	39
B. MÉTHODES	40
1. Population étudiée.....	40
2. Données cliniques et paracliniques	41
3. Amplification de la région NCCR.....	41
4. Séquençage de la région NCCR.....	46
5. Clonage moléculaire des séquences NCCR.....	50
6. Analyse statistique.....	50
V. RÉSULTATS	51
A. OPTIMISATION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES POUR L'AMPLIFICATION DE LA RÉGION NCCR	51
1. Choix de la température d'hybridation	51
2. Choix du couple d'amorces.....	52

B. FRÉQUENCE DES INFECTIONS À <i>BKPyV</i> DANS LA COHORTE DE TRANSPLANTÉS RÉNAUX.....	57
C. CARACTÉRISTIQUES DU SOUS-GROUPE AVEC VIRÉMIE PROLONGÉE	58
D. ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DE LA RÉGION NCCR.....	60
1. Fréquence des sous-populations réarrangées	60
2. Description de la variabilité génétique des différentes séquences NCCR.....	63
3. Comparaison des données clinico-biologiques des patients du groupe 4B en fonction de la séquence NCCR.....	70
VI. DISCUSSION	77
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	84
BIBLIOGRAPHIE.....	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BET	Bromure d'éthidium
<i>BKPyV</i>	Polyomavirus BK
C/EBP β	CCAAT/enhancer binding factor beta
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
ddNTP	Didésoxyribonucléotide triphosphate
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
ERE	Élément de réponse aux oestrogènes
GRE/PRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes/progestérone
HLA	Human leukocyte antigen
<i>HPyV</i>	Polyomavirus humains
<i>HPyV6</i>	Human Polyomavirus 6
<i>HPyV7</i>	Human Polyomavirus 7
<i>HPyV9</i>	Human Polyomavirus 9
HRPTEC	Cellules épithéliales rénales tubulaires proximales humaines
<i>KIPyV</i>	Polyomavirus KI
<i>JCPyV</i>	Polyomavirus JC
LEMP	Leucoencéphalopathie multifocale progressive
<i>MCPyV</i>	Merkel cell Polyomavirus
<i>MPyV</i>	Polyomavirus murin
mTOR	Mammalian Target of rapamycin
<i>MWPyV</i>	Malawi Polyomavirus
NBKV	Néphropathie à virus BK
NCCR	Non-coding control region
NF-1	Nuclear factor 1
Ori	Origine de réplication
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
RPA	Protéine de Réplication A
RR	Forme réarrangée
<i>STLPyV</i>	Saint Louis Polyomavirus
<i>TSPyV</i>	Trichodysplasia spinulosa-associated Polyomavirus
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
<i>WUPyV</i>	Polyomavirus WU
WW	Forme archétype

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Arbre phylogénétique des <i>Polyomavirus</i> humains et simiens.....	12
Figure 2 – Particules de <i>BKPyV</i> observées en microscopie électronique dans un échantillon d'urine.....	13
Figure 3 – Représentation de la structure du <i>BKPyV</i>	14
Figure 4 – Représentation du génome du <i>BKPyV</i>	14
Figure 5 – Cycle de réplication du <i>BKPyV</i>	18
Figure 6 – Séroprévalence du <i>BKPyV</i> selon l'âge.....	19
Figure 7 – Fréquence des infections à <i>BKPyV</i> chez les transplantés rénaux.....	22
Figure 8 – Facteurs de risque de néphropathie à <i>BKPyV</i> chez les transplantés rénaux.....	24
Figure 9 – Coloration de Papanicolaou avec présence de « Decoy cells ».....	25
Figure 10 – Histologie d'une biopsie de greffon atteint de néphropathie à <i>BKPyV</i>	27
Figure 11 – Détection du <i>BKPyV</i> par immunohistochimie sur une biopsie de greffon.....	27
Figure 12 – Stratégie de dépistage, suivi et prise en charge d'une néphropathie à <i>BKPyV</i> ...	30
Figure 13 – Dépistage, suivi et prise en charge d'une néphropathie à <i>BKPyV</i> au CHU de Nantes.....	31
Figure 14 – Forme archétype de la région régulatrice non codante NCCR du <i>BKPyV</i>	32
Figure 15 – Séquence de la partie proximale tardive d'une forme archétype de la région NCCR du <i>BKPyV</i> et principaux sites de fixation de facteurs de transcription.....	34
Figure 16 – Émergence de formes réarrangées de la région NCCR chez l'hôte immunodéprimé.....	36
Figure 17 – Principe de fonctionnement de l'automate d'extraction QIAAsymphony SP (QIAGEN®).....	39
Figure 18 – Localisation des différentes amorces utilisées sur le génome du <i>BKPyV</i>	40
Figure 19 – Thermocycleurs utilisés pour l'amplification de la région NCCR.....	42
Figure 20 – Principe de la PCR.....	43
Figure 21 – Présentation des différentes étapes lors des cycles d'amplification par PCR....	43
Figure 22 – Produits d'amplification de la région NCCR du <i>BKPyV</i>	44
Figure 23 – Principe de la nested-PCR (PCR nichée).....	45
Figure 24 – Principe du séquençage selon la méthode de Sanger.....	47
Figure 25 – Purification des produits de séquençage.....	48
Figure 26 – Principe de l'électrophorèse capillaire.....	48
Figure 27 – Vue ouverte du séquenceur ABI Prism® 3130.....	49
Figure 28 – Alignements des séquences NCCR avec le logiciel Mega5®.....	49
Figure 29 – Tests de spécificité du couple d'amorces BK-NCCR-F/R.....	53
Figure 30 – Test de spécificité du couple d'amorces BK-NCCR-F/R2.....	54
Figure 31 – Test de spécificité du couple d'amorces BK-NCCR-BRR1/BRR2.....	55
Figure 32 – Nombre de transplantés rénaux et réno-pancréatiques par an et nombre de ceux suivis chaque année par PCR <i>BKPyV</i> entre 2008 et 2011.....	57
Figure 33 – Répartition des patients transplantés rénaux et réno-pancréatiques au CHU de Nantes entre 2008 et 2011 suivant le dépistage de la réplication à <i>BKPyV</i>	58
Figure 34 – Exemples de migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide des produits d'amplification de la région NCCR.....	61
Figure 35 – Répartition des patients en fonction des résultats du séquençage.....	62
Figure 36 – Répartition des extraits d'ADN en fonction des résultats de l'amplification et du séquençage.....	62
Figure 37 – Répartition des séquences en fonction du type de sous-population virale.....	63
Figure 38 – Mutations ponctuelles retrouvées pour les formes archétypes WW de la région NCCR.....	65

Figure 39 – Mutations ponctuelles retrouvées pour les formes réarrangées RR de la région NCCR.....	68
Figure 40 – Charges virales <i>BKPyV</i> en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées.....	72
Figure 41 – Durée de virémie en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées	73
Figure 42 – Distribution de l’évaluation de la fonction rénale en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Les <i>Polyomavirus</i> humains	11
Tableau 2 – Classification des néphropathies à <i>BKPyV</i> en fonction de l’atteinte histologique observée sur la biopsie rénale	26
Tableau 3 – Critères diagnostiques d’une néphropathie à <i>BKPyV</i>	28
Tableau 4 – Résumé des résultats des différentes études menées sur la prévalence des formes réarrangées de la région NCCR	35
Tableau 5 – Caractéristiques des amorces utilisées pour l’amplification et le séquençage de l’ADN de la région NCCR du <i>BKPyV</i>	40
Tableau 6 – Données cliniques et paracliniques recueillies sur les patients avec virémie élevée prolongée à <i>BKPyV</i> (sous-groupe 4B)	41
Tableau 7 – Mélanges réactionnels pour l’amplification de la région NCCR du <i>BKPyV</i> en fonction du couple d’amorces	42
Tableau 8 – Couples d’amorces utilisés pour l’amplification de la région NCCR	44
Tableau 9 – Couples d’amorces utilisés pour la nested-PCR et la semi-nested PCR	45
Tableau 10 – Programme des cycles pour l’amplification de la région NCCR du <i>BKPyV</i> en fonction du couple d’amorces	52
Tableau 11 – Résultats des tests de spécificité en fonction du couple d’amorces	56
Tableau 12 – Résultats des tests de sensibilité en fonction du couple d’amorces	56
Tableau 13 – Caractéristiques cliniques et biologiques du sous-groupe de patients avec virémie élevée prolongée à <i>BKPyV</i> (sous-groupe 4B)	59
Tableau 14 – Effectifs par classe de probabilité de néphropathie à <i>BKPyV</i> pour le sous-groupe de patients avec virémie prolongée (sous-groupe 4B)	59
Tableau 15 – Nombre de prélèvements avec au moins une séquence NCCR analysable en fonction de la charge virale	60
Tableau 16 – Représentation schématique des séquences archétypes WW retrouvées pour la région NCCR	64
Tableau 17 – Représentation schématique des séquences réarrangées RR retrouvées pour la région NCCR	66
Tableau 18 – Effectifs par bloc de la région NCCR atteint en fonction du type de réarrangement et association éventuelle à une néphropathie à <i>BKPyV</i> prouvée.	69
Tableau 19 – Effectifs par site de fixation de facteurs de transcription atteint selon le type de réarrangement et association éventuelle à une néphropathie à <i>BKPyV</i> prouvée	70
Tableau 20 – Données concernant le suivi des patients par PCR <i>BKPyV</i> en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées	71
Tableau 21 – Caractéristiques de la virémie à <i>BKPyV</i> en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées	72
Tableau 22 – Type de sous-population virale (archétype ou réarrangée) par classe de probabilité de néphropathie à <i>BKPyV</i>	73
Tableau 23 – Étude de la relation entre la présence d’une néphropathie à <i>BKPyV</i> prouvée ou probable et la présence d’une forme réarrangée ou archétype	74
Tableau 24 – Stade de l’atteinte histologique pour les néphropathies à <i>BKPyV</i> prouvées en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées	74
Tableau 25 – Fonction du greffon à la fin du suivi en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées	75
Tableau 26 – Évaluation de la fonction rénale moyenne en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées	75
Tableau 27 – Dosage résiduel de tacrolimus dans le sang en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées	76

INTRODUCTION

Le virus BK (*BKPyV*) a été découvert en 1971 dans les urines d'un patient transplanté rénal présentant une sténose urétérale (Gardner *et al.*, 1971). Il fait partie du genre *Polyomavirus* dans la famille des *Polyomaviridae*, comme le virus JC (*JCPyV*). Il s'agit d'un virus ubiquitaire dont le taux de séroprévalence est élevé dans la population générale. Il ne se manifeste que rarement par des signes cliniques chez les sujets immunocompétents mais reste à un état latent au sein de l'organisme. Son rôle en pathologie humaine, essentiellement lié à un état d'immunosuppression important, n'a donc été découvert qu'assez récemment notamment chez des patients infectés par le VIH au stade SIDA ainsi que chez les transplantés d'organes solides (greffés rénaux principalement) et de cellules souches hématopoïétiques. Il est surtout responsable chez les transplantés rénaux de néphropathies interstitielles appelées néphropathies à *BKPyV* (NBKV) apparues dans les années 90 avec l'utilisation de nouveaux immunosuppresseurs. Ces NBKV ont pour conséquence une perte fonctionnelle du greffon en l'absence de prise en charge. L'immunosuppression destinée à éviter le rejet de greffe est un facteur de risque important d'infection virale opportuniste en post-greffe dont le *BKPyV* en transplantation rénale est un des principaux acteurs. L'absence de signe clinique impose chez ces patients un suivi par biologie moléculaire au niveau urinaire et sanguin, la détection d'une virémie dans le sang étant en faveur d'une réplication virale intense non contrôlée. Sa prise en charge actuelle repose principalement sur la diminution de l'immunosuppression devant l'absence de traitement antiviral spécifique efficace.

Bien que l'apparition d'une néphropathie à *BKPyV* semble principalement liée au degré d'immunosuppression, une partie de la physiopathologie de ces infections reste encore inconnue. La variabilité génétique de la région régulatrice non codante NCCR du virus pourrait être impliquée dans la pathogénicité du virus notamment vis à vis de l'atteinte tissulaire rénale. La région NCCR des *Polyomaviridae* est une région qui peut être caractérisée par un haut degré de variabilité dans certaines situations, puisque l'apparition de variants avec de multiples réarrangements peut être observée notamment chez des patients avec des virémies élevées et des atteintes histologiques importantes (Gosert *et al.*, 2008).

Afin d'évaluer le rôle de ces sous-populations virales réarrangées en transplantation rénale, nous avons étudié la prévalence de ces sous-populations dans un groupe de patients adultes transplantés rénaux au CHU de Nantes et leurs liens éventuels avec les néphropathies à *BKPyV* observées chez certains de ces patients.

I. LE VIRUS BK (*BKPyV*)

A. FAMILLE DES *POLYOMAVIRIDAE*

Les *Polyomavirus* étaient initialement classés dans la famille des *Papovaviridae*, qui contenait aussi les *Papillomaviridae*. La famille des *Polyomaviridae* n'a été reconnue comme une famille séparée que depuis 1999 (Van Regenmortel & Fauquet, 2000).

Les *Polyomaviridae* sont répandus chez les vertébrés (oiseaux, mammifères dont les rongeurs, les singes, les humains,...). Leur nom est dérivé du grec, poly- (plusieurs) et -oma (tumeur), basé sur le fait que le premier virus isolé en 1953 (Polyomavirus murin, *MPyV*), était responsable de la formation de multiples tumeurs solides de localisations différentes après inoculation à des souris nouveau-nées (Gross, 1953; Stewart *et al.*, 1958).

Le deuxième à avoir été découvert est le virus SV40 (Simian Vacuolating agent 40) en 1960, retrouvé comme contaminant de vaccins anti-poliovirus produits par culture sur cellules de rein de singe.

BKPyV et *JCPyV* sont les deux représentants majeurs de cette famille retrouvés chez l'homme. Ils sont ainsi dénommés d'après les initiales des patients chez qui ils ont été isolés pour la première fois (Gardner *et al.*, 1971; Padgett *et al.*, 1971). *JCPyV* a en effet été isolé initialement d'une biopsie cérébrale en 1971 d'un patient présentant une Leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) dans le cadre d'un lymphome de Hodgkin.

Neuf autres nouveaux virus humains de cette famille ont été découverts récemment. Le Tableau 1 et la Figure 1 présentent les différents *Polyomavirus* humains (*HPyV*) connus à ce jour (DeCaprio & Garcea, 2013).

Tableau 1 – Les *Polyomavirus* humains

Polyomavirus humains		Première publication	Pathogénicité	Source
Polyomavirus BK	<i>BKPyV</i>	(Gardner <i>et al.</i> , 1971)	Néphropathie, Cystite hémorragique, Sténose urétérale	Tissu rénal, Urine
Polyomavirus JC	<i>JCPyV</i>	(Padgett <i>et al.</i> , 1971)	LEMP	LCR
Polyomavirus KI	<i>KIPyV</i>	(Allander <i>et al.</i> , 2007)	?	Tractus respiratoire
Polyomavirus WU	<i>WUPyV</i>	(Gaynor <i>et al.</i> , 2007)	?	Tractus respiratoire
Merkel cell Polyomavirus	<i>MCPyV</i>	(Feng <i>et al.</i> , 2008)	Carcinome à cellules de Merkel	Cutané
Human Polyomavirus 6	<i>HPyV6</i>	(Schowalter <i>et al.</i> , 2010)	?	Cutané
Human Polyomavirus 7	<i>HPyV7</i>	(Schowalter <i>et al.</i> , 2010)	?	Cutané
Trichodysplasia spinulosa-associated Polyomavirus	<i>TSPyV</i>	(van der Meijden <i>et al.</i> , 2010)	Trichodysplasia spinulosa	Cutané
Human Polyomavirus 9	<i>HPyV9</i>	(Scuda <i>et al.</i> , 2011)	?	Urine
Malawi Polyomavirus	<i>MWPyV</i>	(Siebrasse <i>et al.</i> , 2012)	?	Selles
Saint Louis Polyomavirus	<i>STLPyV</i>	(Lim <i>et al.</i> , 2013)	?	Selles

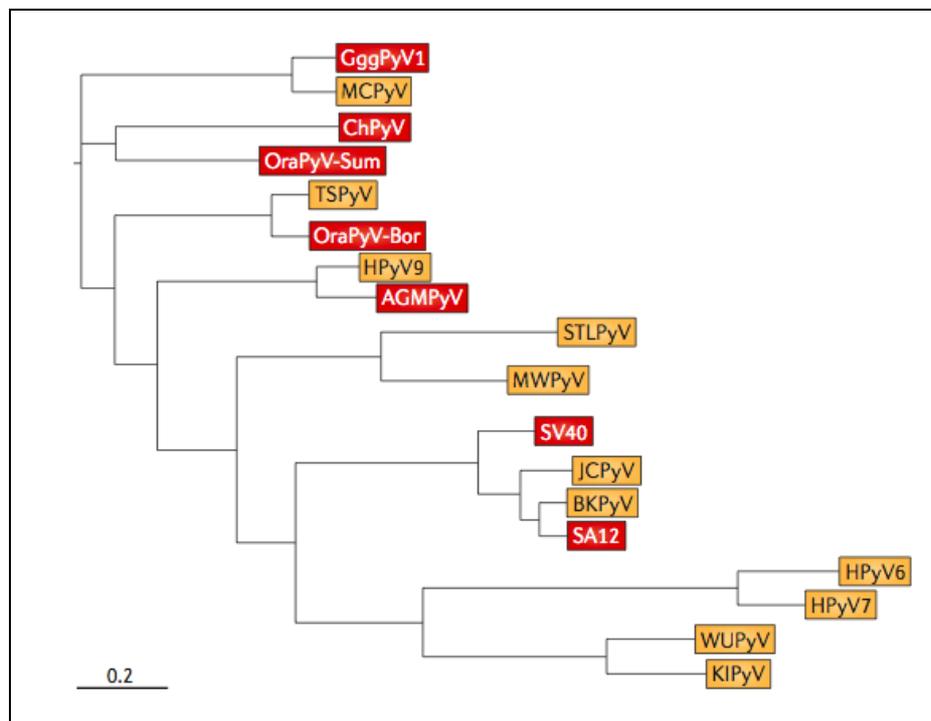


Figure 1 – Arbre phylogénétique des Polyomavirus humains et simiens
(D'après DeCaprio *et al.*, 2013)

Les virus humains sont représentés en jaune tandis que les virus simiens sont représentés en rouge. Cet arbre simplifié a été construit à partir des séquences d'acides aminés de la protéine de capside VP1 et de l'antigène grand T de 19 isolats.

Parmi les *Polyomavirus* récemment identifiés, deux (*MCPyV* et *TSPyV*) sont impliqués dans des pathologies de patients âgés et/ou immunodéprimés. *MCPyV* confirme le pouvoir oncogène de cette famille de virus chez l'homme puisqu'il est retrouvé au sein de tumeurs cutanées neuroendocrines agressives (Carcinome à cellules de Merkel) (Feng *et al.*, 2008). *TSPyV* est lui retrouvé au sein de follicules pileux dans le cadre d'une pathologie cutanée rare chez des patients sévèrement immunodéprimés : Trichodysplasia spinulosa (Fischer *et al.*, 2012; van der Meijden *et al.*, 2010). La pathogénicité potentielle des autres *Polyomavirus* humains est toujours inconnue.

B. STRUCTURE DU VIRUS

Les *Polyomaviridae* sont des virus à ADN non enveloppés avec une capsidie icosaédrique de 45nm de diamètre (Figure 2) (Takemoto & Mullarkey, 1973).

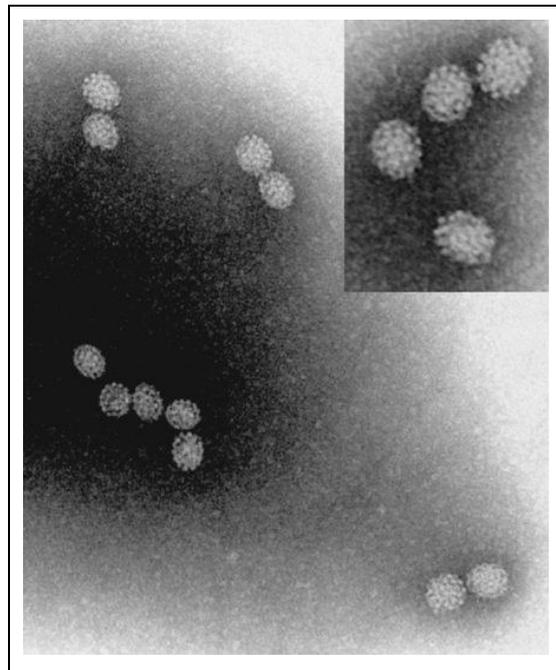


Figure 2 – Particules de BKPyV observées en microscopie électronique dans un échantillon d'urine
(Coloration négative, grossissement 152 000x et 820 000x). Propriété de Kurt Bienz, Basel.

Le génome viral est un ADN circulaire double-brin d'environ 5200 paires de base (pb) associé à des histones de la cellule hôte (H2A, H2B, H3 et H4). Le virion est constitué de 72 pentamères de la protéine majeure de la capsidie (VP1). Chaque pentamère est associé à une copie unique de l'une des deux protéines mineures de la capsidie (VP2 et VP3) (Figure 3).

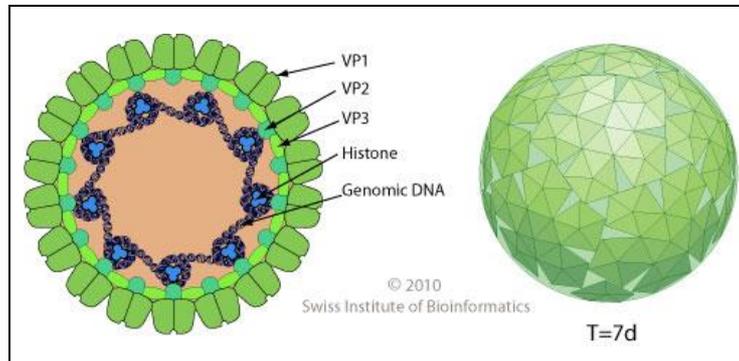


Figure 3 – Représentation de la structure du *BKPyV*
Propriété de Swiss Institute of Bioinformatics (2010)

1. Le génome viral

Le génome du *BKPyV* peut être divisé en 3 régions :

- Une région régulatrice non codante appelée NCCR (Non-coding control region)
- Une région précoce (Early region)
- Une région tardive (Late region)

La région régulatrice NCCR contient les régions promotrices et régulatrices de la transcription des gènes précoces et tardifs ainsi que l'origine de la répllication (Ori) (White *et al.*, 2009).

Les gènes de la région précoce codent pour deux protéines de régulation : l'antigène grand T (Large T-antigen) et l'antigène petit t (Small t-antigen). Les gènes de la région tardive codent pour les protéines virales de la capsid (VP1, VP2, VP3) ainsi que pour une petite protéine régulatrice, l'agnoprotéine (Figure 4).

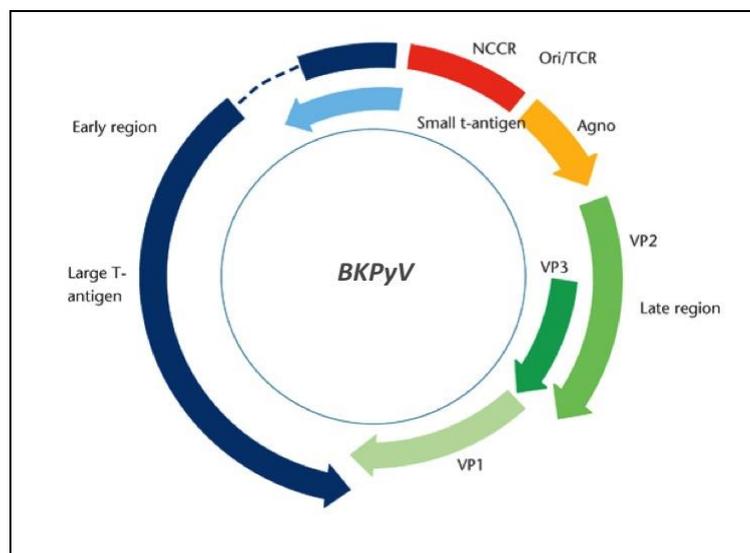


Figure 4 – Représentation du génome du *BKPyV*

2. Les protéines virales

Antigène grand T (Large T-antigen)

L'antigène grand T est une protéine majeure de régulation. C'est une protéine de 695 acides aminés qui joue un rôle important dans la réplication de l'ADN viral. Elle se lie notamment à l'origine de réplication située au sein de la région NCCR et s'associe avec l'ADN polymérase cellulaire ainsi qu'avec d'autres facteurs de réplication pour initier la synthèse de l'ADN. Elle peut se lier aux protéines de la famille des suppresseurs de tumeur pRB et p53. L'interaction avec pRB est responsable du déplacement des facteurs de transcription de la famille E2F qui activent ainsi la transcription des gènes cellulaires impliqués dans l'entrée en phase S et permet donc la réplication du génome (Harris *et al.*, 1996; White & Khalili, 2006). L'interaction avec p53 préviendrait l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Harris *et al.*, 1998).

Antigène petit t (Small t-antigen)

L'antigène petit t est une protéine accessoire de régulation de 172 acides aminés, qui semble aussi avoir un rôle dans le contrôle de la progression dans le cycle cellulaire (Bennett *et al.*, 2012).

Protéine VP1

C'est la protéine majeure de la capside. Elle est la seule protéine exposée à la surface de la capside et permet la liaison aux récepteurs cellulaires gangliosidiques, étape nécessaire à l'entrée dans la cellule hôte (Low *et al.*, 2006).

Les différentes souches de *BKPyV* isolées dans le monde sont classées en 4 génotypes basés sur une séquence de 287 pb au sein du gène codant pour la protéine VP1. Le sous-type I est le plus fréquemment retrouvé partout dans le monde. Le sous-type IV est le deuxième plus fréquent avec une distribution surtout est-asiatique et européenne. Les sous-types II et III sont rarement retrouvés.

Le sous-type I est lui-même divisé en 4 sous-groupes (Ia, Ib-1, Ib-2 et Ic), chacun ayant une répartition géographique particulière : Ia est retrouvé essentiellement en Afrique, Ib-1 en Asie du Sud-Est, Ib-2 surtout en Europe et Amériques, et Ic en Asie (Jin *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2009). Il n'y a pour l'instant aucun lien retrouvé entre un risque accru pour une pathologie et un sous-type particulier.

Protéines VP2 et VP3

Les protéines VP2 et VP3 stabilisent la particule virale à l'extérieur de la cellule hôte et jouent un rôle sur l'adaptation de la structure de la capsidie en intracellulaire (Bennett *et al.*, 2012; Nakanishi *et al.*, 2007, 2002).

Agnoprotéine

L'agnoprotéine est une protéine non structurale de 66 acides aminés. Elle n'est pas retrouvée chez tous les *Polyomavirus*. Son rôle (essentiellement étudié chez le *JCPyV*) reste encore largement méconnu, mais elle semble être impliquée dans de nombreuses fonctions permettant la libération de virions fonctionnels notamment au niveau de la modulation de la transcription des gènes viraux et la réplication virale (par interaction avec l'antigène Large T), ainsi que dans la régulation de l'assemblage du virion (par interaction avec VP1), de la maturation virale et de la libération des particules virales (Ellis *et al.*, 2013; Johannessen *et al.*, 2011; Khalili *et al.*, 2005; Myhre *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2012).

C. CYCLE DE RÉPLICATION

1. Entrée dans la cellule

Le cycle de multiplication du *BKPyV* commence avec la liaison de la protéine VP1 aux récepteurs cellulaires de type gangliosidique (GD1b et GT1b) contenant un résidu terminal d'acide sialique de type $\alpha 2-8$. Le *BKPyV* est ensuite internalisé par endocytose via une cavéole, puis transporté jusqu'au réticulum endoplasmique. L'étape au sein de celui-ci est a priori importante pour la décapsidation partielle du *BKPyV* avant son entrée dans le noyau. Les étapes de décapsidation et d'entrée dans le noyau restent malgré tout encore mal connues.

Le *BKPyV* passe probablement par le pore nucléaire pour entrer dans le noyau. Sa taille d'environ 45nm semble de prime abord trop importante pour passer à travers celui-ci mais la décapsidation partielle préalable lui permettrait de le traverser avec une taille inférieure à 39nm. Les protéines mineures de la capsidie (VP2 et VP3) semblent jouer un rôle important dans cette étape (Eash *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2009b; Low *et al.*, 2006; Moriyama *et al.*, 2007; Nakanishi *et al.*, 2007, 2002; Pante and Kann, 2002)

2. Cycle de réplication

Dès que le génome viral décapsidé se retrouve à l'intérieur du noyau, le *BKPyV* utilise à son avantage certains facteurs nucléaires pour permettre l'expression de ses gènes viraux. Les protéines régulatrices de la région précoce vont être produites en premier, suivies de l'initiation de la réplication et enfin l'expression des gènes tardifs (Figure 5) (White *et al.*, 2009).

Expression des gènes précoces

Le promoteur de la réplication des gènes précoces, localisé au sein de la région NCCR, est reconnu par l'ARN polymérase II de l'hôte. Deux ARN messagers (ARNm) distincts, codant pour l'antigène grand T et l'antigène petit t, sont produits par épissage alternatif à partir d'un ARNm précoce primaire. Les ARNm matures sont ensuite exportés vers le cytoplasme où ils seront traduits.

Réplication de l'ADN viral

La réplication de l'ADN du *BKPyV* commence à l'origine de réplication localisée au sein de la région NCCR et ne nécessite essentiellement qu'une seule protéine virale, l'antigène grand T, tous les autres facteurs de réplication étant fournis par la cellule hôte. L'antigène grand T va stimuler l'entrée de la cellule infectée dans le cycle cellulaire (étape nécessaire pour que la cellule exprime toutes les enzymes nécessaires à la réplication de l'ADN) en se fixant sur les protéines de la famille des suppresseurs de tumeurs pRb et p53 (Cf paragraphe I-B-2). D'autre part, l'antigène grand T se fixe sur l'origine de réplication du génome viral, s'assemble en double hexamère et induit une modification dans la structure de l'ADN. Il recrute ensuite la Protéine de Réplication A (RPA). L'antigène grand T et RPA vont ainsi dérouler ensemble les deux brins de l'ADN viral et former un site d'initiation de réplication reconnu par le complexe ADN polymérase- α /primase (ainsi que d'autres enzymes et co-facteurs). La réplication de l'ADN est bidirectionnelle (il y a deux fourches de réplication par génome d'ADN circulaire) (Fanning & Zhao, 2009; Tikhanovich & Nasheuer, 2010). Des histones se complexent ensuite avec l'ADN nouvellement synthétisé.

Expression des gènes tardifs

La production des protéines de régulation de la région précoce et le début de la réplication du génome du BKV sont nécessaires avant l'expression de la région tardive

aboutissant à la traduction des protéines de la capside virale (VP1, VP2 et VP3) et de l'agnoprotéine dans le cytoplasme.

3. Assemblage et libération

Les protéines de capside sont ensuite transportées du cytoplasme au noyau pour l'assemblage des nouveaux virions qui s'accumulent ensuite dans le noyau. L'accumulation profuse est responsable d'une pression importante sur la membrane nucléaire. Les particules virales néoformées sont enfin relarguées par la lyse de la cellule hôte, la réplication du BKV étant donc cytopathique. L'agnoprotéine semble impliquée dans ces différentes étapes. Elle participe à l'assemblage des protéines structurales (par interaction avec VP1) et contrôle la libération des particules virales (Drachenberg *et al.*, 2004; Gerits & Moens, 2012; Johannessen *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2012).

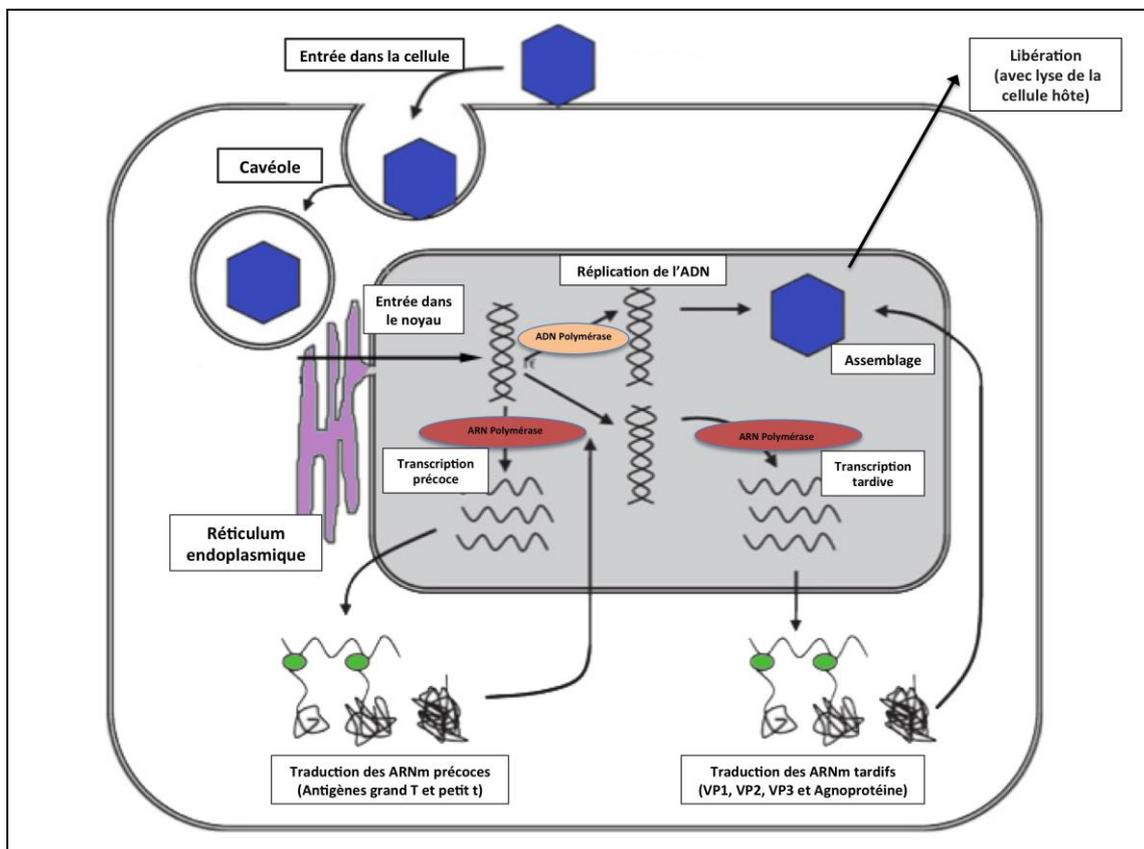


Figure 5 – Cycle de réplication du BKPyV
(d'après Bressollette-Bodin *et al.*, 2003 et Jiang *et al.*, 2009)

D. ÉPIDÉMIOLOGIE ET TRANSMISSION

1. Épidémiologie

L'infection à *BKPyV* est strictement humaine et endémique. Les études sérologiques indiquent que l'infection par le *BKPyV* survient pendant l'enfance avec un âge médian de 4-5 ans. Des taux de séoprévalence de 65 à 90% seraient atteints dès l'âge de 10 ans (Figure 6) (Egli *et al.*, 2009; Kean *et al.*, 2009; Knowles, 2006; Shah *et al.*, 1973).

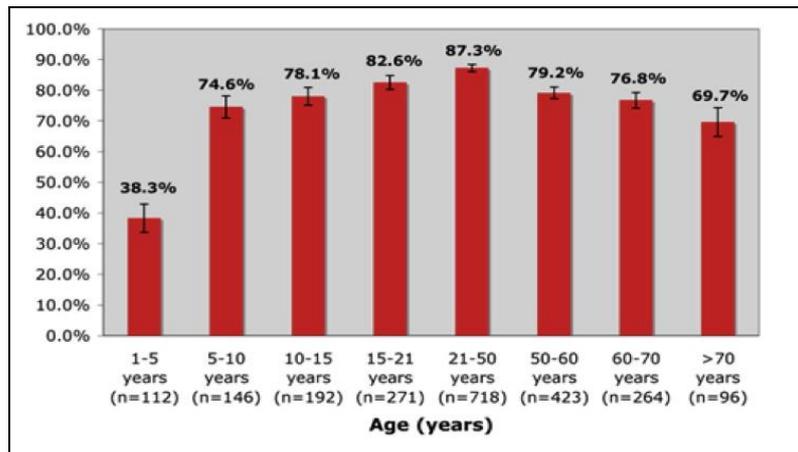


Figure 6 – Séoprévalence du *BKPyV* selon l'âge
(d'après Kean *et al.*, 2009)

2. Transmission

Le mode de transmission n'est pas encore clairement établi :

- La **transmission par voie respiratoire** est souvent suspectée en raison de la mise en évidence de séroconversions survenant précocement dans l'enfance (parfois associées à des symptômes touchant les voies respiratoires hautes) et de la détection par PCR de portage amygdalien et salivaire chez les enfants (Goudsmit *et al.*, 1982; Sundsfjord *et al.*, 1994).
- La **transmission par voie orale** via des aliments ou des eaux contaminés par les urines de personnes infectées (via la desquamation urinaire) semble possible, le virus *BKPyV* ayant été aussi retrouvé dans l'environnement (eaux usées,...) (Bofill-Mas *et al.*, 2000).
- La **transmission transplacentaire** est controversée (des IgM dans du sang de cordon et de l'ADN dans des biopsies fœtales et placentaires auraient été retrouvées) (Pietropaolo *et al.*, 1998).

- **D'autres modes de transmission** ont été évoqués (sperme, transfusion, transplantation d'organe surtout rénale) (Andrews *et al.*, 1988; Dolei *et al.*, 2000; Zambrano *et al.*, 2002).

E. POUVOIR PATHOGÈNE

1. Primo-infection

La primo-infection à *BKPyV* est encore peu connue. Elle est dans la grande majorité des cas asymptomatique. De rares symptômes peu spécifiques (fièvre et symptômes des voies respiratoires hautes) ont été rapportés chez des enfants présentant une séroconversion ou pour lesquels l'ADN du *BKPyV* a été détecté dans des aspirations naso-pharyngées. La voie respiratoire est donc le mode d'entrée dans l'organisme le plus probable. Le virus disséminerait ensuite par voie hématogène.

Le *BKPyV* persiste à vie principalement dans le tractus réno-urinaire. Le génome du *BKPyV* a en effet été détecté au niveau de l'urothélium urétéral et vésical ainsi qu'au niveau du cortex et de la médullaire rénale. De nombreuses autres cellules sont soupçonnées de constituer une partie du réservoir viral à la phase de latence (leucocytes sanguins, cellules des glandes salivaires,...) (Chesters *et al.*, 1983; Dörries *et al.*, 1994; Goudsmit *et al.*, 1982; Heritage *et al.*, 1981; Jeffers *et al.*, 2009; Shinohara *et al.*, 1993; Sundsfjord *et al.*, 1994).

2. Réactivation

Périodiquement, le *BKPyV* peut réactiver même chez les sujets sains. Il a ainsi été retrouvé dans les urines d'environ 10% des sujets sains (par desquamation urinaire), ce qui contribue à l'hypothèse d'une possible voie de transmission urino-orale (Egli *et al.*, 2009).

La prévalence de la réactivation du *BKPyV* est plus importante chez les sujets immunodéprimés (greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), transplantation d'organe solide, infection par le VIH, chimiothérapies, maladies auto-immunes, syndrome d'immunodéficience congénitale,...) (Jiang *et al.*, 2009a). Une virurie survient généralement au moins une fois dans le suivi pour 50% des patients greffés de CSH (Dropulic & Jones, 2008; Gorczynska *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2009).

Chez les sujets immunodéprimés, cette réactivation est associée à plusieurs atteintes cliniques, notamment des néphropathies à *BKPyV* (NBKV) et des sténoses urétérales chez les transplantés rénaux, ainsi que des cystites hémorragiques chez les greffés de CSH.

D'autres atteintes plus rares ont été décrites chez des patients infectés par le VIH et chez des patients atteints d'hémopathies malignes ou greffés de CSH, dont des cas d'encéphalites, de rétinites et de pneumonies à *BKPyV* (Galan *et al.*, 2005; Hedquist *et al.*, 1999; Lesprit *et al.*, 2001; Sandler *et al.*, 1997).

F. NÉPHROPATHIE À *BKPyV* CHEZ LES TRANSPLANTÉS RÉNAUX

1. *Épidémiologie des infections à BKPyV en transplantation rénale*

En transplantation rénale, une réplication à *BKPyV* est retrouvée généralement chez 30 à 40% des patients selon les études (Bressollette-Bodin *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 2002). Chez certains de ces patients, le *BKPyV* peut entraîner des sténoses urétérales, des dysfonctions transitoires du greffon, voire des atteintes irréversibles du greffon dans le cadre de NBKV. Les cas de sténoses urétérales étaient surtout rapportés avant l'introduction de la ciclosporine (Coleman *et al.*, 1978). L'émergence des NBKV a quant à elle débutée avec l'utilisation de nouveaux immunosuppresseurs dans les années 1990 comme le tacrolimus et le mycophénolate-mofétil (Purighalla *et al.*, 1995). La NBKV est actuellement la plus fréquente des maladies associées au *BKPyV* chez le transplanté rénal. C'est une forme de néphrite interstitielle aiguë (Nickeleit & Mihatsch, 2006). Elle survient en moyenne vers le 10^{ème} mois post-transplantation (varie entre 6 semaines et plusieurs années après la transplantation avec un pic entre 4 et 6 mois) (Hirsch & Steiger, 2003). La NBKV, observée essentiellement chez le transplanté rénal, est rare chez les autres transplantés d'organe solide même si quelques cas, notamment en transplantation cardiaque pédiatrique, ont été décrits (Ali *et al.*, 2010; Sahney *et al.*, 2010).

2. *Physiopathologie*

D'après l'étude de Schmitt *et al.*, le virus en cause lors d'une NBKV serait celui issu du greffon du donneur et non du rein natif du receveur (Schmitt *et al.*, 2014). L'histoire de la maladie commence avec l'apparition d'une virurie (témoin de la réplication du *BKPyV*) et se

termine, en cas d'absence de prise en charge, par l'atteinte rénale extensive irréversible entraînant la perte du greffon (chez 0 à 5% des transplantés rénaux selon les études) (Bohl & Brennan, 2007; Knight *et al.*, 2013). Entre temps, l'apparition de cellules infectées dans les urines appelées « Decoy cells » témoigne de l'effet cytopathogène du virus. La réplication virale active entraîne en effet des modifications morphologiques des cellules urothéliales et rénales, et aboutit à la formation de ces cellules qui sont excrétées dans les urines chez 20 à 30% des transplantés rénaux. La multiplication non contrôlée du virus au niveau rénal, du fait de l'absence d'immunité fonctionnelle, entraîne l'apparition d'une virémie, détectée actuellement par biologie moléculaire chez 10 à 20% des transplantés rénaux. La présence d'une néphropathie est confirmée chez environ 10% des greffés rénaux par ponction-biopsie du greffon (Figure 7).

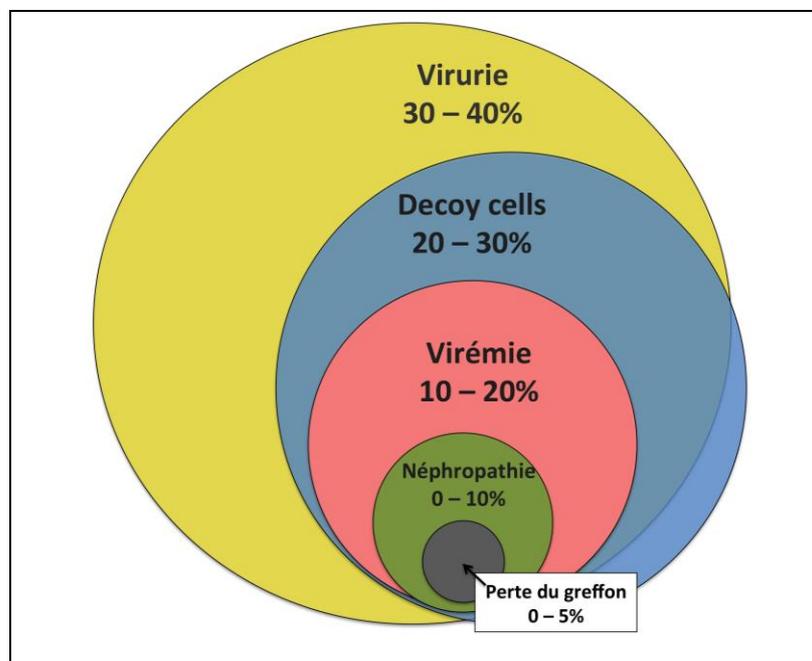


Figure 7 – Fréquence des infections à BKPyV chez les transplantés rénaux (d'après Bohl *et al.*, 2007)

3. Signes cliniques et biologiques

Le développement de la NBKV passe le plus souvent inaperçu d'un point de vue clinique (absence de fièvre et d'autres symptômes révélateurs d'une infection virale). Le seul signe d'alerte est biologique avec la dégradation progressive de la fonction rénale, objectivée par l'élévation de la créatininémie. Celui-ci n'est absolument pas spécifique d'une réactivation du BKPyV, puisqu'il est retrouvé dans les différents diagnostics différentiels de NBKV notamment lors d'un épisode de rejet.

4. Facteurs de risque de néphropathie à BKPyV

Le principal facteur de risque retrouvé à la survenue d'une NBKV est l'utilisation d'immunosuppresseurs en post-transplantation rénale. Le développement de nouveaux schémas de traitements immunosuppresseurs au cours des vingt dernières années a permis une diminution du nombre de rejets aigus mais a augmenté en contrepartie l'incidence des NBKV. Le traitement immunosuppresseur chez les transplantés rénaux peut varier mais il repose essentiellement sur l'association d'un anticalcineurine (tacrolimus ou ciclosporine), d'un antimétabolite (mycophénolate-mofétil ou azathioprine) et de corticostéroïdes. Les anticalcineurines inhibent l'activation des lymphocytes T, tandis que les antimétabolites inhibent la synthèse d'acides nucléiques et la prolifération cellulaire (essentiellement lymphocytaire). L'ensemble de ces molécules va donc réduire la réponse immunitaire de l'hôte mais aussi favoriser la réplication virale.

Le tacrolimus (Prograf®) et le mycophénolate-mofétil (Cellcept®) sont les deux immunosuppresseurs les plus souvent impliqués, mais ils ne sont ni indispensables ni suffisants à eux seuls pour provoquer une NBKV. L'incidence des NBKV semble moins élevée avec les inhibiteurs de mTOR (sirolimus, everolimus), dont l'utilisation est plus récente en transplantation rénale. Des cas de néphropathies ont tout de même été rapportés avec ces molécules (Benavides *et al.*, 2007; Tedesco Silva *et al.*, 2010).

Cependant, de nombreux déterminants jouant un rôle dans la progression vers une néphropathie liée au BKPyV ont aussi été décrits (Hirsch & Randhawa, 2013; Hirsch *et al.*, 2013; Prince *et al.*, 2009; Schold *et al.*, 2009). Les facteurs de risques retrouvés sont liés soit au donneur d'organe, soit au receveur, soit à la prise en charge en post-greffe (Figure 8).

Les déterminants liés aux donneurs sont la présence de mismatches HLA, le prélèvement d'organe en post-mortem, la présence de titres élevés d'anticorps (AC) spécifiques du BKPyV (marqueurs d'une probable exposition plus récente au virus) ainsi que le sexe féminin.

Les déterminants liés aux receveurs sont l'âge avancé, le sexe masculin, la présence de titres bas ou l'absence d'anticorps spécifiques du BKPyV et l'antécédent d'une perte de greffon à cause d'une NBKV lors d'une transplantation précédente.

Les facteurs de risque liés à la prise en charge lors du suivi en post-transplantation sont la mise en place de stents urétéraux, la survenue d'épisodes de rejet aigu, l'exposition aux corticostéroïdes, l'utilisation de l'association tacrolimus-acide mycophénolique (en comparaison de l'association ciclosporine-acide mycophénolique et des combinaisons

incluant un inhibiteur de mTOR), l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs à des posologies élevées et la faible ou l'absence de réponse cellulaire T spécifique du *BKPyV*.

Il existe des différences entre les taux d'incidence des NBKV suivant les centres de transplantations, ainsi que des discordances entre les facteurs de risque retrouvés qui peuvent refléter les différences de protocoles d'immunosuppression entre les centres.

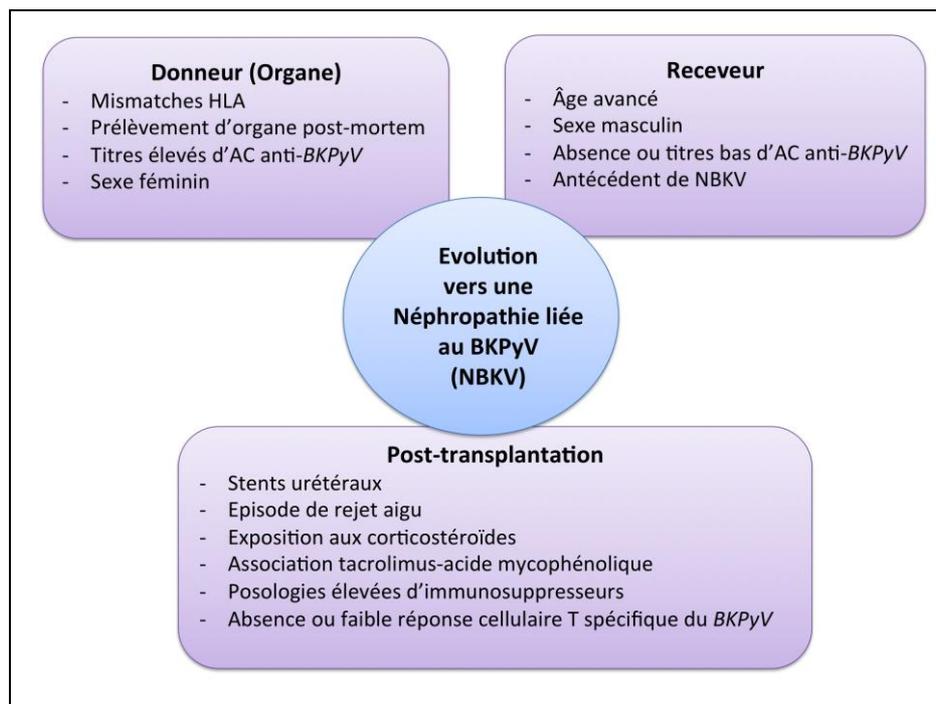


Figure 8 – Facteurs de risque de néphropathie à *BKPyV* chez les transplantés rénaux (d'après Hirsch et al., 2013)

5. Méthodes diagnostiques des infections à *BKPyV*

Biologie moléculaire avec quantification génomique virale

Le dépistage précoce d'une répllication active du *BKPyV* repose essentiellement sur la détection de l'ADN viral par PCR quantitative (PCR temps réel) dans l'urine et le sang des patients transplantés rénaux. Cette méthode présente l'avantage d'être non invasive. La présence d'une charge virale urinaire $>7\log_{10}$ copies/mL et d'une virémie à *BKPyV* permet ainsi de guider l'adaptation thérapeutique (baisse de l'immunosuppression,...) ainsi que la nécessité de réaliser une biopsie rénale (seule technique permettant un diagnostic de certitude de la NBKV).

On détecte généralement de l'ADN viral dans les urines de 30 à 40% des patients lors du suivi. La présence d'une virurie précède quasiment toujours l'apparition d'une éventuelle

virémie (à noter que de l'ADN de *BKPyV* peut être toutefois retrouvé isolément en faible quantité dans les lymphocytes sanguins même de sujets sains). La quantification de l'ADN du *BKPyV* dans les urines a malheureusement le désavantage d'avoir une valeur prédictive positive de NBKV faible et sa diminution est retardée comparée aux charges virales sanguines lors de la réduction de l'immunosuppression.

L'apparition d'une virémie semble en effet refléter un état d'infection plus avancé. Elle est retrouvée chez 10 à 20% des patients (Bohl & Brennan, 2007; Drachenberg *et al.*, 2004; Hirsch *et al.*, 2002). Une virémie persistante associée à des charges virales élevées semble avoir une bonne valeur prédictive positive de NBKV (>90% si la charge virale est d'au moins 6 log₁₀ copies/mL), tandis que l'absence de virémie a une excellente valeur prédictive négative. Les patients présentant une virémie persistante >4log₁₀ copies/mL doivent être considérés comme ayant une NBKV « probable » en l'absence de diagnostic par biopsie (Hirsch & Randhawa, 2013).

Cytologie urinaire

La réplication virale active entraîne des modifications morphologiques des cellules urothéliales et rénales, et aboutit à la formation de cellules appelées « **Decoy cells** » qui sont excrétées dans les urines et visualisées après coloration de Papanicolaou. Elles possèdent un noyau volumineux, hyperchromique, homogène avec un aspect dit en verre dépoli lié à la présence d'inclusions virales centro-nucléaires (Figure 9). Elles sont retrouvées chez 20 à 30% des transplantés rénaux mais ne sont pas totalement spécifiques du *BKPyV* puisque leur présence peut être associée à d'autres virus. C'est un test simple qui a une sensibilité de 100% et une spécificité de 71%. Sa valeur prédictive positive n'est par contre que de 29% (Hirsch *et al.*, 2002; Nickeleit *et al.*, 2000).

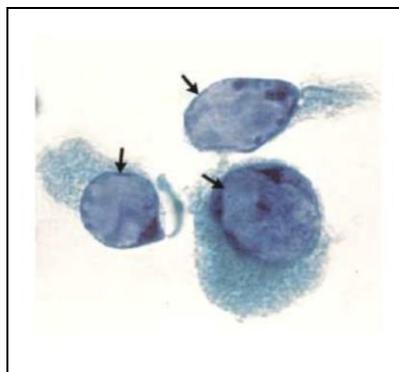


Figure 9 – Coloration de Papanicolaou avec présence de « Decoy cells »
(D'après Nickeleit *et al.* 2000)

« Decoy cells » avec inclusions virales centro-nucléaires caractéristiques (flèches) dans un prélèvement d'urine après coloration de Papanicolaou

Ponction-Biopsie rénale

Le diagnostic définitif de NBKV repose toujours actuellement sur l'analyse histopathologique de biopsies rénales en démontrant la présence de changements cytopathiques au niveau du greffon et doit être confirmé par immunohistochimie (Figure 10). Pour l'immunohistochimie, des anticorps monoclonaux anti-polyomavirus dirigés contre l'antigène grand T sont généralement utilisés (Figure 11).

Du fait de la nature focale de la NBKV et de la possibilité d'erreurs d'échantillonnage dans au moins 10 à 36,5% des cas (Drachenberg *et al.*, 2004), une biopsie négative ne permet pas d'éliminer avec certitude une NBKV. Une deuxième biopsie est recommandée en cas de forte suspicion (virémie persistante par exemple).

Une classification établie à partir de l'étendue des différentes atteintes histologiques observées lors de NBKV (l'atteinte cytopathique virale dont la présence d'inclusions intranucléaires évocatrices, l'inflammation interstitielle, l'atrophie tubulaire et la fibrose interstitielle) permet de prédire le risque de perte de greffon (Tableau 2) (Hirsch & Randhawa, 2013).

Tableau 2 – Classification des néphropathies à BKPyV en fonction de l'atteinte histologique observée sur la biopsie rénale

	Stade A	Stade B			Stade C
		B1	B2	B3	
Atteinte cytopathique virale (inclusions intranucléaires,...)	≤ 25%	> 10%			Variable
Inflammation interstitielle	≤ 10%	10-25%	26-50%	>50%	Variable
Atrophie tubulaire	≤ 10%	< 50%			> 50%
Fibrose interstitielle	≤ 10%	< 50%			> 50%
Risque de perte de greffon	< 15%	25%	50%	75%	> 80%

Les pourcentages représentent l'étendue de la biopsie atteinte (pour les différentes atteintes histologiques observées) et la probabilité de perte de greffon.

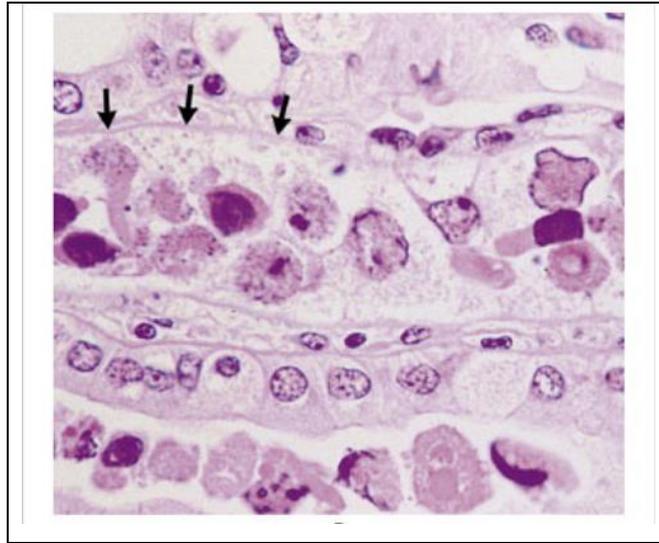


Figure 10 – Histologie d’une biopsie de greffon atteint de néphropathie à BKPyV
 (D’après Nickleit et al., 2000)

Les cellules épithéliales des tubules contenant des inclusions virales sont visibles. Le BKPyV provoque un élargissement nucléaire ainsi que le détachement des cellules atteintes de la membrane basale tubulaire conduisant à sa mise à nu (flèches).

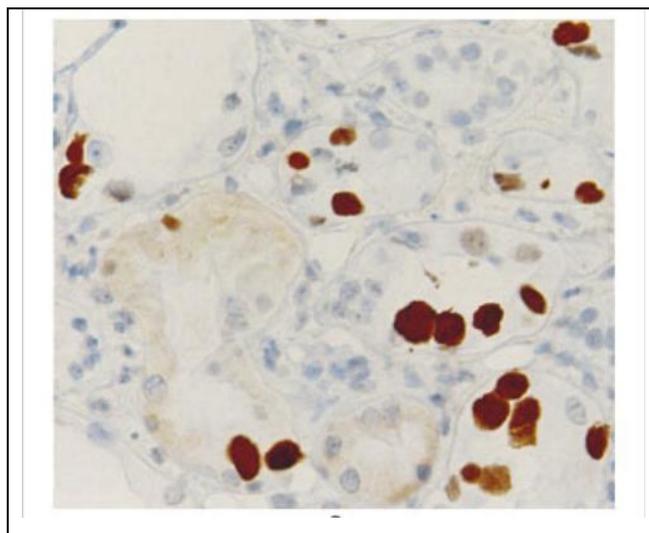


Figure 11 – Détection du BKPyV par immunohistochimie sur une biopsie de greffon
 (D’après Nickelheit et al., 2000)

Révélation de la présence d’antigène grand T dans les noyaux des cellules épithéliales tubulaires confirmant le diagnostic de néphropathie à BKPyV (utilisation d’anticorps monoclonaux de souris).

Critères diagnostiques d'une néphropathie à BKPyV

À partir du résultat des différents tests diagnostiques, 3 classes de probabilité (NBKV possible, probable ou prouvée) du diagnostic de NBKV ont été différenciées permettant de guider la prise en charge (Tableau 3) (Hirsch & Randhawa, 2013).

Tableau 3 – Critères diagnostiques d'une néphropathie à BKPyV

	Possible	Probable	Prouvée
Decoy cells et/ou Virurie >7 log ₁₀ cp/mL	+	+	+
Virémie >4 log ₁₀ cp/mL	-	+	+
Biopsie rénale	-	-	+ (Stade A, B ou C)
Intervention thérapeutique	NON	OUI	OUI

6. Traitements des infections à BKPyV

Réduction de l'immunosuppression

La principale thérapeutique de la NBKV est la diminution de l'immunosuppression dans le but de restaurer la réponse immune anti-virale (baisse de posologie voire arrêt d'un immunosuppresseur). Une surveillance rapprochée concomitante par PCR quantitative dans le sang et l'urine est indispensable pour son adaptation. De nombreuses études observationnelles ont montré la disparition ou la diminution de la virémie à BKPyV dans plus de 85% des cas (Ahn *et al.*, 2008; Giraldi *et al.*, 2007; Schaub *et al.*, 2010; Wadei *et al.*, 2006).

Des dosages sanguins des différents immunosuppresseurs sont recommandés pour évaluer l'efficacité de la réduction de l'immunosuppression. Les taux cibles recommandés pour les différents immunosuppresseurs sont les suivants :

- Tacrolimus < 6 ng/mL
- Ciclosporine < 150 ng/mL
- Sirolimus < 6 ng/mL

Une réduction plus importante peut être envisagée dans certaines atteintes avancées (Hirsch & Randhawa, 2013).

Changement d'immunosuppresseurs

Le tacrolimus et l'acide mycophénolique ont été identifiés comme les immunosuppresseurs les plus à risque de NBKV. La stratégie de changer d'immunosuppresseur en cas de virémie à NBKV (doses faibles de ciclosporine à la place du tacrolimus ou doses faibles de mTOR à la place du mycophénolate-mofétil) a donc été envisagée avec de bons résultats dans de petites séries. Il n'existe pas d'essai contrôlé randomisé permettant de recommander actuellement une stratégie particulière par rapport à une autre.

Traitement antiviral

En association avec la réduction de l'immunosuppression, il n'existe actuellement pas de traitement antiviral spécifique du *BKPyV* ayant véritablement prouvé son efficacité. Plusieurs médicaments peuvent être néanmoins à considérer en cas de charges virales sanguines élevées prolongées malgré une réduction adéquate de l'immunosuppression :

- Le **cidofovir** est un analogue nucléosidique qui possède une activité inhibitrice *in vitro* sur les *Polyomavirus* (Andrei *et al.*, 1997). Son mécanisme d'action sur les *Polyomavirus* n'est pas connu, le *BKPyV* n'exprime en effet pas la cible connue du cidofovir, l'ADN polymérase virale. Des résultats discordants ont été rapportés par différentes études (stabilisation de la fonction rénale pour certaines, pas de bénéfice démontré pour d'autres) (Kuypers *et al.*, 2005; Vats *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2009). Le cidofovir est cependant néphrotoxique et des uvéites antérieures sévères ont été rapportées chez 7% des patients.
- Le **leflunomide** est un inhibiteur de la synthèse de pyrimidine. Son efficacité clinique est douteuse et de fréquents effets secondaires sévères ont été rapportés (hépatite, hémolyse, microangiopathie thrombotique,...) (Josephson *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2005).
- Des **immunoglobulines intraveineuses** pourraient être utiles dans le traitement de la NBKV par leurs propriétés immunomodulatrices et leur effet neutralisant direct (Randhawa *et al.*, 2010; Sener *et al.*, 2006).
- Les **fluoroquinolones** (ofloxacine, ciprofloxacine et lévofloxacine) auraient un effet inhibiteur sur l'activité hélicase de l'antigène grand T mais les résultats cliniques sont contradictoires (Gabardi *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2011).

7. Stratégies de dépistage et de prise en charge des infections à BKPyV

Un dépistage régulier (au moins tous les 3 mois pendant les 2 premières années post-transplantation) à la recherche d'une répllication du BKPyV, réalisé par PCR quantitative dans les urines (ou par la recherche de Decoy cells) et/ou par PCR quantitative dans le sang, permet d'identifier au moins 80% des patients à risque de NBKV avant l'apparition d'une atteinte fonctionnelle significative du greffon.

La présence d'une virémie $> 4 \log_{10}$ cp/mL doit amener à réaliser une biopsie du greffon, surtout en cas de dégradation de la fonction rénale.

En cas de NBKV probable ou prouvée, il est recommandé de diminuer l'immunosuppression. Plusieurs stratégies de diminution sont envisageables : diminution des posologies des anticalcineurines de 50% puis diminution des antimétabolites ou l'inverse. Le changement d'immunosuppresseurs, l'arrêt de l'un d'entre eux ou l'ajout d'un traitement antiviral sont à envisager notamment en cas de persistance de la virémie.

Une synthèse des recommandations pour le dépistage, le suivi et la prise en charge des NBKV chez le transplanté rénal est présentée sur la Figure 12.

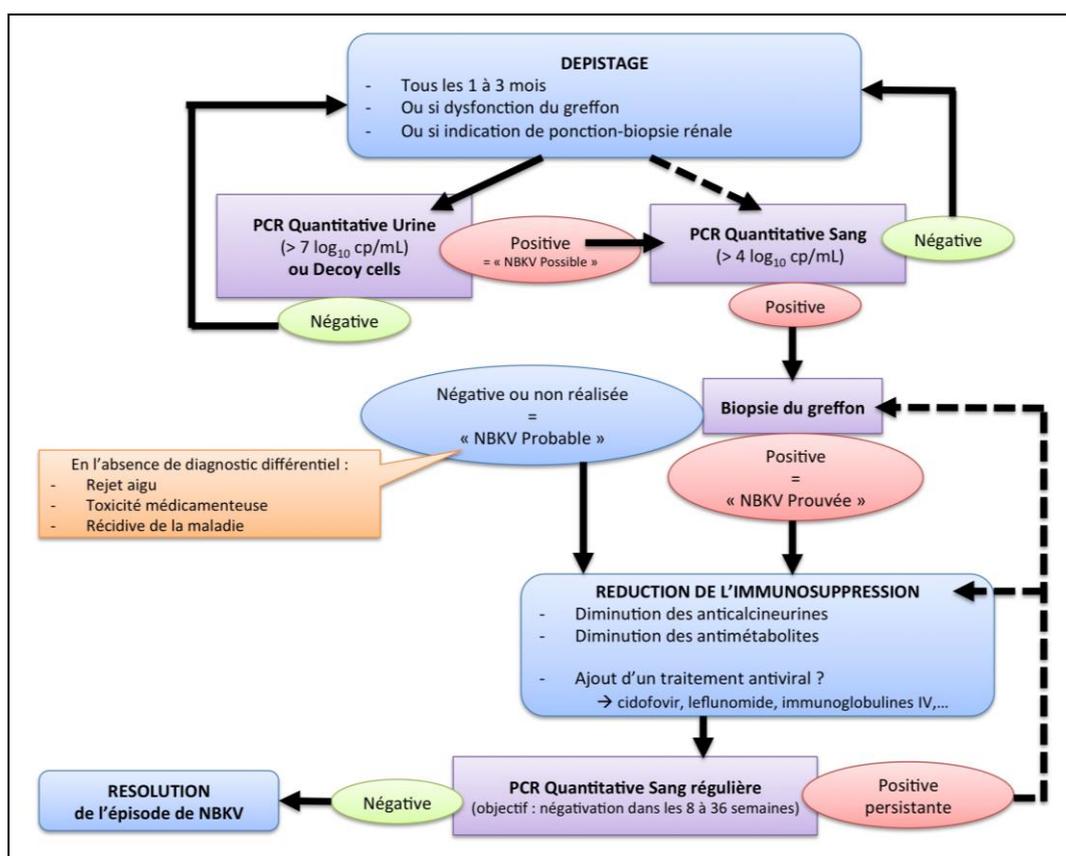


Figure 12 – Stratégie de dépistage, suivi et prise en charge d'une néphropathie à BKPyV (d'après Hirsch et al., 2013)

La Figure 13 présente la stratégie de dépistage, de suivi et de prise en charge actuelle au CHU de Nantes, réalisée à partir de ces recommandations.

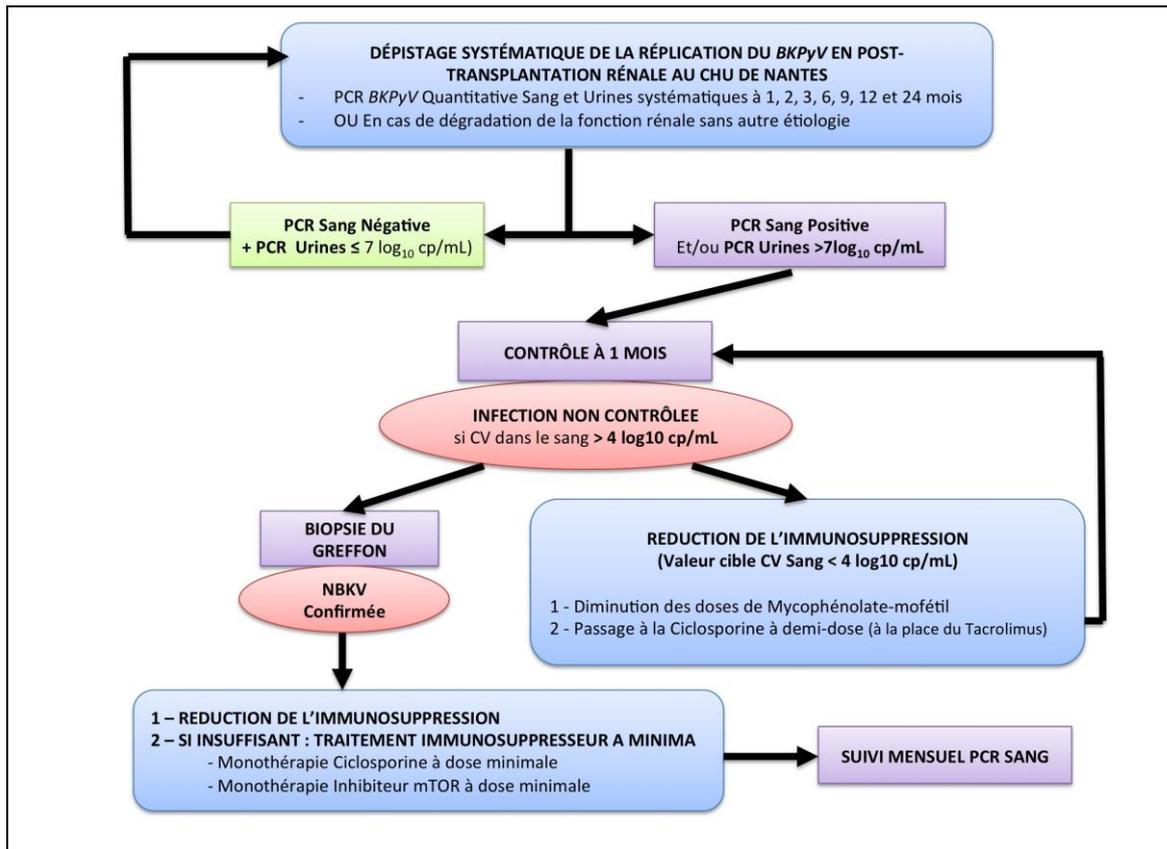


Figure 13 – Dépistage, suivi et prise en charge d'une néphropathie à BKPyV au CHU de Nantes

II. LA RÉGION RÉGULATRICE NON CODANTE NCCR

La région NCCR contrôle la transcription des promoteurs précoces et tardifs, et contient aussi l'origine de réplication qui régule l'initiation de la synthèse virale. Elle est située entre le codon start ATG de l'antigène grand T et le début de la région codant pour l'agnoprotéine.

La région NCCR est caractérisée par un haut degré de variabilité génétique avec la présence de multiples réarrangements observés entre les différentes sous-populations virales en cas de réactivation prolongée, notamment au niveau de la région proximale tardive.

La forme non réarrangée de NCCR (WW), appelée « archétype » ou « sauvage » est la forme transmissible du virus. Elle est retrouvée de manière prédominante dans les urines (Souche de référence WW : GenBank n°AB211371.1) (Figure 14).

Elle est divisée arbitrairement en 5 régions, nommées **O** (142 pb), **P** (68 pb), **Q** (39 pb), **R** (63 pb) et **S** (63 pb) (White *et al.*, 2009).

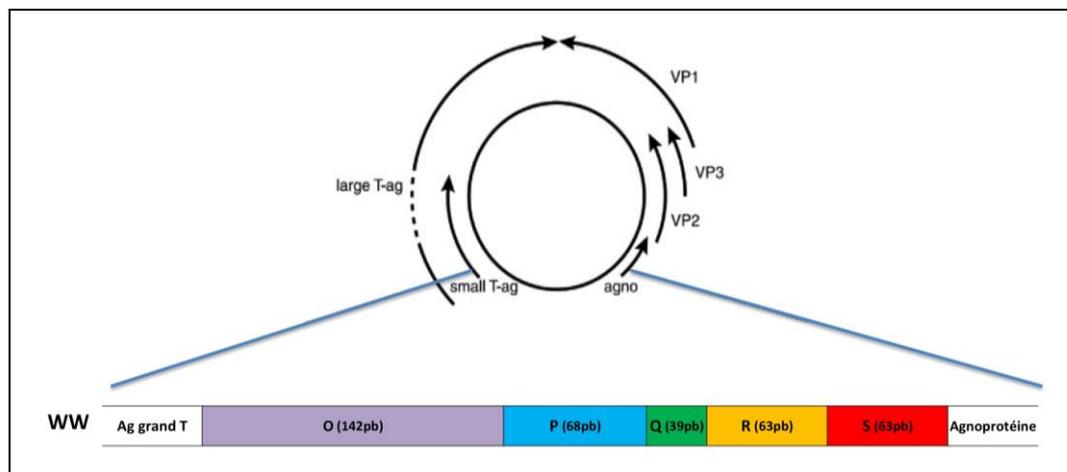


Figure 14 – Forme archétype de la région régulatrice non codante NCCR du BKPyV

A. RÉGION PROXIMALE PRÉCOCE

La région proximale précoce correspond au bloc O. Elle contient l'origine de réplication et des sites d'initiation de la transcription de la région précoce. Le bloc O est une région de 142 pb très conservée, certainement du fait de son importance pour la réplication et la transcription. L'origine de réplication contient des multiples pentamères GAGGC (ou complément inverse GCCTC) qui se lient à l'antigène grand T. Il existe aussi au sein de cette région O, des sites de fixations pour différents facteurs de transcription dont NF- κ B et

C/EBP β (CCAAT/enhancer binding factor beta). Ces deux facteurs de transcription semblent jouer un rôle dans l'activation du promoteur précoce (White *et al.*, 2009).

B. RÉGION PROXIMALE TARDIVE

La région proximale tardive correspond aux régions régulatrices P, Q, R et S. Ces 4 régions sont composées de 68 pb pour la région P, de 39 pb pour la région Q et de 63 pb pour les régions R et S. De nombreux sites de fixation potentiels pour des facteurs de transcription cellulaire peuvent être prédits par bioinformatique : Nuclear factor 1 (NF-1), Sp1, cAMP-responsive element binding protein (CREB),... (Boldorini *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2012; White *et al.*, 2009) Au sein de ces régions, de nombreux réarrangements ont été décrits entre les sous-populations virales de *BKPyV*. Ils correspondent soit à des délétions, soit à des insertions, soit à des mutations ponctuelles. Cette grande variabilité de la région proximale tardive rend difficile l'évaluation individuelle de l'importance des différents sites de fixation de facteurs de transcription sur la régulation de l'expression des gènes du *BKPyV*. La région S est, comme la région O, plus conservée que les autres du fait de son rôle dans l'initiation et la régulation de la transcription de la région tardive. Elle contient d'ailleurs une unité de réponse aux stéroïdes contenant un élément de réponse aux glucocorticoïdes/progestérone (GRE/PRE) et un élément de réponse aux oestrogènes (ERE), ce qui permettrait la stimulation de la transcription tardive par les corticostéroïdes et les oestrogènes (Moens *et al.*, 1994) (Figure 15).

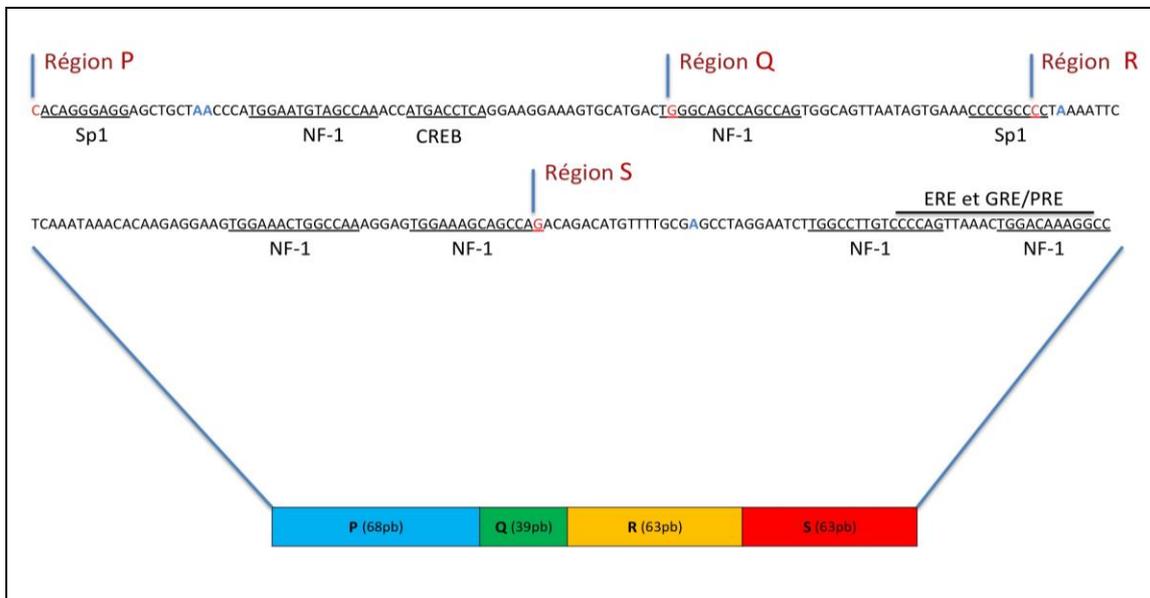


Figure 15 – Séquence de la partie proximale tardive d’une forme archétype de la région NCCR du *BKPyV* et principaux sites de fixation de facteurs de transcription
 (D’après Moens *et al.*, 2004 ; Boldorini *et al.*, 2005 ; Liang *et al.*, 2012)

Les sites de fixation des facteurs de transcription sont indiqués par des lignes noires. Les nucléotides en bleu (P18, P19, R4 et S18) représentent les principaux polymorphismes connus.

C. RÉARRANGEMENTS DE LA RÉGION NCCR ET NÉPHROPATHIES À *BKPyV*

Les formes réarrangées de la région NCCR (RR) sont essentiellement retrouvées au niveau de biopsies rénales, de prélèvements d’urines et de prélèvements sanguins de patients transplantés rénaux (Boldorini *et al.*, 2005; Gosert *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2006; Randhawa *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2007). Elles ont été aussi retrouvées paradoxalement au niveau de cellules mononucléées du sang périphérique chez des patients sains (Chatterjee *et al.*, 2000; Dörries *et al.*, 1994). Leur présence n’est donc pas synonyme de pathologie. Le Tableau 4 présente les résultats des différentes études menées sur la prévalence des sous-populations virales réarrangées de la région NCCR dans les différents prélèvements cliniques chez les transplantés rénaux. Ces études sont néanmoins difficilement comparables entre-elles.

Tableau 4 – Résumé des résultats des différentes études menées sur la prévalence des formes réarrangées de la région NCCR

Études	Population totale de l'étude				Sous-population avec NBKV		
	Patients avec NBKV prouvée	Patients virémiques	Formes réarrangées dans les Urines	Formes réarrangées dans le Sang	Formes réarrangées dans les Urines	Formes réarrangées dans le Sang	Formes réarrangées dans les Biopsies rénales
Etudes de cas de transplantés rénaux avec NBKV							
Randhawa (2003)	16/16	NR	NR	NR	NR	NR	3/16
Boldorini (2005)	5 / 5	5/5	3/5	3/5	3/5	3/5	2/5
Bressollette-Bodin (2005)*	3/3	NR	0/3	NR	0/3	NR	NR
TOTAL	24/24	5/5	3/8	3/5	3/8	3/5	5/21
Etudes prospectives ou rétrospectives de transplantés rénaux virémiques et/ou viruriques							
Olsen (2006)	7/11	NR	3/11	NR	2/7	NR	3/6
Sharma (2007) (Méta-analyse)	20/40	26/40	2/40	NR	0/20	NR	NR
Gosert (2008)*	57/227	227/227	NR	55/227	NR	26/57	NR
TOTAL	84/278	253/267	5/51	55/227	2/27	26/57	3/6
Etudes prospectives ou rétrospectives de suivi de transplantés rénaux							
Bressollette-Bodin (2005)*	0/104	30/104	0/31	NR	0/0	NR	NR
Gosert (2008)*	70/412	129/412	10/185	44/129	3/70	35/70	NR
Memon (2012)	0/200	23/200	0/11	0/11	0/0	0/0	NR
TOTAL	70/716	182/716	10/227	44/140	3/70	35/70	NR

*Ces études sont classées dans deux catégories différentes du fait de la présence de plusieurs sous-études réalisées sur des populations différentes.

Dans l'étude de Gosert *et al.* (2008), la prévalence des formes réarrangées RR est plus importante dans le sang que dans les urines de patients transplantés rénaux virémiques. La présence de RR est associée à des charges virales plus élevées dans le plasma et à une plus forte probabilité de NBKV prouvée par biospie.

La forme archétype WW semble présente initialement chez tous les patients. Les sous-populations virales RR n'apparaîtraient que dans un second temps. L'émergence de formes RR est liée à l'importance de la virémie (d'autant plus rapide que la charge virale est élevée) et à une durée prolongée de la virémie.

L'observation de discordance entre la présence de RR et WW de la région NCCR dans le plasma et les urines de certains patients suggère que les cellules épithéliales tubulaires rénales d'une part et les cellules urothéliales de la vessie et des uretères d'autre part sont deux compartiments différents de réplication virale (Gosert *et al.*, 2008).

In vitro, la présence de sous-populations RR est associée à une réplication virale plus importante et accélérée lors de culture sur cellules de rein de singe (Vero) (Gosert *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2009).

Les formes réarrangées semblent notamment augmenter l'expression des gènes précoces par rapport à la forme archétype quelle que soit l'architecture de la région NCCR (Gosert *et al.*, 2008).

Des réarrangements de la région NCCR ne sont pas retrouvés au niveau des biopsies dans tous les cas de NBKV (Boldorini *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2006; Randhawa *et al.*, 2003). Leur présence n'est donc pas obligatoire pour la survenue d'une NBKV, mais la présence de RR dans le plasma semble associée à une atteinte histologique plus importante chez ces patients (atteinte cytopathique plus étendue, infiltrat inflammatoire lymphocytaire plus fréquent) (Gosert *et al.*, 2008).

Ces résultats supportent donc l'idée d'un rôle potentiel de la région NCCR dans la pathogénicité du virus vis à vis de l'atteinte tissulaire rénale.

La présence de formes réarrangées semble ainsi associée à un avantage réplcatif chez les patients immunodéprimés (Figure 16). Aucune architecture particulière de la région NCCR, que ce soit une insertion et/ou une délétion simple voire une association plus complexe, ne semble être la seule responsable de ces résultats. Il a été émis l'hypothèse que les formes réarrangées pouvaient changer de manière critique un ou plusieurs sites de fixation de facteurs de transcription, mais aucune atteinte commune n'a été retrouvée pour l'instant.

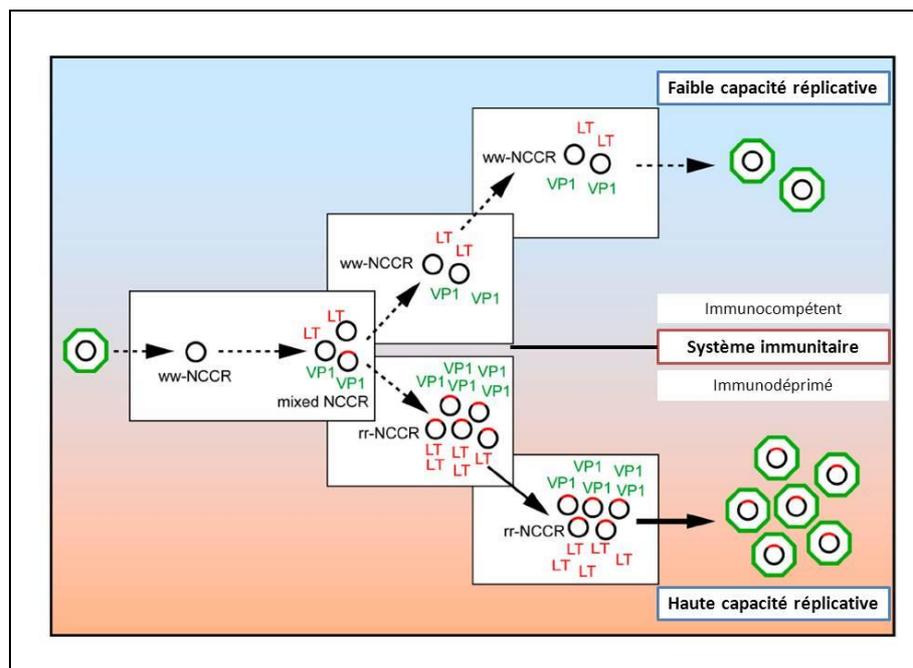


Figure 16 – Émergence de formes réarrangées de la région NCCR chez l'hôte immunodéprimé.
(D'après Gosert *et al.*, 2008)

La forme archétype (WW-NCCR) du génome de la région NCCR (cercles noirs) subit des erreurs de type délétion et insertion pendant la réplcation, entraînant l'apparition de formes réarrangées (cercles rouges). Les formes réarrangées (RR-NCCR) ayant une expression des gènes précoces augmentée et une haute capacité réplcative sont éliminées chez l'hôte immunocompétent mais pas chez l'immunodéprimé où elles deviennent prédominantes. LT = Antigène grand T ; VP1 = Protéine de capsid VP1

III. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'objectif principal de cette étude était d'étudier la variabilité génétique de la région NCCR du *BKPyV* chez les transplantés rénaux. Une technique d'amplification de la région NCCR du *BKPyV* par PCR a donc été mise au point afin de séquencer cette région NCCR sur des sous-populations virales issues de prélèvements sanguins.

Dans un deuxième temps, la variabilité de la région NCCR a été étudiée sur un sous-groupe de patients avec virémie prolongée. Ils ont été sélectionnés parmi une cohorte de transplantés rénaux adultes (greffés entre le 1^{er} Janvier 2008 et le 31 Décembre 2011 au CHU de Nantes) pour lesquels au moins un prélèvement à la recherche d'une répllication du *BKPyV* a été réalisé lors du suivi en post-transplantation. La prévalence des formes réarrangées et l'architecture des séquences ont été en premier lieu analysées. Les liens éventuels entre la présence des ces sous-populations réarrangées et la survenue de néphropathies à *BKPyV* chez ces patients ont ensuite été étudiés.

IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. MATÉRIEL

1. *Témoin positif*

Le témoin positif utilisé pour la mise au point de la PCR NCCR est un extrait d'ADN d'un surnageant de culture sur cellules épithéliales rénales tubulaires proximales humaines (HRPTEC) infectées *in vitro* par une souche clinique de *BKPyV* (infection réalisée par S. Mazalrey, unité de recherche EA4271 - Immunologie et polymorphisme génétique). L'infection initiale avait été réalisée par incubation des cellules avec un échantillon d'urine positive pour le *BKPyV* (10^9 copies génome/mL). L'extraction d'ADN avait été réalisée à l'aide du kit «NucléoSpin RNA viruses» de Macherey-Nagel. Le témoin positif a ensuite été dilué à plusieurs concentrations : du $1/10^{\text{ème}}$ (**Témoin positif 10^{-2}**) au $1/100\ 000^{\text{ème}}$ (**Témoin positif 10^{-6}**). Pour le Témoin positif 10^{-5} , la charge virale était mesurée à 3 copies/5 μ L d'extrait (charge virale quantifiée par PCR temps réel quantitative *BKPyV*, utilisée en diagnostic au laboratoire de virologie du CHU de Nantes).

2. *Échantillons cliniques*

La région NCCR a été amplifiée à partir d'extraits d'ADN de sang total positifs en PCR *BKPyV*, de patients transplantés de rein ou rein-pancréas au CHU de Nantes entre le 1^{er} Janvier 2008 et le 31 Octobre 2012. Ces extraits étaient stockés à -20°C au laboratoire de virologie (Secteur Biologie moléculaire).

L'étape d'extraction avait été réalisée soit sur l'automate d'extraction MagNA Pure LC 2.0 (Roche®) soit sur l'automate d'extraction QIASymphony SP (QIAGEN®). Les différentes étapes de cette extraction sont représentées Figure 17 : lyse sous l'action de la Protéinase K, liaison des acides nucléiques sur des particules magnétiques (captées ensuite par un aimant), plusieurs lavages successifs puis une étape d'élution dans un tampon d'élution.

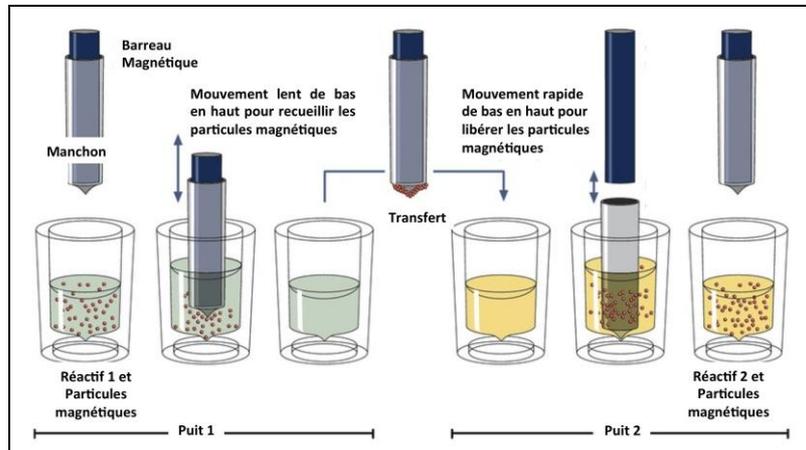


Figure 17 – Principe de fonctionnement de l’automate d’extraction QIA Symphony SP (QIAGEN®)
(Ces étapes sont réalisées plusieurs fois au cours de l’extraction)

3. Amorces utilisées pour l’amplification de la région NCCR

Pour l’amplification et le séquençage de l’ADN de la région NCCR du *BKPyV*, plusieurs couples d’amorces (sens et anti-sens) ont été testés au cours de ce travail. L’objectif étant d’étudier la variabilité génétique de la région NCCR, les amorces ont été choisies afin d’amplifier et séquencer au moins la partie proximale tardive (régions P, Q, R et S). Ces régions sont en effet les plus fréquemment touchées par des réarrangements (contrairement à la région O). Les séquences des amorces ont été choisies par rapport à la forme archétype de référence WW (souche GenBank n°AB211371.1). Les amorces ont été synthétisées par la société Eurogentec® (www.eurogentec.com ; Belgique) et fournies sous forme lyophilisée. Elles ont été reconstituées à une concentration de 200µM dans de l’eau pure et stockées à -20°C. La séquence, la position et la température de fusion de chacune des amorces sont détaillées dans le Tableau 5. La localisation des différentes amorces par rapport à la région NCCR est représentée de manière schématique sur la Figure 18.

Tableau 5 – Caractéristiques des amorces utilisées pour l’amplification et le séquençage de l’ADN de la région NCCR du *BKPyV*

Nom	Séquence	Taille (bases)	Tm (°C)	Position*
BK-NCCR-F (sens)	5'- CCTTTACATCCTGCTCCATTT -3'	21	60,0	4832>4852
BK-NCCR-R (anti-sens)	5'- TCTACACTGTCTTCACCTCTAC -3'	22	60,0	407>386
BK-NCCR-F2 (sens)	5'- AAGCCTCCACACCCCTTACTA -3'	20	62,0	5094>5113
BK-NCCR-R2 (anti-sens)	5'- TCTACACTGTCTTCACCTCTACAA -3'	24	63,0	407>384
BK-NCCR-BRR1 (sens)	5'-GAGCTCCATGGATTCTTC-3'	18	?	4995>5012
BK-NCCR-BRR2 (anti-sens)	5'-CCAGTCCAGTTTTACCA-3'	18	?	326>309
BK-NCCR-NEST-R1 (anti-sens)	5'- CCATGGCCTTTGTCCAGTTTA -3'	21	47,3	271>251
BK-NCCR-NEST-R2 (anti-sens)	5'- CCATGGCCTTTGTCCAGTATTA -3'	22	47,9	271>254-A-253>251

*Souche de référence : WW (GenBank n°AB211371.1)

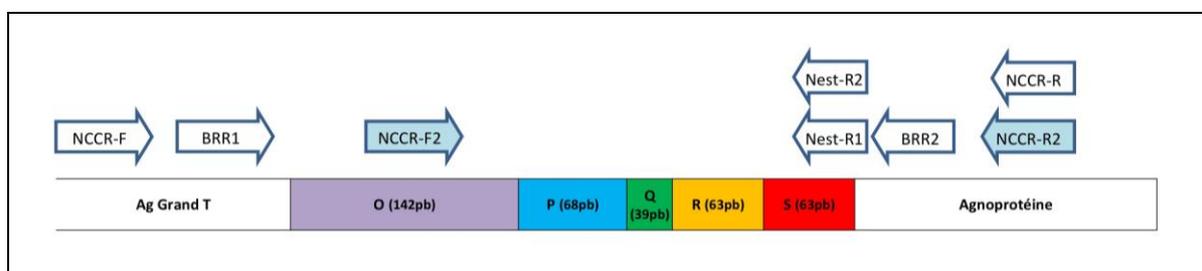


Figure 18 – Localisation des différentes amorces utilisées sur le génome du *BKPyV*

B. MÉTHODES

1. Population étudiée

La population de cette étude a été sélectionnée parmi les 594 patients de plus de 18 ans ayant subi une transplantation rénale ou une transplantation combinée rein-pancréas, entre le 1^{er} Janvier 2008 et le 31 Décembre 2011 et suivis au CHU de Nantes.

À partir du fichier des PCR *BKPyV* réalisées au laboratoire entre Janvier 2008 et Octobre 2012, nous avons restreint l’analyse de la variabilité NCCR aux patients ayant présenté une virémie élevée prolongée à *BKPyV* au cours de leur suivi. Pour ces patients, l’analyse de la variabilité génétique de la région NCCR a été réalisée sur le premier prélèvement positif à *BKPyV*, le prélèvement au moment du pic de virémie (charge virale la plus forte lors du suivi) et sur les prélèvements tous les 3 mois de suivi si disponibles.

2. Données cliniques et paracliniques

Certaines données cliniques et paracliniques ont été recueillies pour chaque patient au sein du système d'information hospitalière (Clinicom®, société InterSystems) et du système d'information du laboratoire (DxLab®, société Medasys) utilisés par le CHU de Nantes. Pour les 594 patients, l'âge, le sexe, le type de greffe (rein ou rein-pancréas) et les résultats des PCR BKPyV ont été renseignés. Des données supplémentaires ont été recueillies pour la population virémique faisant l'objet de l'étude (Tableau 6).

Tableau 6 – Données cliniques et paracliniques recueillies sur les patients avec virémie élevée prolongée à BKPyV (sous-groupe 4B)

Données cliniques	
Devenir des patients lors du suivi	Greffon fonctionnel ?
	Perte du greffon et étiologie retenue ?
	Décès lors du suivi et étiologie retenue ?
Données paracliniques (recueillies entre le 1 ^{er} Janvier 2008 et le 31 Octobre 2012)	
Créatininémie	En $\mu\text{mol/L}$
Tacrolémie résiduelle	En ng/mL
Résultats anatomo-pathologiques de biopsies de greffon	Stade de Néphropathie à BKPyV (A, B ou C)
Présence de Decoy cells dans les urines	

3. Amplification de la région NCCR

PCR externe

Le mélange réactionnel de la PCR utilisée pour l'amplification de la région NCCR était composé du prémix Ex Taq (Takara Bio Inc) contenant des dNTP en excès, un tampon (contenant du MgCl_2) et la Taq polymérase ; d'un couple d'amorces sens et anti-sens ; et de l'extrait d'ADN de l'échantillon étudié.

Les volumes et concentrations de chaque composant du mélange réactionnel étaient adaptés pour chaque couple d'amorces. La composition des différents mélanges réactionnels testés au cours de la phase de mise au point est résumée dans le Tableau 7.

Tableau 7 – Mélanges réactionnels pour l’amplification de la région NCCR du *BKPyV* en fonction du couple d’amorces

Couple d’amorces	Takara Prémix Ex Taq	Eau	Amorce sens	Amorce(s) antisens	Extrait d’ADN	Volume final par tube
BK-NCCR-F / BK-NCCR-R	10 µl	3,4 µl	0,8 µl (0,8 µM)	0,8 µl (0,8 µM)	5 µl	20 µl
BK-NCCR-F / BK-NCCR-R2	10 µl	3,4 µl	0,8 µl (0,8 µM)	0,8 µl (0,8 µM)	5 µl	20 µl
BK-NCCR-F2 / BK-NCCR-R2	12,5 µl	6,25 µl	0,625 µl (0,5 µM)	0,625 µl (0,5 µM)	5 µl	25 µl
BK-NCCR-BRR1 / BK-NCCR-BRR2	10 µl	3,8 µl	0,6 µl (0,6 µM)	0,6 µl (0,6 µM)	5 µl	20 µl
BK-NCCR-F2 / BK-NEST-R1+R2	12,5 µl	5,5 ou 8,5µl	1 µl (0,8 µM)	0,5 µl (0,4 µM)	5 ou 2µl	25 µl

L’amplification de la région NCCR a été réalisée sur le thermocycleur PTC-100® (Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc) ou le thermocycleur T100™ (BIORAD) permettant une variation rapide des températures nécessaires pour la réalisation des différentes étapes de la PCR (Figure 19).



Figure 19 – Thermocycleurs utilisés pour l’amplification de la région NCCR
Le PTC-100® (MJ Research Inc.) est présenté à gauche et le T100™ (BIORAD) à droite.

Le résultat est l’amplification sélective d’une séquence d’ADN spécifique par l’action répétée d’une ADN polymérase ADN dépendante (Taq polymérase) par succession de cycles. Pour n cycles de PCR, théoriquement 2^n copies de la région encadrée par le couple d’amorces sont obtenues (Figure 20). L’amplification démarre par une étape d’activation de la Taq polymérase, elle est suivie de n cycles d’amplifications comprenant trois étapes (Figure 21) :

- Dénaturation des brins d’ADN,
- Hybridation des amorces sur les brins
- Élongation des brins néoformés.

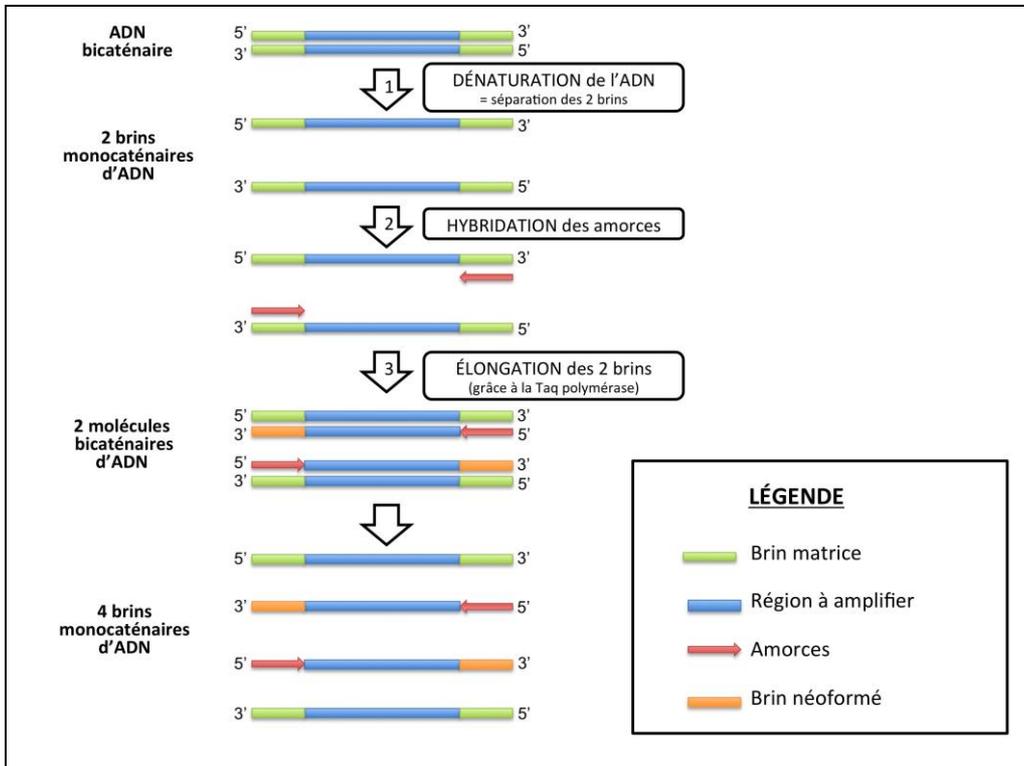


Figure 20 – Principe de la PCR

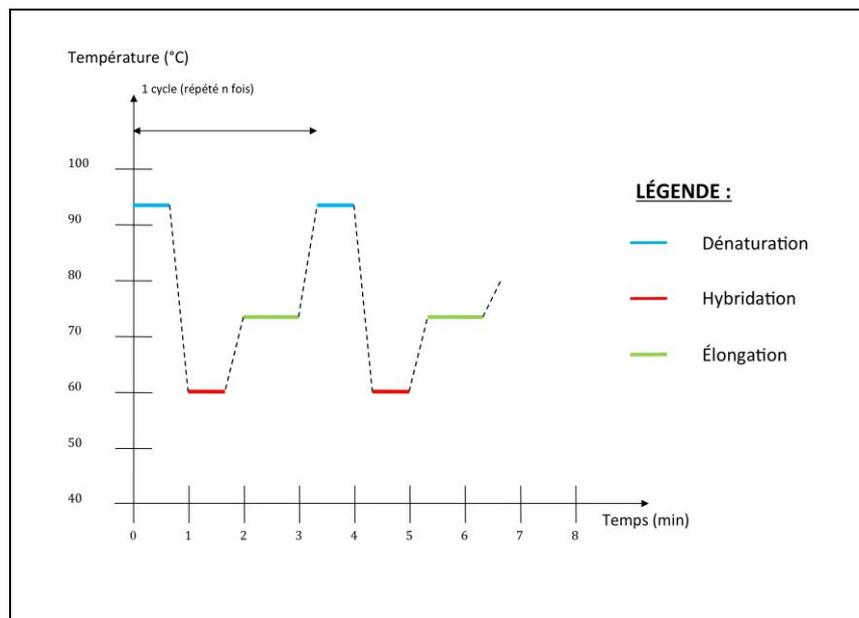


Figure 21 – Présentation des différentes étapes lors des cycles d'amplification par PCR
(D'après Laura Le Guen, 2014)

L'amplification de la région cible était contrôlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide 9% (composition : 10 mL d'acrylamide-bisacrylamide 9%, 100 μ L de persulfate d'ammonium 10% et 10 μ L de TEMED). Un volume de 3 μ L d'échantillon amplifié par PCR était ajoutés à 2 μ L de tampon de chargement (bleu de bromophénol) avant d'être déposés sur le gel. Le marqueur de taille (2 μ l) n° VI 150-2100 pb (Roche

Diagnosics) était également déposé sur le gel en parallèle des échantillons de PCR pour permettre l'identification de la bande d'intérêt. Après migration à 180 Volt pendant 30 minutes, le gel était placé dans une solution de bromure d'éthidium (BET), un intercalant de l'ADN pendant 15 minutes. La présence d'une bande de taille attendue (variable selon le couple d'amorces utilisé) au niveau du témoin positif et l'absence de bande du témoin négatif permettait de valider la réaction. La présence d'une bande de taille proche du témoin positif pour les échantillons étudiés signalait la bonne amplification de la séquence cible du *BKPyV* (Figure 22). La taille du produit d'amplification pouvait donc varier en fonction du couple d'amorces utilisé (Tableau 8), mais également en cas de réarrangement (délétion et/ou insertion) de la région NCCR.

Tableau 8 – Couples d'amorces utilisés pour l'amplification de la région NCCR

Couples d'amorces	Région amplifiée (en pb)
BK-NCCR-F (sens) / BK-NCCR-R (anti-sens)	717 pb
BK-NCCR-F (sens) / BK-NCCR-R2 (anti-sens)	717 pb
BK-NCCR-F2 (sens) / BK-NCCR-R2 (anti-sens)	455 pb

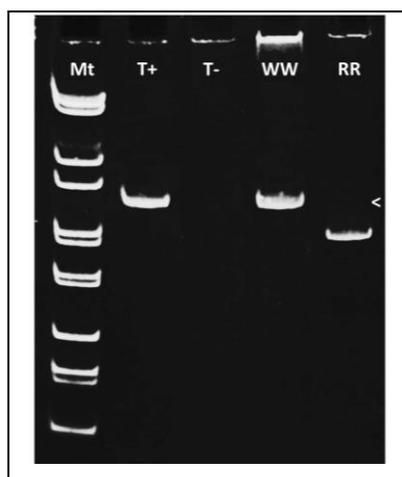


Figure 22 – Produits d'amplification de la région NCCR du *BKPyV*

Gel de polyacrylamide présentant un échantillon avec une forme archétype WW de la région NCCR et un échantillon avec une forme réarrangée RR de la région NCCR. Le réarrangement observé est une délétion. T+ correspond au témoin positif (souche archétype connue de la région NCCR), T- correspond au témoin négatif et Mt correspond au marqueur de taille. Le symbole « < » montre le nombre de paires de base attendu (717pb) pour une forme archétype (avec les amorces BK-NCCR-F et R utilisées ici).

Nested-PCR (PCR nichée) et Semi-nested

Afin d'augmenter la spécificité et la sensibilité, une nested-PCR (PCR nichée) ou une semi-nested PCR a été réalisée sur certains échantillons. Le principe de la nested-PCR consiste à pratiquer une deuxième PCR en utilisant une deuxième série d'amorces spécifiques d'une région interne du premier produit ADN amplifié (Figure 23). Ainsi le fragment produit lors de la première PCR est utilisé comme matrice pour la seconde PCR. Le risque accru de contamination est un inconvénient de cette augmentation de sensibilité. Le principe de la semi-nested est identique sauf qu'une seule amorce interne est utilisée en couple avec une des deux amorces externes de la première PCR.

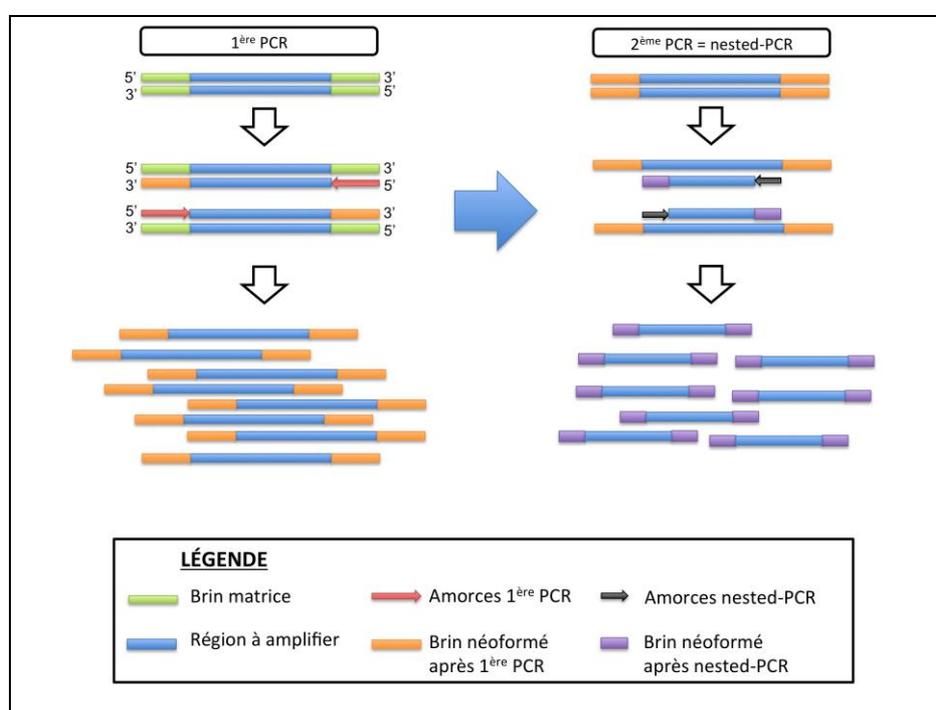


Figure 23 – Principe de la nested-PCR (PCR nichée)

Le Tableau 9 présente les différents couples d'amorces utilisés pour la nested-PCR et la semi-nested PCR.

Tableau 9 – Couples d'amorces utilisés pour la nested-PCR et la semi-nested PCR

Couples d'amorces	Région amplifiée (en pb)
BK-NCCR-BRR1 (sens) / BK-NCCR-BRR2 (anti-sens)	473 pb
BK-NCCR-F2 (sens) / BK-NCCR-NEST-R1 (anti-sens)	319 pb
BK-NCCR-F2 (sens) / BK-NCCR-NEST-R2 (anti-sens)	320 pb

4. Séquençage de la région NCCR

Étape de purification enzymatique des produits de PCR

Cette étape était nécessaire afin d'éliminer les amorces sens et anti-sens et les dNTPs non incorporés utilisés en excès pour la PCR. En effet lors du séquençage, les amorces sont utilisées indépendamment l'une de l'autre afin de ne séquencer le produit de PCR que dans un seul sens à la fois, il ne faut donc plus aucune trace des deux amorces initiales. Les produits de PCR dont l'amplification a été contrôlée par électrophorèse étaient récupérés.

La plaque de purification était déposée selon le plan de séquençage. Un μL de l'enzyme Exostar (GE, Healthcare) et 5 μL du produit de PCR sont déposés sur la plaque de purification sur glace. La plaque est centrifugée 30 secondes à 3500 rpm. L'Exostar contient deux enzymes, l'Exonucléase 1 et l'Alcaline phosphatase. L'Exonucléase 1 permet d'éliminer les amorces et l'Alcaline phosphatase d'inactiver les dNTPs non incorporés. La purification était réalisée sur le thermocycleur PTC-100®, elle contenait deux étapes, une de 15 minutes à 37°C pour permettre l'action des deux enzymes et une de 15 minutes à 80°C pour les inactiver et les éliminer. En fonction de l'intensité des bandes obtenues lors de l'électrophorèse, les produits de PCR purifiés étaient dilués pour réaliser le séquençage.

Réaction de séquençage

La réaction de séquençage a été réalisée selon la technique de Sanger sur le séquenceur ABI Prism® 3130. Il s'agit d'une succession de cycles composés d'une étape de dénaturation de l'ADN double brin, d'une étape d'hybridation de l'amorce sens ou antisens suivie par une étape d'extension de l'amorce par incorporation aléatoire de dNTP ou de ddNTP. Les ddNTPs sont des dérivés des dNTPs ayant perdu le radical hydroxyle (OH) sur le carbone du pentose en 3' mais ayant une extrémité 5' identique au dNTP matriciel. L'absence du radical OH en 3' rend impossible l'incorporation de dNTP à la suite d'un ddNTP (pas de liaison possible en 3') provoquant l'arrêt de la synthèse du brin ADN pour la partie du produit de PCR ayant intégré ce ddNTP. Cependant les autres copies du brin continuent leur extension jusqu'à l'intégration d'un ddNTP. Il y a donc production de fragments de tailles différentes (Figure 24).

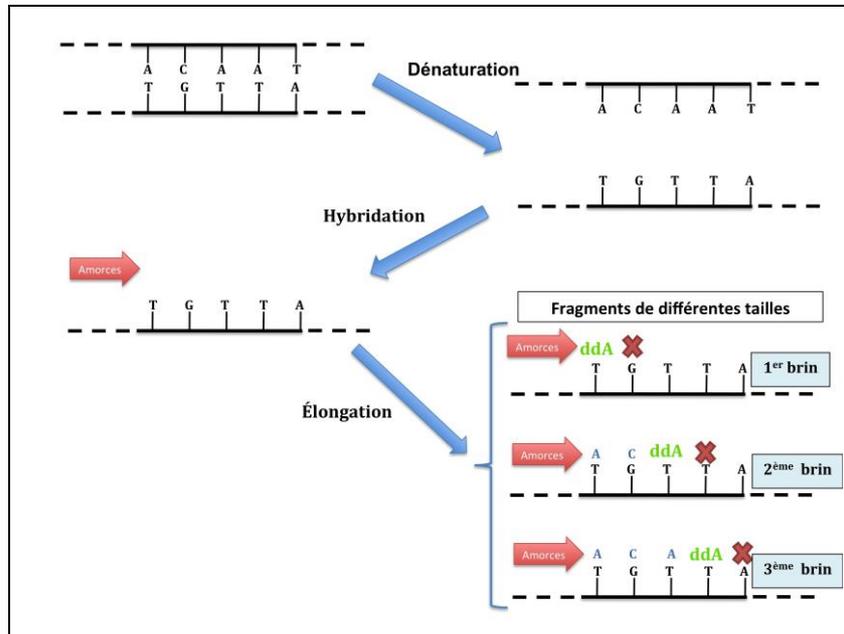


Figure 24 – Principe du séquençage selon la méthode de Sanger

En pratique, 2 μL d'amorces sens et anti-sens étaient déposés dans chaque puits de la plaque de séquence et 5 μL de la dilution des produits de PCR purifiés étaient ajoutés par puits en fonction du plan de séquence. À ces 7 μL étaient ajoutés 3 μL de Big Dye TerminatorTM dilué au 1/3 dans du tampon 5X. Le Big Dye TerminatorTM est un terminateur de chaîne, il est composé de dNTPs, ddNTPs, tampon, magnésium et de la Taq polymérase. La plaque de séquence était centrifugée 30 secondes à 3500 rpm puis la réaction de séquençage était réalisée sur le thermocycleur PTC-100®, elle comprenait 25 cycles de trois étapes : 15 secondes à 96°C pour la dénaturation, 5 secondes à 50°C pour l'hybridation et 2 minutes à 60°C pour l'élongation.

Purification des produits de séquençage

Les produits de séquençage étaient purifiés sur une plaque de filtration Millipore contenant une résine de billes G50 (50g de billes dans 1L d'eau extra pure). Les produits de séquençage étaient déposés sur la résine et filtrés par centrifugation 4 minutes à 2000 rpm à 4°C dans la plaque de purification de séquençage contenant 10 μL de formamide HIDI permettant de dénaturer les brins d'ADN. Les éléments non désirés entrent dans les billes de purification composant la résine, ils sont donc retenus. En revanche, les fragments à séquencer de taille supérieure, contournent les billes et sortent plus rapidement dans la plaque de purification de séquençage (Figure 25).

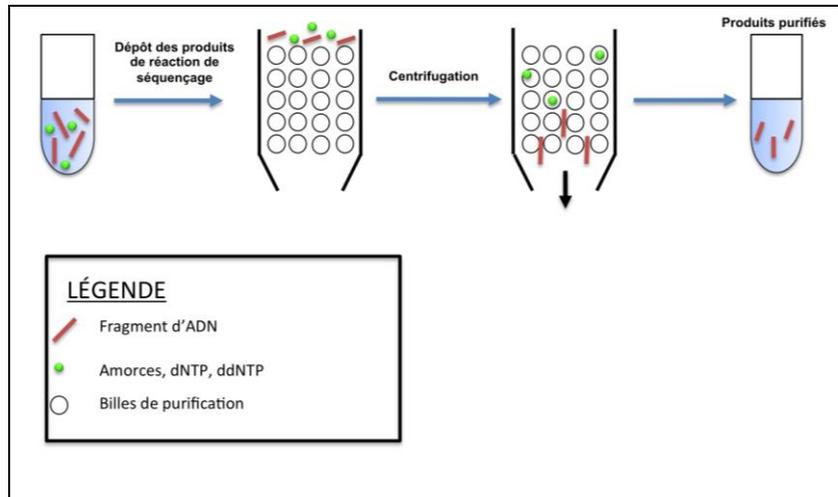


Figure 25 – Purification des produits de séquençage

Électrophorèse capillaire sur séquenceur

Les différents fragments obtenus durant le séquençage étaient séparés par électrophorèse capillaire en fonction de leur taille (Figure 26, Figure 27). Chacun des quatre ddNTP était marqué par un fluorochrome différent, chaque fragment était identifié par le ddNTP situé à son extrémité 3' par la technique du FRET (fluorescence par transfert d'énergie de résonance). La séquence complète du produit de PCR amplifié pouvait donc être reconstituée d'après les ddNTP incorporés. La fluorescence était traduite en spectre d'émissions. La séquence obtenue, représentée par les pics sur le chromatogramme était par la suite analysée avec le logiciel Seqscape®.

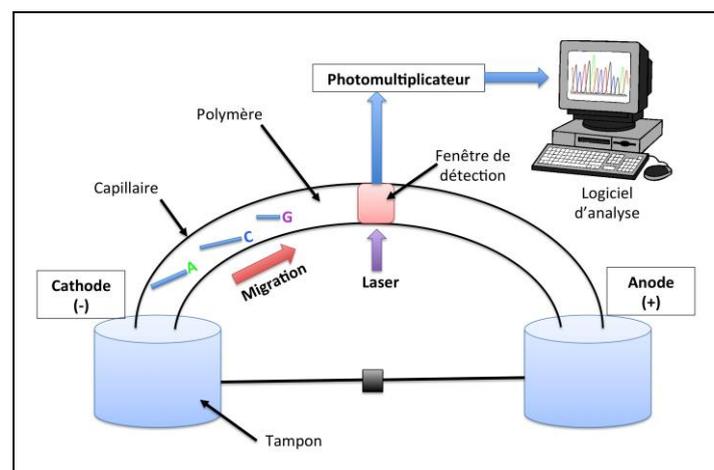


Figure 26 – Principe de l'électrophorèse capillaire

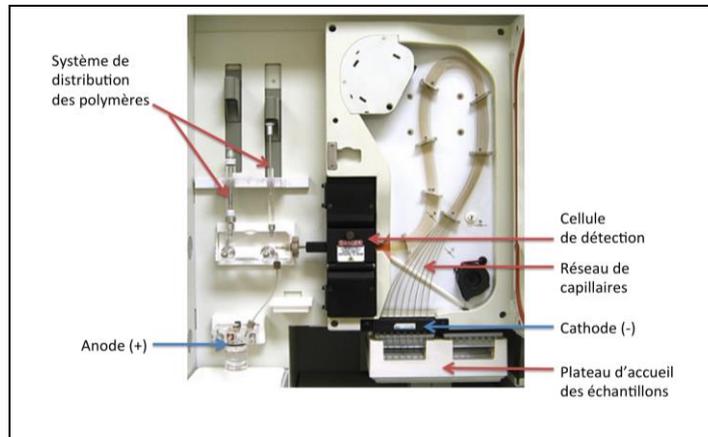


Figure 27 – Vue ouverte du séquenceur ABI Prism® 3130

Analyse bioinformatique

Les séquences obtenues étaient ensuite alignées manuellement à l'aide du logiciel Mega5® (Figure 28) avec la séquence NCCR de la souche de référence *BKPyV* WW (GenBank n°AB211371.1). Les séquences obtenues pour la région NCCR étaient trop complexes (association de délétions et duplications possibles) pour être alignées automatiquement.

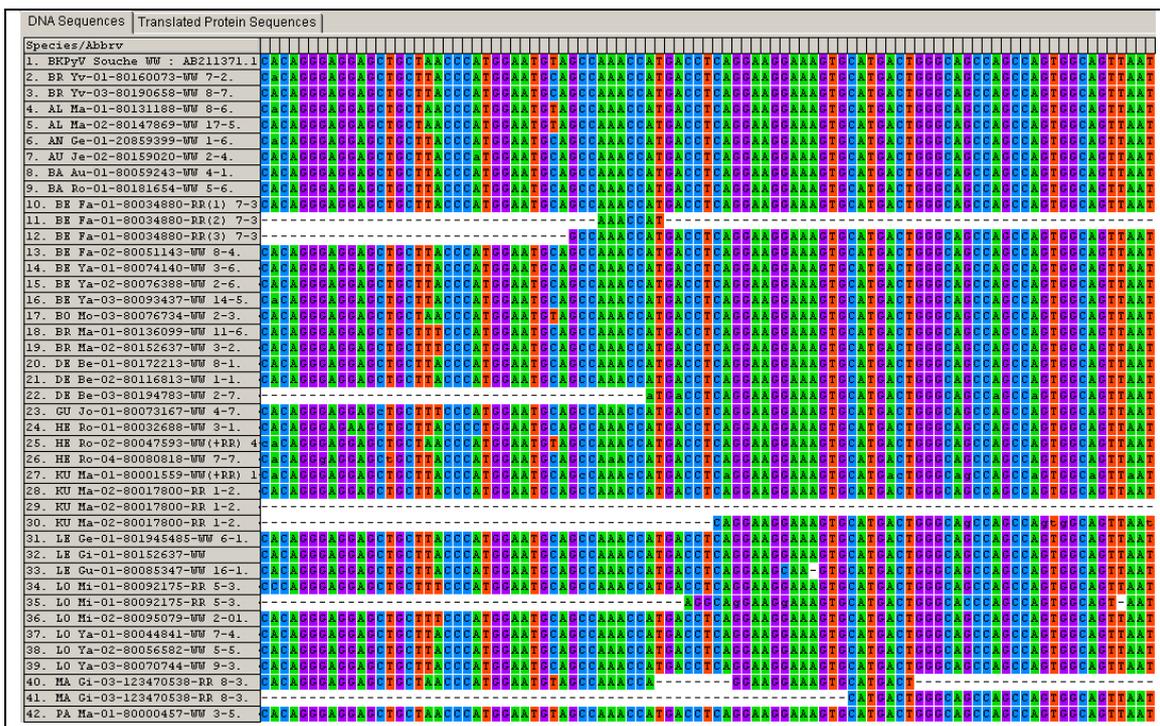


Figure 28 – Alignements des séquences NCCR avec le logiciel Mega5®

5. Clonage moléculaire des séquences NCCR

Lorsque plusieurs bandes, correspondant probablement à plusieurs sous-populations virales, étaient observées sur le gel d'électrophorèse, un clonage du produit d'amplification NCCR a été réalisé à l'aide du kit « TOPO vector (TOPO-TA Cloning Kit) » (Invitrogen™). Le mélange réactionnel pour la ligation du fragment amplifié dans le plasmide était composé de 2µL de produit de PCR, 1µL de solution saline, 2µL d'eau stérile et 1µL de TOPO vector. La transformation bactérienne s'effectuait par choc thermique (les tubes initialement à 4°C sont mis à 42°C pendant 30 secondes puis remis à 4°C) dans des bactéries *E. coli* TOPO10. Les bactéries étaient ensuiteensemencées sur des géloses LB + ampicilline 50 µg/ml contenant du X-Gal (substrat chromogénique de la β-galactosidase) puis incubées à 37°C pendant une nuit entière. La sélection des bactéries se faisait grâce au système blanc-bleu et celles ayant intégrées le plasmide étaient réensemencées indépendamment sur des géloses. L'extraction de l'ADN plasmidique était effectuée avec le kit « QIAprep Miniprep » (Qiagen) qui consiste à casser les parois bactériennes, fixer les acides nucléiques sur une membrane de silice et, après différents lavages avec des tampons alcooliques, à récupérer l'ADN par élution. Les extraits étaient ensuite amplifiés par PCR NCCR, purifiés et séquencés. Le clonage a été réalisé par S. Mazalrey (Unité de recherche EA4271-Immunologie et polymorphisme génétique).

6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT® Version 2014.2.03 (Addinsoft™). Pour l'étude de la relation avec des valeurs qualitatives, le test exact de Fisher a été utilisé. Pour l'étude de la relation avec des valeurs quantitatives (après étude de la normalité par le test de Shapiro-Wilk), le test *t* de Student a été utilisé pour ceux dont la distribution suit une loi Normale. Pour comparer les valeurs ne présentant pas une distribution normale, le test *U* de Mann-Whitney a été utilisé.

V. RÉSULTATS

La première partie présente les différentes étapes de la mise au point et l'optimisation des conditions expérimentales pour l'amplification de la région NCCR à partir d'extraits d'ADN de sang total.

La deuxième partie présente la fréquence des infections à BKPyV dans la cohorte de patients transplantés rénaux étudiés et les caractéristiques cliniques et biologiques de la sous-population avec virémie élevée prolongée.

La dernière partie présente les résultats de l'étude de la variabilité génétique dans le groupe de patients avec virémie élevée prolongée. La fréquence des sous-populations réarrangées est d'abord présentée ainsi que l'architecture des différentes souches obtenues et les conséquences éventuelles sur les sites de fixation de facteurs de transcription reconnus. Les liens éventuels entre néphropathies à BKPyV et sous-populations réarrangées sont ensuite analysés en comparant deux sous-groupes de patients suivant la présence ou l'absence de sous-populations virales réarrangées.

A. OPTIMISATION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES POUR L'AMPLIFICATION DE LA RÉGION NCCR

Différentes conditions expérimentales ont été testées sur des dilutions du contrôle positif, sur un extrait contenant de l'ADN humain, sur des extraits d'urines de patients connus positifs et sur des extraits de sang total de patients connus négatifs et positifs en PCR BKPyV, visant à choisir un couple d'amorces couvrant l'intégralité de la région NCCR et permettant de garantir une bonne spécificité et une sensibilité suffisante.

1. Choix de la température d'hybridation

Une amplification sur 35 cycles avec un gradient de température d'hybridation a été réalisée sur le témoin positif 10^{-4} , le témoin positif 10^{-5} et sur un extrait contenant de l'ADN humain (Human Genomic DNA, Roche Diagnostics) pour choisir la température d'hybridation optimale. Après le contrôle des produits de PCR par électrophorèse, la température d'hybridation optimale des amorces pour chaque couple est celle avec la meilleure sensibilité et la meilleure spécificité (présence d'une bande dont l'intensité est la plus forte avec le témoin positif 10^{-4} ou 10^{-5} et absence de bande avec l'extrait d'ADN

humain). Le Tableau 10 présente le programme des cycles d'amplification choisi pour chaque couple d'amorces.

Tableau 10 – Programme des cycles pour l'amplification de la région NCCR du *BKPyV* en fonction du couple d'amorces

Couple d'amorces	Dénaturation	Hybridation	Élongation	Nombre de cycles
BK-NCCR-F / BK-NCCR-R	95°C (20 sec)	60°C (30 sec)	72°C (1 min)	45
BK-NCCR-F / BK-NCCR-R2	95°C (20 sec)	60°C (30 sec)	72°C (1 min)	45
BK-NCCR-F2 / BK-NCCR-R2	95°C (20 sec)	60°C (30 sec)	72°C (1 min)	45
BK-NCCR-BRR1 / BK-NCCR-BRR2	91°C (20 sec)	54°C (20 sec)	72°C (30 sec)	35
BK-NCCR-F2 / BK-NEST-R1+R2	95°C (20 sec)	55°C (30 sec)	72°C (1 min)	35

2. Choix du couple d'amorces

Choix des amorces externes

- Couple d'amorces **BK-NCCR-BRR1 et BRR2** :

Les amorces BK-NCCR-BRR1 et 2 étaient utilisées initialement au laboratoire comme amorces externes pour l'amplification de la région NCCR du *BKPyV*, mais présentaient comme inconvénient un manque de spécificité rendant leur utilisation difficile. De nouvelles amorces BK-NCCR-F et R ont donc été dessinées.

- Couple d'amorces **BK-NCCR-F et R** :

La spécificité de ces nouvelles amorces a été étudiée par la recherche d'amplifications non spécifiques après amplification sur un témoin d'ADN humain, sur des extraits d'ADN issus de sang total de patients connus négatifs en PCR *BKPyV* et sur des extraits d'ADN issus de sang total de patients connus positifs en PCR *BKPyV* (non inclus dans cette étude). Les amorces BK-NCCR-F et R montraient, pour un patient connu négatif, une bande après migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide au même niveau que la bande attendue pour une PCR *BKPyV* positive avec nos amorces (Figure 29B). Après séquençage et comparaison de la séquence sur BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool), le produit amplifié s'est révélé être une séquence d'ADN humain retrouvée au niveau du chromosome 9 (Human DNA sequence from clone RP11-418K10 on chromosome 9, GenBank: AL357293.16). Cette même bande était retrouvée avec le témoin d'ADN humain pour des températures inférieures à 60°C (Figure 29A). Nous en avons donc conclu que nos amorces initiales manquaient de spécificité.

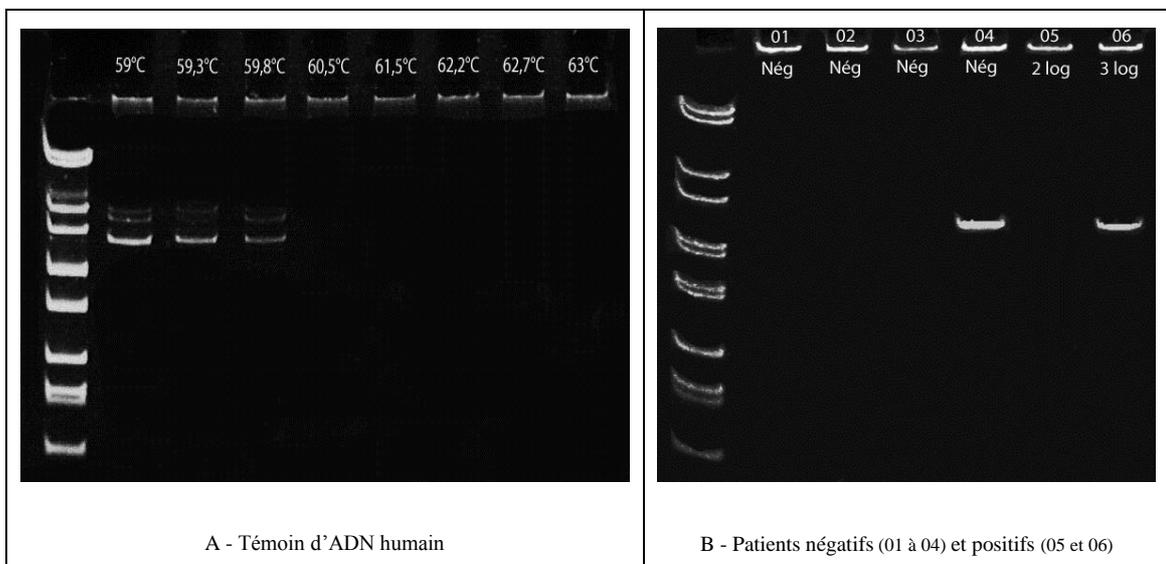


Figure 29 – Tests de spécificité du couple d'amorces BK-NCCR-F/R

A = Test du témoin d'ADN humain avec gradient de température (59°C à 63°C).

B = Test de patients connus négatifs et positifs (2 log₁₀ cp/ml et 3 log₁₀ cp/ml) en PCR BKPyV.

- Couple d'amorces BK-NCCR-F et R2 :

Afin d'augmenter la spécificité de la PCR de la région NCCR, l'amorce anti-sens a été redessinée. L'amorce BK-NCCR-R2 a ainsi été allongée de 2 bases AA par rapport à l'amorce BK-NCCR-R. Un seul patient (sur les 7 testés) présentait une bande au niveau attendu après migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide (Figure 30). Après séquençage, il s'agissait aussi d'une séquence d'ADN humain. Elle n'a été retrouvée que dans un seul cas avec ce nouveau couple d'amorces. Il ne s'agissait pas de la même séquence par rapport au couple d'amorces précédent après étude sur BLAST® (Homo sapiens BAC clone CH17-129M10 from chromosome unknown, GenBank: AC243569.3).

Afin de tester la sensibilité de ce couple d'amorces, des gradients de concentration du témoin positif (de 10⁻⁶ à 10⁻²) ont été réalisés. Pour confirmer le bon fonctionnement de la PCR, des essais d'amplification ont ensuite été réalisés sur différents échantillons d'urines et/ou d'extraits d'ADN issus de sang total de patients positifs (inclus ou non dans l'étude). Ces essais ont montré une absence d'amplification avec le couple d'amorces BK-NCCR-F et R2 (un seul extrait sanguin avait pu être amplifié avec BK-NCCR-F et R) malgré de fortes charges virales urinaires et sanguines. Ces résultats semblent en faveur d'un problème de matrice (accessibilité de l'ADN, variabilité de la séquence) pour les échantillons cliniques

empêchant le fonctionnement correct attendu de notre PCR NCCR plutôt qu'un problème de sensibilité.

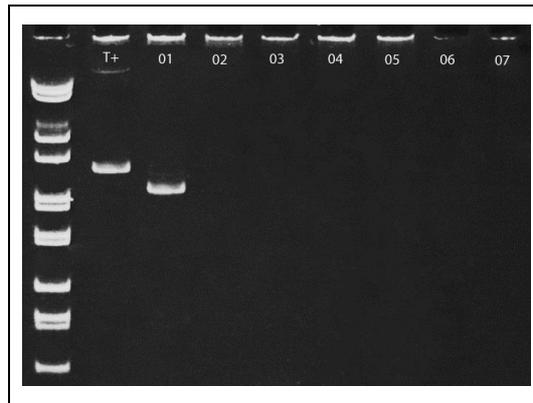


Figure 30 – Test de spécificité du couple d'amorces BK-NCCR-F/R2

Gel de polyacrylamide après migration électrophorétique montrant l'amplification non spécifique d'ADN humain pour le patient 01 et l'absence d'amplification pour les patients 02 à 07 connus positifs en PCR BKPyV (charge virale de 3,3 à 4,1 log₁₀ cp/mL). T+ = Témoin positif.

- **Couple d'amorces BK-NCCR-F2 et R2 :**

Une nouvelle amorce sens (BK-NCCR-F2) a finalement été dessinée pour palier à ce problème de matrice. Ce couple d'amorces présentait une sensibilité moindre par rapport aux amorces précédentes (lors des tests avec le témoin positif) mais ne montrait pas de problèmes de spécificité. Ce couple d'amorces a permis l'amplification de la séquence NCCR du BKPyV pour les extraits issus de sang total de patients non inclus dans l'étude dont la charge virale était $\geq 3,7 \log_{10}$ cp/mL. Ce couple d'amorces a donc été choisi pour l'amplification de l'ensemble des extraits des patients inclus dans l'étude malgré leur manque de sensibilité.

Choix des amorces internes

- **Couple d'amorces BK-NCCR-BRR1 et BRR2 :**

Ces amorces ont finalement été utilisées dans notre étude comme amorces internes après une première amplification par le couple d'amorces BK-NCCR-F et BK-NCCR-R. La présence de multiples bandes sur le témoin négatif utilisé (patient connu négatif en PCR BKPyV) et sur les patients connus positifs lors des Nested-PCR confirmait le manque de spécificité de ces amorces (Figure 31).

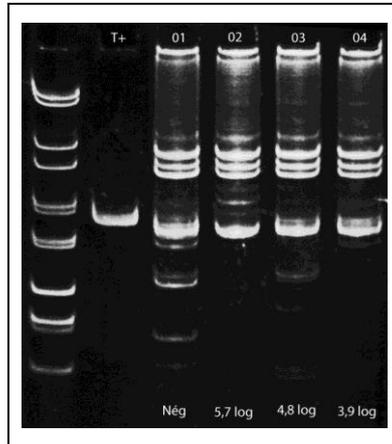


Figure 31 – Test de spécificité du couple d’amorces BK-NCCR-BRR1/BRR2

Gel de polyacrylamide après migration électrophorétique d’un patient connu négatif en PCR BKPyV (patient 01) et de patients connus positifs en PCR BKPyV (patients 02 à 04).

T+ = Témoin positif.

- **Amorces BK-NCCR-F2, BK-NEST-R1 et BK-NEST-R2 :**

De nouvelles amorces anti-sens (BK-NEST-R1 et BK-NEST-R2) ont donc été dessinées pour être utilisées avec l’amorce BK-NCCR-F2 dans le cadre d’une semi-Nested afin de palier au manque de sensibilité du couple BK-NCCR-F2/R2. L’association de deux amorces anti-sens a été rendue nécessaire par la présence d’un polymorphisme au niveau de la région d’hybridation désirée pour cette amorce. En effet, une insertion T par rapport à la forme archétype de référence est fréquemment retrouvée entre la position 253 et 254. Les tests d’amplification effectués avec ce couple d’amorces ont montré une absence d’amplification sur des extraits d’échantillons cliniques. Aucun prélèvement de patient de l’étude n’a pu être séquencé à partir de ces amorces.

Les résumés des résultats obtenus pour les différents tests de spécificité et sensibilité de chaque couple d’amorces sont présentés dans le Tableau 11 et le Tableau 12.

Tableau 11 – Résultats des tests de spécificité en fonction du couple d’amorces

Couple d’amorces	TESTS DE SPÉCIFICITÉ		
	Sur Témoin ADN Humain	Sur extraits ADN sang total de patients négatifs en PCR BKPyV	Sur extraits ADN sang total de patients positifs en PCR BKPyV
BK-NCCR-F / BK-NCCR-R	Amplification non spécifique d’ADN humain (chromosome 9) pour températures d’hybridation < à 60°C	Amplification non spécifique d’ADN humain (chromosome 9)	Absence d’amplification non spécifique retrouvée
BK-NCCR-F / BK-NCCR-R2	Absence d’amplification non spécifique retrouvée	<i>Non réalisé</i>	Amplification non spécifique d’ADN humain
BK-NCCR-F2 / BK-NCCR-R2	Absence d’amplification non spécifique retrouvée	<i>Non réalisé</i>	Absence d’amplification non spécifique retrouvée
BK-NCCR-BRR1 / BK-NCCR-BRR2	<i>Non réalisé</i>	Amplifications non spécifiques (bandes multiples)	Amplifications non spécifiques (bandes multiples)
BK-NCCR-F2 / BK-NEST-R1+R2	<i>Non réalisé</i>	<i>Non réalisé</i>	Absence d’amplification non spécifique retrouvée

Tableau 12 – Résultats des tests de sensibilité en fonction du couple d’amorces

Couple d’amorces	TESTS DE SENSIBILITÉ		
	Limite de détection du Témoin positif	Sur échantillons d’urines de patients positifs en PCR BKPyV	Sur extraits d’ADN sang total de patients positifs en PCR BKPyV
BK-NCCR-F / BK-NCCR-R	10⁻⁵	<i>Non réalisé</i>	Amplification pour 1 extrait sur 22 testés
BK-NCCR-F / BK-NCCR-R2	10⁻⁵	Absence d’amplification	Absence d’amplification sur 6 testés
BK-NCCR-F2 / BK-NCCR-R2	10⁻⁴	Amplification positive	Amplification positive à partir d’une charge virale \geq à 3,7 log ₁₀ cp/ml
BK-NCCR-BRR1 / BK-NCCR-BRR2	<i>Non réalisé</i>	<i>Non réalisé</i>	Amplification pour 1 extrait sur 9 testés (après PCR externe BK-NCCR-F / BK-NCCR-R)
BK-NCCR-F2 / BK-NEST-R1+R2 (N°1 et 2)	10⁻⁴	<i>Non réalisé</i>	Absence d’amplification

B. FRÉQUENCE DES INFECTIONS À *BKPyV* DANS LA COHORTE DE TRANSPLANTÉS RÉNAUX

Entre le 1^{er} Janvier 2008 et le 31 Décembre 2011, 675 patients ont bénéficié d'une transplantation rénale. Pour 594 d'entre eux, un monitoring des infections à *BKPyV* a été réalisé (Figure 32).

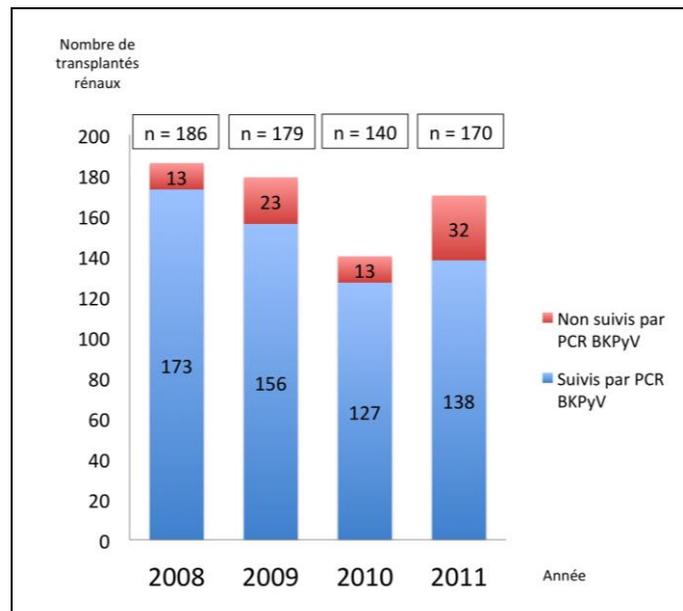


Figure 32 – Nombre de transplantés rénaux et réno-pancréatiques par an et nombre de ceux suivis chaque année par PCR *BKPyV* entre 2008 et 2011

Nous avons individualisé 4 groupes en fonction des résultats des PCR *BKPyV* dans les urines et le sang (Figure 33):

- **Groupe 1** = Urine négative et Sang négatif (n = 390 ; 66%)
- **Groupe 2** = Urine positive (sur au moins un prélèvement) et Sang négatif (n = 99 ; 17%)
- **Groupe 3** = Urine négative et Sang positif avec charge virale $\leq 3 \log_{10}$ cp/mL (sur au moins un prélèvement) (n = 15 ; 2%)
- **Groupe 4** = Urine positive et Sang positif (n = 90 ; 15%)

Un **sous-groupe 4B** (au sein du groupe 4) de 46 patients caractérisés par au moins deux virémies consécutives dont au moins une charge virale $> 3 \log_{10}$ cp/mL a pu ainsi être individualisé.

Une virurie supérieure à $7 \log_{10}$ cp/mL était détectée au moins une fois chez 23 patients du groupe 2 (23,2%), chez 20 patients du groupe 4A (45,5%) et chez 42 patients du groupe 4B (91,3%). Une néphropathie à *BKPyV* a été confirmée histologiquement chez 16 patients

(2,7%), entraînant la perte du greffon pour 7 d'entre eux (43% des NBKV et 1,2% des transplantés).

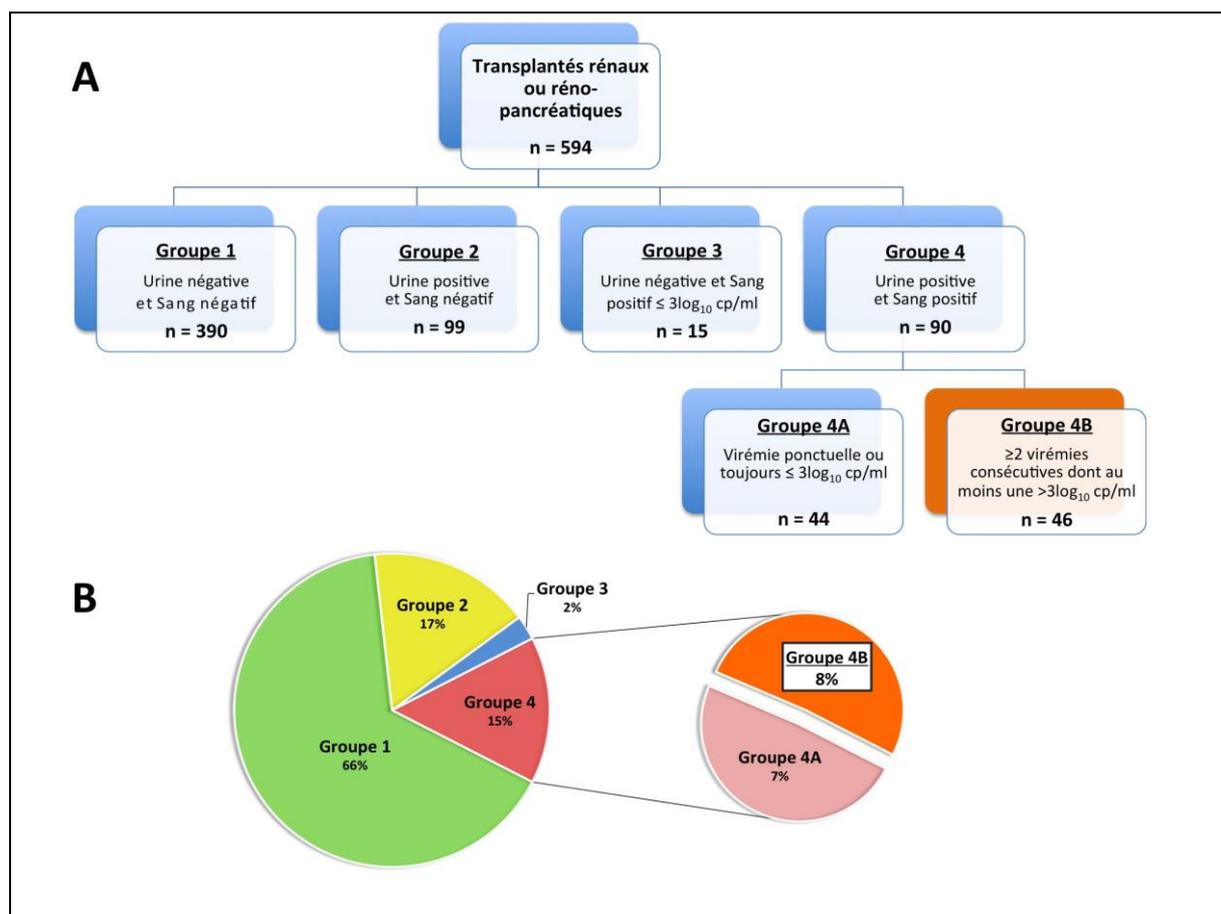


Figure 33 – Répartition des patients transplantés rénaux et réno-pancréatiques au CHU de Nantes entre 2008 et 2011 suivant le dépistage de la réplication à BKPyV

Les patients sont répartis en fonction des résultats des PCR urinaires et sanguines réalisées lors du suivi post-transplantation. Le sous-groupe 4B des patients avec virémie élevée prolongée à BKPyV est encadré en orange. A = Effectifs par groupe et sous-groupe. B = Proportion (%) par groupe et sous-groupe.

C. CARACTÉRISTIQUES DU SOUS-GROUPE AVEC VIRÉMIE PROLONGÉE

Sur les 46 patients du groupe 4B, 2 patients ont été exclus en l'absence de conservation des extraits d'ADN. Parmi eux, 40 avaient au moins 2 virémies consécutives $\geq 3 \log_{10}$ cp/mL dont 31 patients au moins 2 virémies $\geq 4 \log_{10}$ cp/mL. Les patients inclus ont eu pendant leur suivi de 2 à 29 prélèvements sanguins positifs (soit 8,3 prélèvements positifs en moyenne).

Le Tableau 13 résume les principaux éléments du suivi virologique de ces patients : le délai moyen du prélèvement du 1^{er} temps de suivi était de 5 mois mais très variable entre les

patients (de 15 à 726 jours), le délai moyen de détection de la 1^{ère} virémie positive était situé entre le 7^{ème} et 8^{ème} mois après la greffe, le pic de virémie (charge virale moyenne de 5,2 log₁₀ cp/mL) était lui détecté entre le 10^{ème} et le 11^{ème} mois, et la durée moyenne de virémie (délai entre la 1^{ère} virémie positive et la dernière virémie positive ou le dernier point de suivi si celui-ci est positif) était de 12 mois.

Tableau 13 – Caractéristiques cliniques et biologiques du sous-groupe de patients avec virémie élevée prolongée à *BKPyV* (sous-groupe 4B)

Données cliniques		
Sexe masculin (effectif)		27 / 44 (61,4%)
Âge médian (années)		55,5 (20 – 79)
Type de greffe (effectif)	Rénale	42 / 44 (95,5%)
	Réno-pancréatique	2 / 44 (4,5%)
Données biologiques		
Charge virale moyenne au pic de virémie (log ₁₀ cp/mL)		5,2 (3,1-7,8)
Charge virale moyenne lors de la 1 ^{ère} détection de la virémie (log ₁₀ cp/mL)		4,3 (2-7,1)
Délai moyen entre la greffe et le 1 ^{er} temps de suivi réalisé par PCR <i>BKPyV</i> dans le sang (jours)		159 (15-726)
Délai moyen entre la greffe et la détection de la 1 ^{ère} virémie (jours)		233 (35-1030)
Délai moyen entre la greffe et la détection du pic de virémie (jours)		326 (78-1390)
Délai moyen entre la greffe et la détection de la dernière virémie positive (jours)		589 (78-1521)
Durée moyenne de suivi par PCR <i>BKPyV</i> (jours)		718 (97-1546)
Durée moyenne de virémie (jours)		356 (12-1222)

Le Tableau 14 présente les effectifs par classe de probabilité de NBKV en fonction des résultats biologiques et anatomopathologiques pour ces patients.

Tableau 14 – Effectifs par classe de probabilité de néphropathie à *BKPyV* pour le sous-groupe de patients avec virémie prolongée (sous-groupe 4B)

	NBKV			
	Prouvée	Probable	Possible	Absence
Effectif	16 / 44	18 / 44	6 / 44	4 / 44
(%)	(36,4%)	(40,9%)	(13,6%)	(9,1%)

D.ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DE LA RÉGION NCCR

1. Fréquence des sous-populations réarrangées

La variabilité génétique de la région NCCR a ensuite été étudiée chez les patients du sous-groupe 4B. Au total, 147 extraits d'ADN (de 1 à 7 par patients) ont été analysés, correspondant pour chaque patient à la première virémie positive, au pic de charge virale et, si disponibles, aux prélèvements de suivi. La région NCCR n'a pu être amplifiée et séquencée que sur 56 prélèvements chez 31 patients (70,5% des patients).

Ces prélèvements correspondaient pour la majorité d'entre eux à des virémies supérieures à 4,4 log₁₀ cp/mL, alors que les séquences NCCR n'étaient jamais amplifiées pour une virémie inférieure à 3,2 log₁₀ cp/mL (Tableau 15).

Tableau 15 – Nombre de prélèvements avec au moins une séquence NCCR analysable en fonction de la charge virale

	CHARGE VIRALE BKPyV		
	≥4,4 log ₁₀ cp/ml	entre 3,2 et 4,4 log ₁₀ cp/ml	<3,2 log ₁₀ cp/ml
Nombre de prélèvements avec au moins une séquence NCCR analysable	46/57 (80,7%)*	10/61 (16,4%)	0/29 (0%)

* Les 11 échecs sont dus à des échecs d'amplification (n=9) et des échecs de séquençage (n=2).

La Figure 34 présente des exemples de gel d'électrophorèse réalisés après amplification de la région NCCR qui permettent de visualiser les différents cas de figure rencontrés :

- Présence d'une forme archétype
- Présence d'une sous-population réarrangée
- Association d'une forme archétype et d'une sous-population réarrangée
- Présence de bandes multiples (nécessitant une analyse par clonage)
- Absence d'amplification

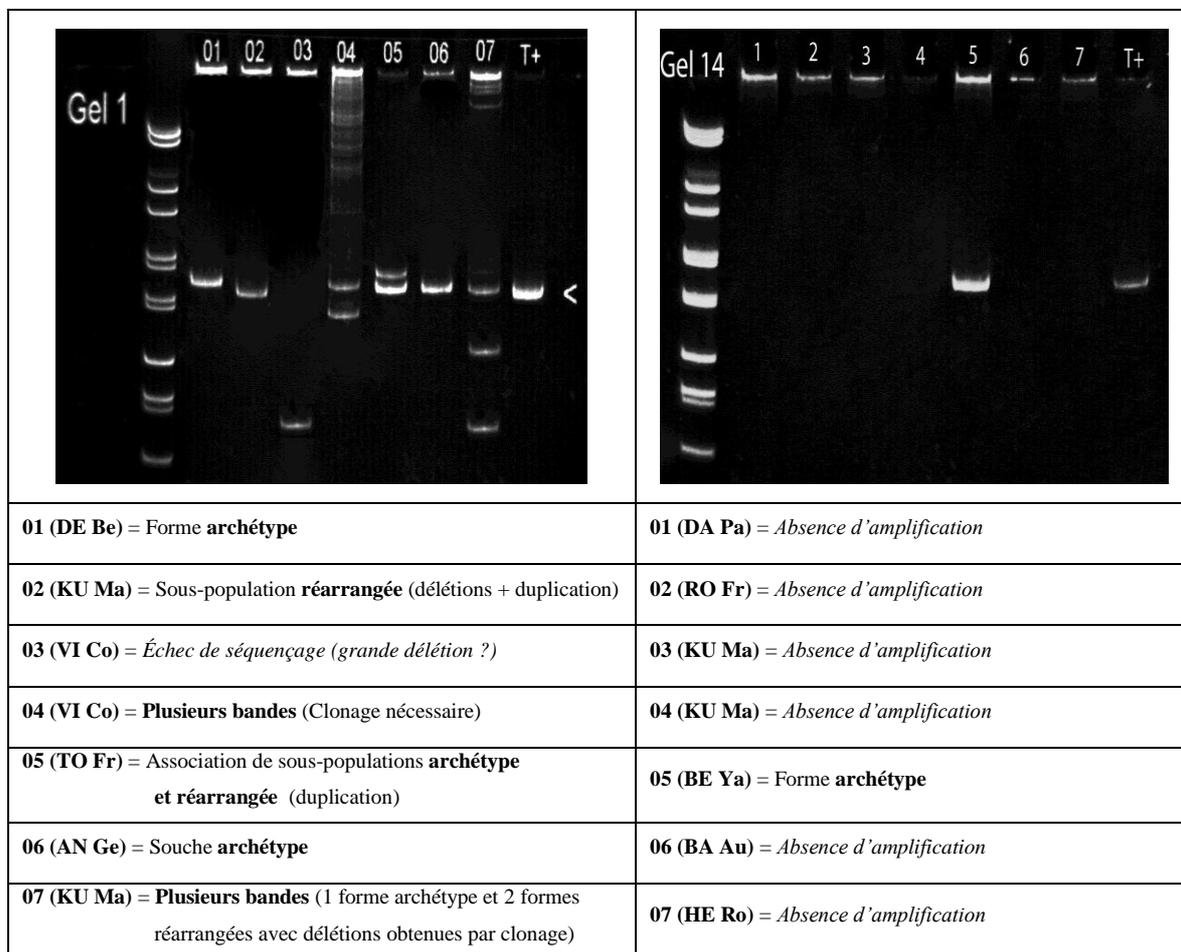


Figure 34 – Exemples de migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide des produits d'amplification de la région NCCR

Le Gel 1 correspond aux extraits avec les charges virales les plus élevées (de 6,5 à 7,8 \log_{10} cp/mL) alors que le Gel 14 correspond à des extraits avec une charge virale beaucoup plus faible ($3,5 \log_{10}$ cp/ml) pour lequel un seul extrait a pu être amplifié et séquencé. T+ = témoin positif.

Le tableau présente les résultats après analyse du séquençage pour chaque extrait si réalisé.

Au total, sur les 31 patients pour lesquels au moins une séquence NCCR était analysable, une forme réarrangée était détectée chez 11 d'entre eux (Figure 35). Soixante-neuf sous-populations virales de BKPyV ont pu être séquencées (de 1 à 8 par patient) dont 15 par clonage. L'analyse par prélèvement est présentée dans la Figure 36.

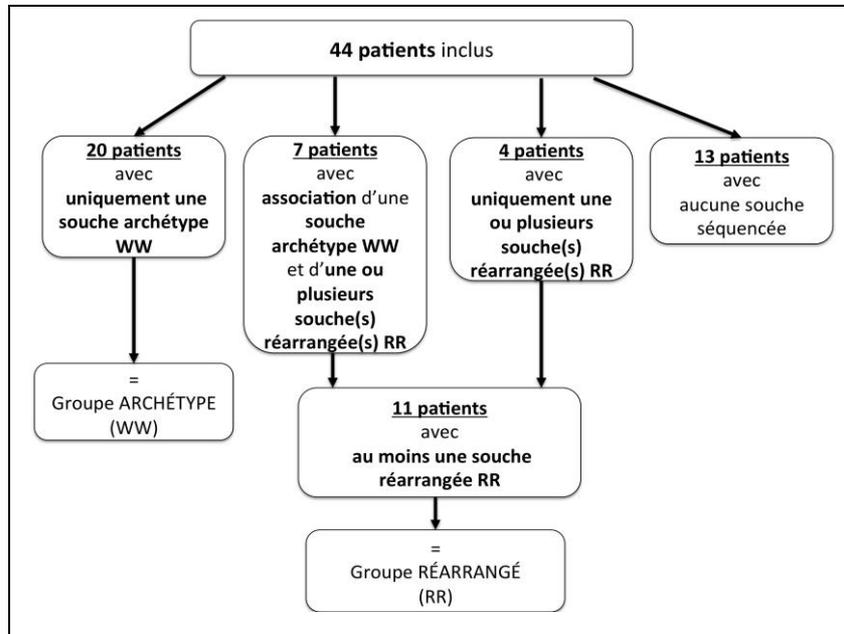


Figure 35 – Répartition des patients en fonction des résultats du séquençage

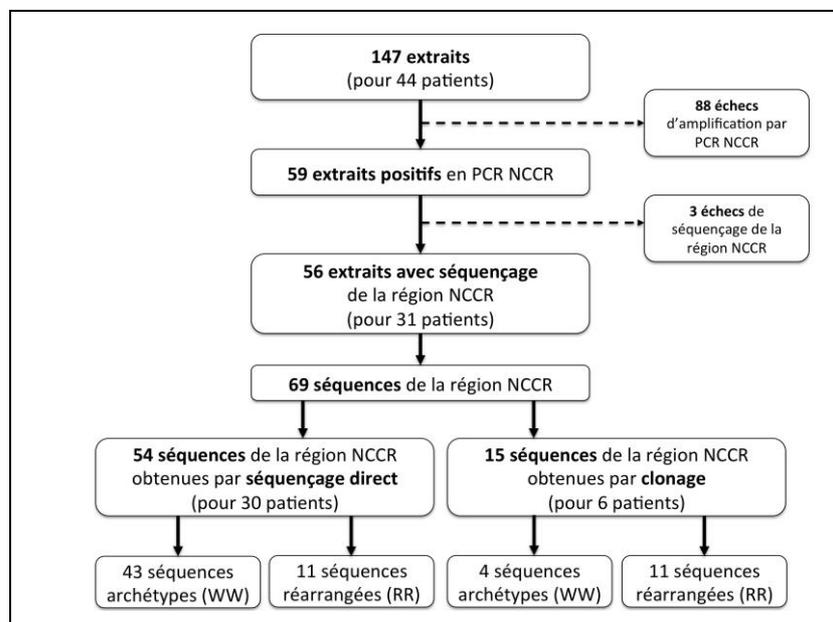


Figure 36 – Répartition des extraits d'ADN en fonction des résultats de l'amplification et du séquençage

En ce qui concerne la cinétique d'apparition des formes réarrangées pour les 11 patients du groupe réarrangé : 5 patients ont eu une sous-population réarrangée détectée pour la première fois dès la 1^{ère} virémie, 4 patients lors du pic de virémie et 2 patients après le pic de virémie. Un seul patient (PE Mi) avait une séquence réarrangée identique au moment de la 1^{ère} virémie et au moment du pic de virémie. Deux patients avaient des formes réarrangées différentes lors de plusieurs points de suivi.

2. Description de la variabilité génétique des différentes séquences NCCR

Sur les 69 sous-populations virales séquencées, 47 (68,1%) étaient considérées comme archétypes pour les régions PQRS de la région NCCR, c'est-à-dire ayant une séquence identique à la séquence de référence WW (GenBank n°AB211371.1) ou présentant simplement des mutations ponctuelles (substitution, insertion ou délétion d'un nucléotide). Les 22 autres sous-populations virales (31,9%) étaient des formes réarrangées (Figure 37). Elles présentaient soit des duplications importantes d'une ou plusieurs portions des régions P, Q et R, soit des délétions importantes, soit une combinaison des deux.

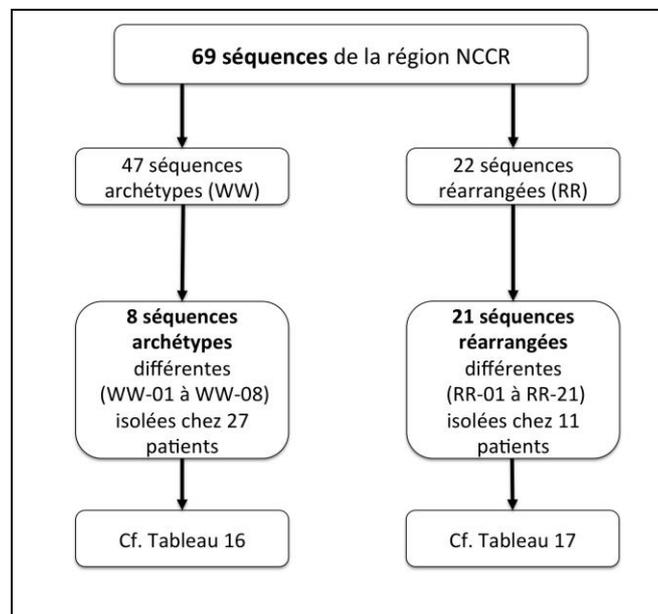
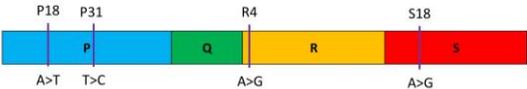
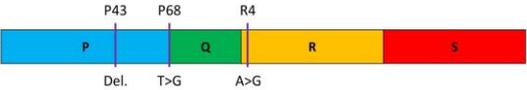
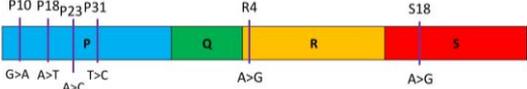
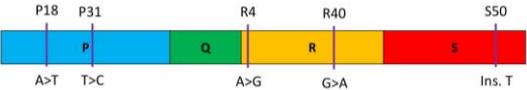
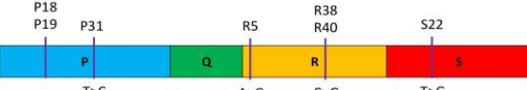
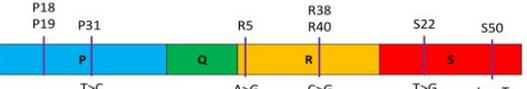
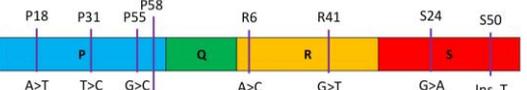


Figure 37 – Répartition des séquences en fonction du type de sous-population virale (archétype ou réarrangé)

Sous-populations virales archétypes

Sur les 47 souches archétypes, on retrouvait 8 séquences différentes (WW-01 à WW-08) caractérisées par la présence uniquement de mutations ponctuelles. Ces séquences sont présentées dans le Tableau 16.

Tableau 16 – Représentation schématique des séquences archétypes WW retrouvées pour la région NCCR

Séquence	Patient	NBKV
WW-01 	AL Ma	PROBABLE
	BO Mo	PROUVÉE
	HE Ro	PROUVÉE
	PA Ma	PROUVÉE
	RO Jo	PROBABLE
	TO Fr	PROUVÉE
WW-02 	AN Ge	PROUVÉE
	AU Je	PROUVÉE
	BA Au	PROBABLE
	BA Ro	PROUVÉE
	BE Fa	PROBABLE
	BE Ya	PROBABLE
	BR Yv	PROUVÉE
	DA Pa	PROUVÉE
	DE Be	PROUVÉE
	HE Ro	PROUVÉE
	KU Ma	PROUVÉE
	LE Gi	PROBABLE
	LE Ge	PROBABLE
	LO Ya	PROBABLE
SA Mo	PROUVÉE	
SO Al	PROBABLE	
WW-03 	MA Gi	PROBABLE
WW-04 	HE Ro	PROUVÉE
WW-05 	SE Mi	PROUVÉE
WW-06 	LO Mi	PROBABLE
WW-07 	BR Ma	PROBABLE
	GU Jo	PROBABLE
WW-08 	LE Gu	NON

La Figure 38 présente les différentes mutations ponctuelles retrouvées pour les formes archétypes, leur position au sein de la région NCCR ainsi que le site de fixation de facteurs de transcription potentiellement atteint pour chaque mutation.

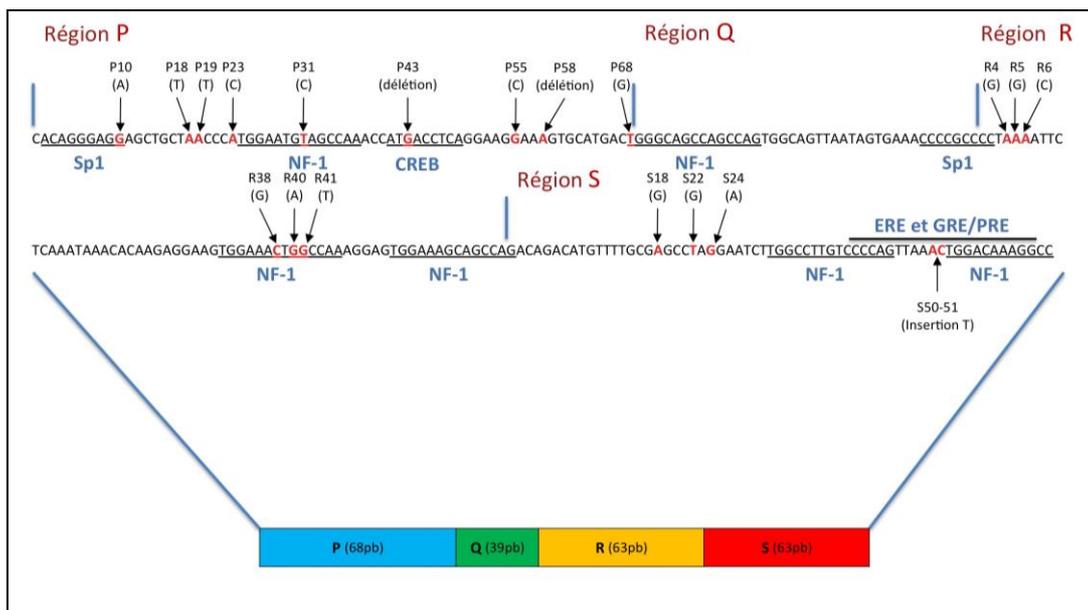


Figure 38 – Mutations ponctuelles retrouvées pour les formes archétypes WW de la région NCCR

Le schéma montre la localisation et le type de mutation ponctuelle (en rouge) ainsi que le site de fixation de facteurs de transcription potentiellement atteint pour chaque mutation décrite (en bleu).

Souches réarrangées

Sur les 22 sous-populations virales réarrangées, on retrouvait 21 séquences différentes. Deux sous-populations identiques étaient en effet retrouvées sur 2 prélèvements distincts pour le même patient (PE Mi). Le Tableau 17 présente les différentes sous-populations virales réarrangées retrouvées ainsi que les sites de fixation des facteurs de transcription atteints par ses réarrangements.

Tableau 17 – Représentation schématique des séquences réarrangées RR retrouvées pour la région NCCR

La méthode d'obtention de la séquence par séquençage direct (S) ou après clonage (C) est indiquée à droite du schéma de chaque séquence.

Séquence		Site(s) de fixation atteint(s)		Patients	NBKV
		Par une délétion	Par une duplication		
<p>P Q1-29(P'36-42)(P''33-68 Q'1-34)R52-63 S</p> <p>RR-01</p>	S	Sp1 (Q33-R2) NF-1 (R32-R45)	CREB (P41-P49) NF-1 (P68-Q14)	BE Fa	PROBABLE
<p>P Q R1-19 (P'42-68 Q'1-30) R52-63 S</p> <p>RR-02</p>	C	NF-1 (R32-R45)	CREB (P41-P49) NF-1 (P68-Q14)		
<p>O1-89 S33-63</p> <p>RR-03</p>	C	Sp1 (P2-P10) NF-1 (P24-P37) CREB (P41-P49) NF-1 (P68-Q14) Sp1 (Q33-R2) NF-1 (R32-R45) NF-1 (R51-S1)		DA Pa	PROUVÉE
<p>P Q R1-19 (P'42-68 Q'1-30) R52-63 S</p> <p>RR-04</p>	C	NF-1 (R32-R45)	CREB (P41-P49) NF-1 (P68-Q14)	HE Ro	PROUVÉE
<p>P1-17</p> <p>RR-05</p>	C	NF-1 (P24-P37) CREB (P41-P49) NF-1 (P68-Q14) Sp1 (Q33-R2) NF-1 (R32-R45) NF-1 (R51-S1) NF-1 (S31-S45) ERE-GRE/PRE (S41-S61) NF-1 (S52-S63)			
<p>P Q1-34</p> <p>RR-06</p>	C	Sp1 (Q33-R2) NF-1 (R32-R45) NF-1 (R51-R63) NF-1 (S31-S45) ERE-GRE/PRE (S41-S61) NF-1 (S52-S63)		KU Ma	PROUVÉE
<p>P Q1-25 R47-57 (P'48-68 - Q'1-25) (R'47-57) R58-63 S</p> <p>RR-07</p>	S	Sp1 (Q33-R2) NF-1 (R32-R45)	NF-1 (P68-Q14)		
<p>P Q1-37 (InsAGG) (P'48-68 Q'1-35) (InsC) R25-63 S</p> <p>RR-08</p>	S	NF-1 (P68-Q14)		LO Mi	PROBABLE

<p>P1-41 P50-68 Q1-5 (P'20-41 P''50-68 Q'1-5) Q6-39 R1-36 S56-63</p> <p>RR-09</p>	C	<p>CREB (P41-P49) NF-1 (R32-R45) NF-1 (R51-S1) NF-1 (S31-S45) ERE-GRE/PRE (S41-S61) NF-1 (S52-S63)</p>	NF-1 (P24-P37)	MA Gi	PROBABLE
<p>P1-41 P50-68 (P'62-68) Q R1-8 S28-63</p> <p>RR-10</p>	C	<p>CREB (P41-P49) NF-1 (R32-R45) NF-1 (R51-S1)</p>			
<p>P1-41 P50-68 (insG) (P'20-41 P''50-68) Q R S</p> <p>RR-11</p>	C	<p>CREB (P41-P49)</p>	NF-1 (P24-P37)		
<p>P1-41 P50-68 (P'62-68) Q R1-12 S41-63</p> <p>RR-12</p>	C	<p>CREB (P41-P49) NF-1 (R32-R45) NF-1 (R51-S1) NF-1 (S31-S45)</p>			
<p>P1-41 P50-68 (P'62-68) Q R1-6 S60-63</p> <p>RR-13</p>	C	<p>CREB (P41-P49) NF-1 (R32-R45) NF-1 (R51-S1) NF-1 (S31-S45) ERE-GRE/PRE (S41-S61) NF-1 (S52-S63)</p>			
<p>P1-41 P50-68 (P'62-68) Q R1-11 S31-63</p> <p>RR-14</p>	C	<p>CREB (P41-P49) NF-1 (R32-45) NF-1 (R51-S1)</p>			
<p>P1-41 P50-68 (P'62-68) Q R1 S44-63</p> <p>RR-15</p>	S	<p>CREB (P41-P49) NF-1 (R32-45) NF-1 (R51-S1) NF-1 (S31-S45)</p>			
<p>P Q R1-3 R32-63 S</p> <p>RR-16</p>	S			PE Mi	PROBABLE
<p>S33-63</p> <p>RR-17</p>	S	<p>Sp1 (P2-P10) NF-1 (P24-P37) CREB (P41-P49) NF-1 (P68-Q14) Sp1 (Q33-R2) NF-1 (R32-R45) NF-1 (R51-S1)</p>		RI Ge	PROUVÉE
<p>P Q1-24 (P'39-68 Q'1-24) Q25-39 R S</p> <p>RR-18</p>	S		<p>CREB (P41-P49) NF-1 (P68-Q14)</p>		
<p>P Q1-33 (P'14-68 Q'1-33) Q34-39 R S</p> <p>RR-19</p>	S		<p>NF-1 (P24-35) CREB (P41-P49) NF-1 (P68-Q14)</p>	RO Fr	PROUVÉE
<p>P Q1-21 (P'36-68 Q'1-21) Q22-39 R S</p> <p>RR-20</p>	S		<p>CREB (P41-P49) NF-1 (P68-Q14)</p>	TO Fr	PROUVÉE
<p>P Q1-25 R47-63 S</p> <p>RR-21</p>	S	<p>Sp1 (Q33-R2) NF-1 (R32-45)</p>		VI Co	PROUVÉE

La Figure 39 présente les différentes mutations ponctuelles retrouvées pour les formes réarrangées, leur position au sein de la région NCCR ainsi que le site de fixation de facteurs de transcription potentiellement atteint pour chaque mutation.

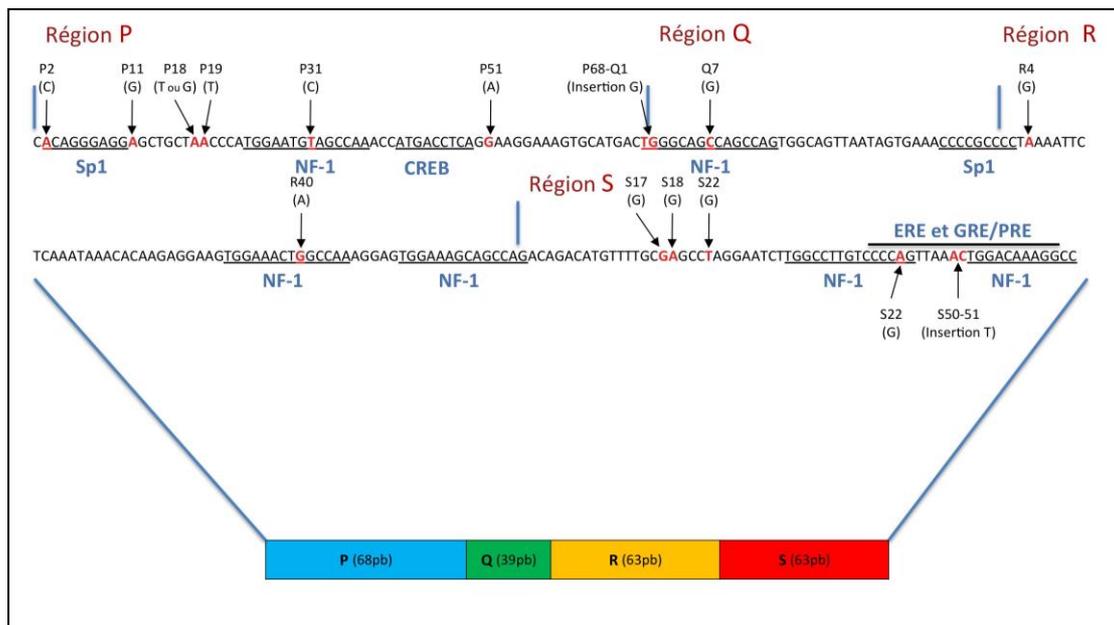


Figure 39 – Mutations ponctuelles retrouvées pour les formes réarrangées RR de la région NCCR

Le schéma montre la localisation et le type de mutation ponctuelle (en rouge) ainsi que le site de fixation de facteurs de transcription potentiellement atteint pour chaque mutation décrite (en bleu).

Le Tableau 18 présente les effectifs selon le ou les blocs P, Q, R et/ou S atteints de la région NCCR et le type de réarrangement (délétion ou duplication). Les délétions étaient plus fréquentes que les duplications. La délétion du bloc **R** est la plus retrouvée (81,8% des souches réarrangées) mais tous les blocs peuvent être touchés et toutes les combinaisons sont possibles. Trois patients avec des délétions touchant les 4 blocs ont ainsi été retrouvés, ces 3 patients avaient tous une atteinte avancée puisqu'ils avaient tous une NBKV prouvée. Des duplications ont été retrouvées essentiellement au niveau des blocs **P** et **Q**.

Tableau 18 – Effectifs par bloc de la région NCCR atteint en fonction du type de réarrangement et association éventuelle à une néphropathie à BKPyV prouvée.

Type de réarrangement et bloc concerné	Effectif	Associé à une NBKV prouvée (effectif)
TOTAL	9 / 11 (81,8%)	5 / 9 (55,6%)
Délétion		
Délétion P	4 / 11 (36,4%)	3 / 4 (75%)
Délétion Q	6 / 11 (54,5%)	4 / 6 (66,7%)
Délétion R	9 / 11 (81,8%)	5 / 9 (55,6%)
Délétion S	4 / 11 (36,4%)	3 / 4 (75%)
Délétion QR	6 / 11 (54,5%)	4 / 6 (66,7%)
Délétion RS	4 / 11 (36,4%)	3 / 4 (75%)
Délétion QRS	3 / 11 (27,3%)	3 / 3 (100%)
Délétion PQRS	3 / 11 (27,3%)	3 / 3 (100%)
Duplication		
TOTAL	8 / 11 (72,7%)	5 / 8 (62,5%)
Duplication P	8 / 11 (72,7%)	5 / 8 (62,5%)
Duplication Q	8 / 11 (72,7%)	5 / 8 (62,5%)
Duplication R	1 / 11 (%)	1 / 1 (100%)
Duplication PQ	8 / 11 (72,7%)	5 / 8 (62,5%)
Association Délétion + Duplication	6 / 11 (54,5%)	3 / 6 (50%)

Le Tableau 19 présente les effectifs par site de fixation de facteurs de transcription atteint selon le type de réarrangement (délétion ou duplication). La présence de réarrangements au niveau de ces différents sites était fréquemment associée à une NBKV prouvée (dans 50 à 100% des cas). Des délétions ont touché tous les sites de fixations connus, aucun site n'est donc indispensable. Cependant, les sites **NF-1** (R32 – R45), **Sp1** (Q33 – R2) et **NF-1** (R51 – S1) ont fréquemment subi des délétions mais n'ont jamais été dupliqués. À l'opposé, les sites **CREB** (P41 – P49) et **NF-1** (P68 – Q14) ont été plus souvent dupliqués que délétés.

Tableau 19 – Effectifs par site de fixation de facteurs de transcription atteint selon le type de réarrangement et association éventuelle à une néphropathie à BKPyV prouvée

Site de fixation de facteurs de transcription	Type de réarrangement	Effectif	Associé à une NBKV prouvée (effectif)
Sp1 (P2 – P10)	Délétion	2 / 11 (18,2%)	2 / 2 (100%)
	Duplication	0 / 11 (0%)	
NF-1 (P24 – P35)	Délétion	3 / 11 (27,3%)	3 / 3 (100%)
	Duplication	1 / 11 (9,1%)	1 / 1 (100%)
CREB (P41 – P49)	Délétion	4 / 11 (36,4%)	3 / 4 (75%)
	Duplication	5 / 11 (45,5%)	4 / 5 (80%)
NF-1 (P68 – Q14)	Délétion	4 / 11 (36,4%)	3 / 4 (75%)
	Duplication	5 / 11 (45,5%)	4 / 5 (80%)
Sp1 (Q33 – R2)	Délétion	5 / 11 (45,5%)	4 / 5 (80%)
	Duplication	0 / 11 (0%)	
NF-1 (R32 – R45)	Délétion	7 / 11 (63,6%)	5 / 7 (71,4%)
	Duplication	0 / 11 (0%)	
NF-1 (R51 – S1)	Délétion	4 / 11 (36,4%)	3 / 4 (75%)
	Duplication	0 / 11 (0%)	
NF-1 (S31 – S45)	Délétion	2 / 11 (18,2%)	1 / 2 (50%)
	Duplication	0 / 11 (0%)	
ERE et GRE/PRE (S41 – S61)	Délétion	2 / 11 (18,2%)	1 / 2 (50%)
	Duplication	0 / 11 (0%)	
NF-1 (S52 – 63)	Délétion	2 / 11 (18,2%)	1 / 2 (50%)
	Duplication	0 / 11 (0%)	

3. Comparaison des données clinico-biologiques des patients du groupe 4B en fonction de la séquence NCCR

Caractéristiques générales des groupes de patients avec forme réarrangée et avec forme archétype

L'âge moyen était de 55 ans pour le groupe réarrangé (de 36 à 79 ans) et de 54 ans pour le groupe archétype (de 20 à 72 ans). Il y avait 63,6% d'hommes (7/11) dans le groupe réarrangé et 75% d'hommes (15/20) dans le groupe archétype. Le Tableau 20 présente les données concernant le déroulement du suivi pour les groupes archétype WW et réarrangé RR. Le nombre de prélèvements sanguins réalisés dans les 6 premiers mois post-greffe était significativement plus important dans le groupe archétype. On n'observait par contre pas de différence après les 6 premiers mois de suivi.

Tableau 20 – Données concernant le suivi des patients par PCR *BKPyV* en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées

Critère étudié	Patient avec forme WW n = 20	Patient avec forme RR n = 11	Significativité	Test statistique
Nombre moyen de prélèvements réalisés lors des 6 premiers mois de suivi post-greffe	2,45 (0-7)	0,64 (0-2)	p = 0,02	Test <i>U</i> de Mann-Whitney
Nombre moyen de prélèvements réalisés après plus de 6 mois de suivi post- greffe	9,10 (2-23)	14,00 (3-40)	p = 0,089 (NS)	Test <i>U</i> de Mann-Whitney
Nombre moyen de prélèvements réalisés lors des 12 premiers mois de suivi post-greffe	6,85 (3-13)	4,82 (0-9)	p = 0,105 (NS)	Test <i>U</i> de Mann-Whitney
Délai moyen entre la greffe et le 1 ^{er} temps de suivi réalisé par PCR <i>BKPyV</i> dans le sang (jours)	128,1 (15 - 337)	209,4 (26-726)	p=0,099 (NS)	Test <i>U</i> de Mann-Whitney

Variabilité génétique de la région NCCR et virémie à *BKPyV*

Le Tableau 21 présente les résultats d’intensité de la charge virale (au moment de la détection de la 1^{ère} virémie au cours du suivi et au moment du pic de virémie), la durée de la virémie et les délais de détection d’une 1^{ère} virémie à *BKPyV*, de détection du pic de virémie et de détection de la dernière virémie par rapport à la greffe en fonction de la présence ou non d’une forme réarrangée observée lors du suivi. La présence d’une souche réarrangée RR n’était pas associée à des charges virales plus élevées dans le sang (Figure 40). La durée de virémie n’était pas significativement plus longue pour les patients avec une souche réarrangée malgré une durée en moyenne plus élevée pour ces patients (485,6 jours versus 338,2 jours) (Figure 41). Les délais de détection de la 1^{ère} virémie et du pic de virémie sont plus tardifs dans le groupe réarrangé par rapport au groupe archétype.

Tableau 21 – Caractéristiques de la virémie à BKPyV en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées

Critère étudié	Patient avec forme WW n = 20	Patient avec forme RR n = 11	Significativité (p)	Test statistique
Charge virale moyenne lors de la 1 ^{ère} détection de la virémie (log ₁₀ cp/mL)	4,4 (2,0-6,3)	5,1 (2,6-7,1)	p = 0,172 (NS) IC95% [-0,309 ; 1,647]	Test <i>t</i> de student
Charge virale moyenne au pic de virémie (log ₁₀ cp/mL)	5,67 (3,3 - 7,8)	5,82 (4,0 - 7,3)	p = 0,729 (NS) IC95% [-0,660 ; 0,926]	Test <i>t</i> de student
Durée moyenne de virémie (jours)	338,2 (13 - 858)	485,6 (62 - 1222)	p = 0,967 (NS)	Test <i>U</i> de Mann-Whitney
Délai moyen entre la greffe et la 1 ^{ère} détection de la virémie (jours)	137,2 (35 - 337)	341,4 (177 - 1030)	p = 0,001	Test <i>U</i> de Mann-Whitney
Délai moyen entre la greffe et la détection du pic de virémie (jours)	202,1 (99 - 524)	513,9 (192 - 1390)	p = 0,001	Test <i>U</i> de Mann-Whitney
Délai moyen entre la greffe et la détection de la dernière virémie positive (jours)	252,9 (99-524)	516,3 (182-1222)	p = 0,099 (NS)	Test <i>U</i> de Mann-Whitney
Délai moyen entre la détection de la 1 ^{ère} virémie et la détection de la 1 ^{ère} souche séquencée archétype ou réarrangée	38,4 (0-336)	135,1 (0-871)	p = 0,386 (NS)	Test <i>U</i> de Mann-Whitney

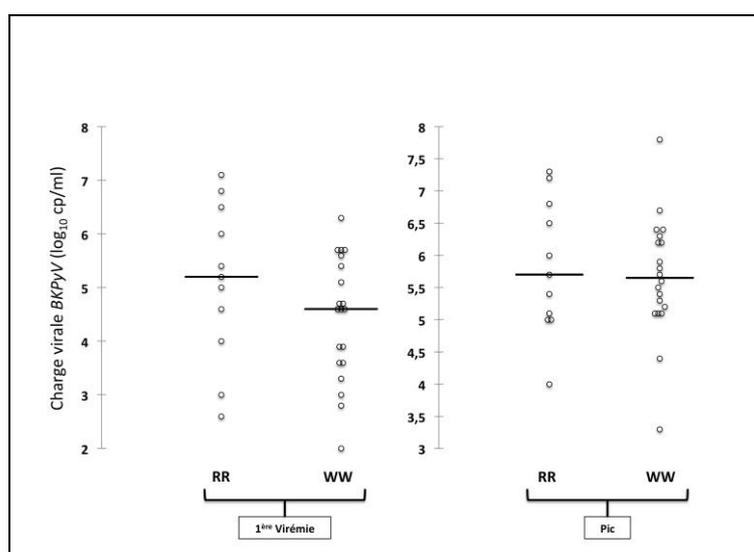


Figure 40 – Charges virales BKPyV en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées

Les charges virales ont été étudiées au moment de détection de la 1^{ère} virémie et au moment de la détection du pic de virémie pour les patients des groupes réarrangé (RR) et archétype (WW). La médiane est représentée par un trait noir.

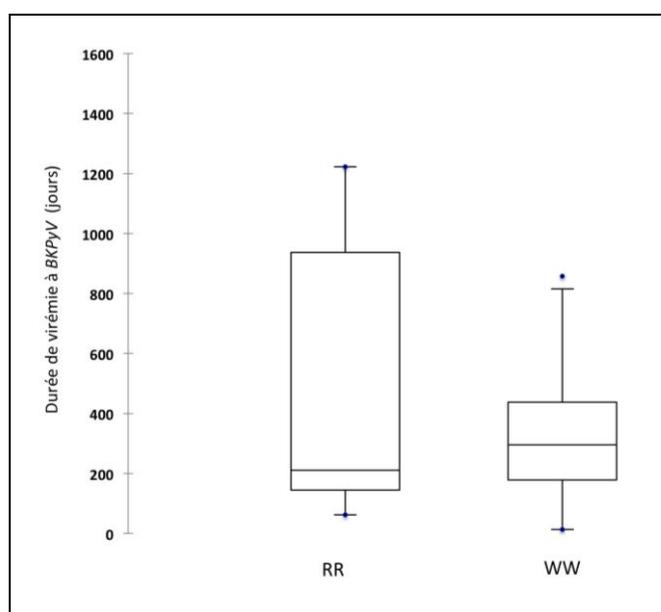


Figure 41 – Durée de virémie en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées

Variabilité génétique de la région NCCR et probabilité de survenue d’une NBKV

Le Tableau 22 présente les effectifs des différentes classes de probabilité de NBKV pour la population étudiée ainsi que le type de sous-population virale retrouvée (archétype, réarrangée ou inconnue). Une forme réarrangée était retrouvée chez 7 patients sur 16 présentant une NBKV prouvée (43,7%) et chez 4 patients sur 18 présentant une NBKV probable (22,2%). La présence d’une forme archétype ou réarrangée pour quatre patients du groupe NBKV probable était inconnue du fait de l’échec de l’amplification ou du séquençage de ces sous-populations. Il en était de même pour les six patients du groupe NBKV possible et pour 75% des patients ne présentant pas une NBKV (3 cas/4).

Tableau 22 – Type de sous-population virale (archétype ou réarrangée) par classe de probabilité de néphropathie à *BKPyV*

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

La présence d'une forme réarrangée lors du suivi n'était pas associée à une plus forte probabilité d'avoir une NBKV prouvée par rapport à une néphropathie probable ($p = 0,466$) (Tableau 23).

Tableau 23 – Étude de la relation entre la présence d'une néphropathie à *BKPyV* prouvée ou probable et la présence d'une forme réarrangée ou archétype

NBKV	Patient avec forme WW n = 19	Patient avec forme RR n = 11	Significativité	Test statistique utilisé
Prouvée (effectif)	9	7	$p = 0,466$ (NS)	Test de Fisher
Probable (effectif)	10	4		

Le Tableau 24 présente les effectifs pour les néphropathies à *BKPyV* confirmées histologiquement en fonction de leur stade histologique. Un lien statistique n'a pas pu être étudié vu les faibles effectifs dans chaque groupe et le stade inconnu pour 5 patients. Les 4 patients avec formes réarrangées présentaient cependant une atteinte histologique importante (3 patients avec atteinte stade B et 1 avec atteinte stade C).

Tableau 24 – Stade de l'atteinte histologique pour les néphropathies à *BKPyV* prouvées en fonction de la présence ou l'absence de sous-populations virales réarrangées

Stade NBKV	Patient avec forme WW n = 9	Patient avec forme RR n = 7
Stade A (effectif)	2	0
Stade B (effectif)	5	3
Stade C (effectif)	0	1
Inconnu (effectif)	2	3

Variabilité génétique de la région NCCR et évolution de l'état de fonction du greffon

Le Tableau 25 présente les effectifs pour chaque groupe (archétype ou réarrangé) suivant l'évolution de la fonction du greffon jusqu'à la fin du suivi. Quatre patients du groupe réarrangé ont perdu leur greffon à cause de l'infection à *BKPyV* contre 3 dans le groupe archétype.

Tableau 25 – Fonction du greffon à la fin du suivi en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées

Fonction du greffon à la fin du suivi	Patient avec forme WW n = 19	Patient avec forme RR n = 11
Greffon fonctionnel (effectif)	12	5
Greffon non fonctionnel (effectif)	6	5
- du à une NBKV	3	4
- du à une autre cause	3	1
Inconnu (effectif)	1	1

Variabilité génétique de la région NCCR et fonction rénale

L’évaluation de la fonction rénale par la créatininémie a été comparée entre les groupes à 1 mois post-greffe, au moment de la détection de la 1^{ère} virémie, au moment du pic de virémie ainsi qu’après clairance de la virémie (pour les patients dont la PCR *BKPyV* s’était négativée). On n’observe pas de différence significative entre le groupe réarrangé et le groupe archétype (Tableau 26, Figure 42).

Tableau 26 – Évaluation de la fonction rénale moyenne en fonction de la présence ou l’absence de sous-populations virales réarrangées

La fonction rénale a été évaluée par dosage de la créatininémie à 1 mois post-greffe, au moment de la 1^{ère} détection de la virémie, au moment du pic de virémie et après clairance dans le sang.

Créatininémie (µmol/L)	Patients avec forme WW n = 20	Patients avec forme RR n = 11	Significativité	Test statistique utilisé
Moyenne à 1 mois post-greffe	164	207	p = 0,364 (NS) IC95% [-55,198 ; 140,298]	Test t de Student
Moyenne au moment de la 1^{ère} virémie	170	194	p = 0,488 (NS) IC95% [-47,735 ; 95,426]	Test t de Student
Moyenne au moment du pic	194	208	p = 0,652 (NS) IC95% [-49,016 ; 76,634]	Test t de Student
Moyenne après clairance dans le sang	239	368	p = 0,213 (NS) IC95% [-97,700 ; 356,534]	Test t de Student

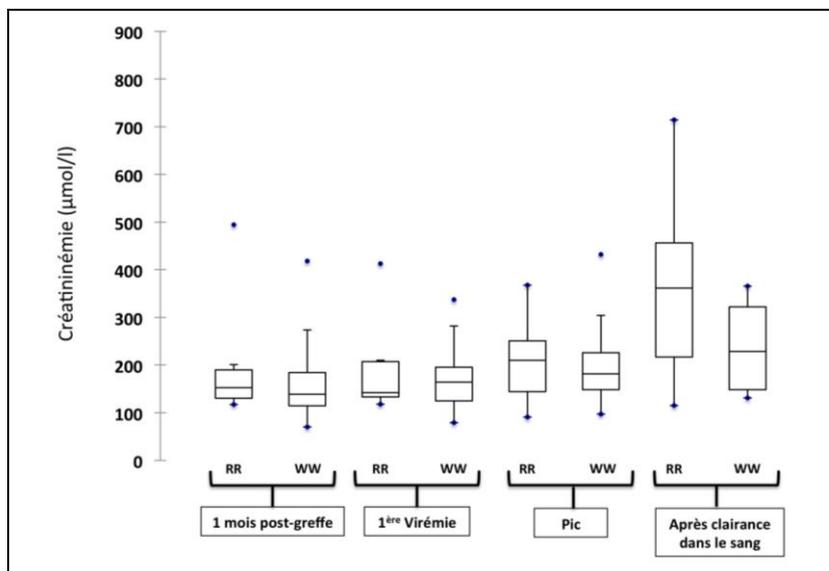


Figure 42 – Distribution de l'évaluation de la fonction rénale en fonction de la présence ou l'absence de sous-populations virales réarrangées

La fonction rénale a été évaluée par dosage de la créatininémie à 1 mois post-greffe, au moment de la 1^{ère} détection de la virémie, au moment du pic du virémie et après clairance dans le sang.

Variabilité de la région NCCR et immunosuppresseurs

Le dosage résiduel de tacrolimus dans le sang a été comparé entre les groupes au moment de l'apparition de la 1^{ère} virémie et au moment du pic de virémie. On n'observe pas de différence significative entre le groupe réarrangé et le groupe archétype (Tableau 27).

Tableau 27 – Dosage résiduel de tacrolimus dans le sang en fonction de la présence ou l'absence de sous-populations virales réarrangées

Le tableau présente la moyenne des dosages résiduels de tacrolimus réalisés au moment de la 1^{ère} détection de la virémie et au moment du pic du virémie.

Tacrolémie résiduelle (ng/ml)	Patients avec forme WW	Patients avec forme RR	Significativité (p)	Test statistique utilisé
Moyenne au moment de la 1 ^{ère} virémie	10,10	9,10	p = 0,468 (NS) IC95% [-3,793 ; 1,793]	Test t de Student
Moyenne au moment du pic	7,61	7,68	p = 0,961 (NS) IC95% [-2,741 ; 2,869]	Test t de Student

VI. DISCUSSION

Le *Polyomavirus BK* est un virus responsable de néphropathies interstitielles chez les transplantés rénaux. La survenue de cette complication peut aller jusqu'à la perte du greffon en l'absence d'une prise en charge adaptée. Bien que l'apparition d'une néphropathie à *BKPyV* semble principalement liée au degré d'immunosuppression des sujets, l'étude de Gosert *et al.* (2008) a montré que la variabilité génétique de la région régulatrice non codante NCCR du virus pouvait potentiellement être impliquée dans la pathogénicité du virus notamment vis-à-vis de l'atteinte tissulaire rénale. La région NCCR est une région qui peut être caractérisée par un haut degré de variabilité dans certaines situations, de multiples réarrangements étant notamment observés chez des patients avec des virémies élevées. Afin d'étudier la prévalence des sous-populations réarrangées et leurs liens éventuels avec les néphropathies à *BKPyV* observées en transplantation rénale, une technique d'amplification et de séquençage de cette région a été mise point puis mise en application sur les extraits sanguins issus d'une cohorte de patients transplantés rénaux entre 2008 et 2011 et recueillis rétrospectivement.

L'étape de mise au point de la technique d'amplification et de séquençage de la région NCCR du *BKPyV*, à partir d'extraits d'ADN issus de prélèvements de sang total, a été marquée par des problèmes de spécificité et de sensibilité pour les différents couples d'amorces utilisés. Les anciennes amorces utilisées au laboratoire (BK-NCCR-BRR1 et BRR2) ont déjà été utilisées dans d'autres études avec succès (Gosert *et al.*, 2008). Ces amorces avaient néanmoins une mauvaise spécificité (présence de multiples bandes même sur des prélèvements négatifs en PCR *BKPyV*) dans les essais effectués dans notre laboratoire. De nouvelles amorces ont donc été dessinées. Malheureusement, les deux premiers couples d'amorces utilisés pour la PCR externe (BK-NCCR-F/R et BK-NCCR-F/R2) posaient eux aussi des problèmes de spécificité. Des homologies de séquences d'ADN humain ont été retrouvées entre les deux régions sur lesquelles s'hybrident nos amorces (régions codant pour l'antigène grand T et l'agnoprotéine) et le génome humain. L'amorce sens utilisée ensuite pour la PCR externe (BK-NCCR-F2) évitait la région codant pour l'antigène grand T et ciblait directement le bloc O de la région NCCR dont la stabilité de séquence semble conservée même chez les sous-populations réarrangées. Il a donc été choisi de ne séquencer que la partie PQRS de la région NCCR. Aucun problème de spécificité n'a pas été observé pour ce dernier couple d'amorces (BK-NCCR-F2/R2).

Hormis leur problème de spécificité, les deux premiers couples d'amorces utilisées pour la PCR externe (BK-NCCR-F/R et BK-NCCR-F/R2) ont été incapables d'amplifier la région NCCR sur les prélèvements cliniques (urinaires et sanguins) même lorsque la charge virale était élevée alors qu'ils semblaient fonctionner correctement sur le témoin positif (souche de *BKPyV* issue du surnageant d'une culture sur cellules épithéliales rénales HRPTEC) avec une sensibilité satisfaisante (détection du témoin 10^{-5} correspondant à 3 copies/5 μ L d'extrait). La première hypothèse a été de douter de la bonne conservation des extraits au fil du temps, vu que certains d'entre eux dataient de plusieurs années. Une vérification de la charge virale en PCR *BKPyV* a été réalisée chez certains prélèvements pour s'assurer de leur bonne conservation. Les échantillons testés présentaient les mêmes charges virales qu'initialement. Ces résultats étaient donc en faveur d'une conservation correcte de nos échantillons. La différence d'amplification entre des prélèvements cliniques et des souches de *BKPyV* issus de culture *in vitro* orientait donc soit vers un problème d'accessibilité de l'ADN matrice, soit vers une trop grande variabilité du génome au niveau des sites d'hybridation des amorces chez des patients avec des charges virales urinaires et sanguines élevées. Ce problème d'accessibilité pourrait être lié à une conformation particulière du génome dans des prélèvements cliniques, en particulier en cas d'extraits issus de sang total. Le nouveau couple d'amorces BK-NCCR-F2/R2 a permis de remédier en partie à ce problème même si un nombre important d'extraits des patients de notre étude n'a pas pu être amplifié. Sur les 147 extraits d'ADN issus de prélèvements sur sang total, seulement 56 ont pu être séquencés. Ces échecs sont essentiellement dus à un problème de sensibilité de notre nouveau couple d'amorces. Aucun prélèvement avec une charge virale $<3,2 \log_{10}$ cp/ml n'a pu être séquencé et seulement 10 des 61 extraits (16,4%) avec une charge virale entre 3,2 et 4,4 \log_{10} cp/mL. Le seuil de sensibilité de notre technique semble donc se situer aux alentours de 4,4 \log_{10} cp/mL pour une bonne amplification malgré la persistance d'échecs d'amplification pour certains prélèvements avec des charges virales plus élevées (9 prélèvements $\geq 4,4 \log_{10}$ cp/mL avec absence complète d'amplification). Au total, près d'un tiers des patients (13/44) n'ont eu aucun prélèvement séquencé.

En ce qui concerne les amorces destinées à la PCR interne (BK-NCCR-NEST-R1 et NEST-R2 associées à BK-NCCR-F2), on observait le même résultat que pour les amorces externes initiales avec une absence d'amplification pour les extraits issus de prélèvements cliniques. Une nested-PCR ou une semi-nested afin d'augmenter la sensibilité du couple d'amorces BK-NCCR-F2/R2 n'a donc pas pu être utilisée dans notre étude.

Aucune étude sur la variabilité de la région NCCR dans des prélèvements cliniques n'a utilisé d'extraits issus de sang total. Les extraits étaient issus soit du plasma, soit d'urines, soit directement de biopsies rénales. Pour les études analysant la présence de sous-populations réarrangées dans des extraits d'ADN issus de plasma (Boldorini *et al.*, 2005; Gosert *et al.*, 2008; Memon *et al.*, 2012), une PCR externe suivie d'une PCR interne (Nested-PCR) a toujours été réalisée. Trois échecs d'amplification ont été observés dans l'étude de Boldorini *et al.* sur les 19 extraits analysés (15,8%). Aucun échec d'amplification n'est recensé pour les études de Gosert *et al.* (2008) et de Memon *et al.* (2012). Ces deux études comportent un nombre important de sujets, il est donc possible que seuls les extraits correctement séquencés aient été présentés. À noter qu'au cours de l'étude de Gosert *et al.* (2008), le clonage moléculaire était également réalisé comme dans notre étude.

Parmi les études recherchant la présence de sous-populations réarrangées dans des prélèvements urinaires, l'étude de Bressolette-Bodin *et al.* (2005) observait des échecs d'amplifications pour 15 patients sur les 56 étudiés (26,7%). Une nested-PCR était réalisée mais ne permettait pas d'amplifier les extraits avec une charge virale $< 4 \log_{10}$ cp/mL. Ce seuil est proche du notre même si cela concernait uniquement des prélèvements urinaires (dont les charges virales sont normalement plus élevées) contrairement à notre étude. Un prélèvement issu d'une biopsie rénale (sur 7 biopsies) n'a pas pu être amplifié par PCR classique dans l'étude de Olsen *et al.* (2006).

Au total, la région NCCR du *BKPyV* semble donc être une région difficile à amplifier et à séquencer. Le fait que l'extraction ait été réalisée à partir de prélèvements de sang total dans notre étude a certainement augmenté cette difficulté. Dans ce type de prélèvement, l'ADN humain y est plus présent que dans les extraits issus de plasma. Le risque d'amplification non spécifique y est donc plus grand. Devant les problèmes d'amplification rencontrés, le type de prélèvement doit certainement aussi jouer sur l'accessibilité de cette région avec un environnement peut être moins favorable que dans du plasma pour l'hybridation de nos amorces. Le recueil des extraits a été réalisé de manière rétrospective dans notre étude, ne permettant pas de modifier a posteriori la partie pré-analytique que ce soit le type de prélèvement effectué ni la méthode d'extraction.

L'étude rétrospective du suivi des infections à *BKPyV* dans une population de 594 transplantés rénaux suivis au CHU de Nantes a montré que le *BKPyV* était détecté dans les urines chez 32% de ces patients. Une virémie en faveur d'une réplication plus intense était retrouvée chez 15% des transplantés. Cette réplication entraînait une néphropathie à *BKPyV*

confirmée histologiquement par biopsie de greffon pour 16 d'entre eux (2,7%) avec perte de greffon pour 7 patients (1,2%). Malgré le caractère rétrospectif de cette étude et l'analyse d'une cohorte restreinte aux patients pour lesquels au moins un point de suivi avait été réalisé, ces chiffres sont ceux observés dans d'autres études. Une des plus récentes, de Knight *et al* (2013), retrouve 16% de patients virémiques lors du suivi prospectif de 22 mois d'une cohorte de 369 patients avec une perte de greffon pour 4 d'entre eux.

Pour les patients présentant une virémie prolongée à *BKPyV* (sous-groupe 4B), le délai moyen de détection de la première virémie positive était situé entre le 7^{ème} mois et le 8^{ème} mois. Le dépistage de la réplication du *BKPyV* n'étant pas homogène pour notre cohorte, le délai entre la greffe et le premier temps de suivi réalisé était donc très variable entre les patients (de 15 à 726 jours après la greffe). Ce délai moyen de détection de la première virémie est donc potentiellement surestimé par rapport au délai réel de survenue de la réplication à *BKPyV* chez ces patients. Une virémie prolongée à *BKPyV* a pu n'être en effet détectée que tardivement chez certains. De même, la durée moyenne de virémie était de 12 mois. Celle-ci est potentiellement sous-estimée en cas de première détection retardée ou en cas d'arrêt de suivi précoce malgré une virémie toujours positive.

Notre étude a permis de détecter de nombreuses sous-populations virales réarrangées chez les patients transplantés rénaux avec virémie élevée prolongée à *BKPyV*. Au total, 21 séquences NCCR réarrangées ont été détectées chez 11 patients sur les 31 pour lesquels une séquence NCCR était analysable. Ces sous-populations virales réarrangées n'ont pas été forcément observées dans toutes les études de suivi de transplantés rénaux (Bressollette-Bodin *et al.*, 2005; Memon *et al.*, 2012). L'étude de Gosert *et al.* (2008) portant sur des transplantés rénaux virémiques en retrouvait cependant dans le sang de 55 des 227 patients (24%). La durée de suivi semble avoir un rôle important dans la détection des formes réarrangées. Celle-ci était plus longue dans l'étude de Gosert *et al.* (deux ans contre seulement un an dans les deux autres études).

Pour 91 extraits sur 147 analysés, nous n'avons pas réussi à amplifier ou séquencer la région NCCR. L'étude de la cinétique d'apparition des formes réarrangées prévue initialement n'a donc pas pu être réalisée.

Les extraits sanguins de 6 patients ont pu être étudiés par clonage moléculaire. Cela a permis d'étudier les séquences des patients présentant plusieurs sous-populations au sein

d'un même prélèvement. Les prélèvements suspects de comporter plusieurs sous-populations virales n'ont cependant pas pu tous bénéficier de cette technique.

L'architecture des sous-populations obtenues en séquençage a ensuite été étudiée. En fonction de la présence de mutations ponctuelles au sein de certaines séquences, 8 séquences archétypes ont été individualisées. Deux de ces formes archétypes sont largement majoritaires, WW-01 et WW-02, retrouvées chez respectivement 6 et 16 patients de notre étude. La sous-population WW-01 correspond à la souche archétype de référence de notre étude. La souche WW-02 présentait 4 mutations ponctuelles en P18, P31, R4 et S18. Cette sous-population est retrouvée dans de nombreuses études et est considérée comme un polymorphisme naturel de la forme archétype. Les autres sous-populations qui ne présentaient que des mutations ponctuelles n'étaient retrouvées que chez un ou deux patients et ne semblent pas non plus avoir de conséquences particulières malgré l'atteinte potentielle de différents sites de fixation de facteurs de transcription pour certaines mutations, elles ont donc été considérées comme des formes archétypes.

En ce qui concerne l'analyse des 21 séquences réarrangées, tous les blocs P, Q, R et S de la région NCCR et tous les sites de fixation de facteurs de transcription pouvaient être atteints en partie ou en totalité par des réarrangements simples ou complexes. Des délétions étaient retrouvées sur 18 séquences et des duplications sur 15 séquences. Parmi les formes réarrangées, nous n'avons jamais mis en évidence de séquences strictement identiques entre deux patients.

Les réarrangements les plus fréquents étaient les délétions des régions Q et R (sites de fixation **Sp1** [Q33 – R2], **NF-1** [R32 – R45], **NF-1** [R51 – S1]) et les duplications des régions P et Q (sites de fixation **CREB** [P41 – P49] et **NF-1** [P68 – Q14]). Ces réarrangements étaient observés essentiellement chez des patients avec des atteintes histologiques prouvées (75% à 80% des patients atteints par ces souches ont une NBKV prouvée).

L'architecture des séquences réarrangées retrouvées est proche de celles observées dans les différentes études portant sur les patients avec virémie à *BKPyV* et/ou NBKV prouvée, mais elles ne sont jamais strictement identiques. Des délétions et des duplications pour tous les blocs P, Q, R et S ont été retrouvées dans d'autres études (Boldorini *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2007). Comme dans notre étude, les délétions les plus fréquentes concernaient les régions Q et R et les duplications les plus fréquentes concernaient les régions P et Q (Boldorini *et al.*, 2005; Gosert *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2006). La présence de délétions R et/ou de duplications PQ pourraient améliorer, d'après certaines études

menées in vitro (Ferguson & Subramani, 1994; Gosert *et al.*, 2008), l'efficacité de la transcription des gènes précoces et entraîner une réplication virale plus importante du fait de la suppression ou la multiplication de différents sites de fixation de facteurs de transcription (NF-1, Sp1 et CREB notamment).

Pour étudier le lien entre néphropathies à *BKPyV* chez les transplantés rénaux et présence de sous-populations réarrangées, les caractéristiques clinico-biologiques de deux groupes (archétypes et réarrangées) en fonction de la présence ou l'absence de formes réarrangées ont été comparés. Aucune différence significative au niveau de l'intensité et de la durée de la virémie n'a été observée entre les deux groupes. Ces résultats vont à l'encontre de ceux de l'étude de Gosert *et al.* (2008) qui observait des charges virales plus élevées pour les patients avec formes réarrangées (médiane 20 fois plus élevée pour les formes réarrangées que pour les formes archétypes). La principale limite de notre étude est le recueil rétrospectif des données avec un suivi non homogène et pas forcément précoce après la greffe, contrairement à l'étude de Gosert *et al.* (2008) dont une partie de l'étude a été réalisée sur une cohorte plus importante de patients en prospectif avec étude de la cinétique d'apparition des formes réarrangées. Une autre limite de l'étude est l'échec d'amplification de la région NCCR sur 62% des prélèvements sélectionnés (13 patients ; 29,5%), ce qui peut être à l'origine d'un biais de répartition des patients entre les groupes réarrangé et archétype. Contrairement à l'hypothèse initiale, les délais de détection de la première virémie et du pic de virémie étaient plus tardifs chez les patients avec formes réarrangées. Ce résultat est potentiellement lié au recueil rétrospectif des données avec un suivi qui n'était pas homogène entre les patients. En effet, au début de notre période d'étude, le suivi virologique n'était systématique qu'à partir du 6^{ème} mois post-transplantation, alors qu'il était plus précoce à la fin avec un changement de protocole de dépistage à partir de 2011. De plus, ce suivi est souvent moins strict dans une étude rétrospective par rapport à une étude prospective. Les patients avec formes réarrangées ont donc été vraisemblablement moins bien suivis dans les premiers mois post-transplantation, d'où une détection plus tardive. Le nombre de prélèvements réalisés dans les 6 mois post-greffe était en effet moins élevé dans le groupe réarrangé. Cette différence s'équilibrait les mois suivants après que la première détection du *BKPyV* a eu lieu pour la majorité des patients. Gosert *et al.* (2008) observaient aussi que les sous-populations virales réarrangées apparaissaient toujours après une forme archétype et que cette apparition était d'autant plus précoce que la charge virale était élevée et de durée prolongée. Dans notre étude, la cinétique d'apparition des formes réarrangées par

rapport à la forme archétype n'a pas pu être étudiée. Mais le fait que les patients avec formes réarrangées puissent avoir été moins bien suivis, pourrait expliquer l'émergence de ces sous-populations réarrangées en cas de virémie prolongée non détectée. Cette hypothèse suggère donc que la présence de formes réarrangées dans notre étude serait la conséquence d'une virémie élevée prolongée à *BKPyV* non prise en charge précocement. Elle souligne l'importance d'un dépistage précoce et systématique de la réplication à *BKPyV*.

Les sous-populations virales réarrangées étaient retrouvées majoritairement chez les patients avec NBKV prouvée et probable, mais les patients avec NBKV possible et absence de NBKV n'ont pas pu être réellement étudiés en raison d'échecs d'amplification ou de séquençage chez ces patients pour lesquels des virémies plus faibles sont retrouvées. La présence de formes réarrangées n'est pas nécessaire à la survenue d'une NBKV et n'est pas retrouvée que chez des patients avec NBKV. Ces résultats sont concordants avec les études de Boldorini *et al.* (2005), de Randhawa *et al.* (2003) et de Olsen *et al.* (2006).

Nous n'avons pas observé de lien statistique entre la présence de réarrangements et une atteinte histologique prouvée par biopsie de greffon dans notre étude. La présence de réarrangements n'était en effet pas plus importante chez les patients avec NBKV prouvée par rapport à ceux avec NBKV probable. Dans le sous-groupe de patients avec NBKV prouvée, on observait des NBKV de stade B ou C pour les formes réarrangées et des NBKV de stade A ou B pour les formes archétypes. Les effectifs semblent cependant trop faibles pour pouvoir établir une réelle conclusion. L'atteinte histologique plus avancée retrouvée dans l'étude de Gosert *et al.* (2008) n'est donc pas retrouvée dans notre étude.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude a permis d'étudier rétrospectivement la survenue d'une néphropathie à *Polyomavirus BK* sur un groupe de 594 adultes transplantés rénaux du CHU de Nantes entre 2008 et 2011. Une répllication à *BKPyV* était détectée chez 32% des transplantés (dont 15% avec une virémie). L'incidence des néphropathies à *BKPyV* prouvées par biopsie de greffon était de 2,7% et a eu pour conséquence la perte du greffon chez 1,2% des greffés (7 cas). Malgré les difficultés d'amplification et de séquençage auxquels nous avons été confrontés, l'étude de la variabilité génétique de la région régulatrice non codante NCCR du *BKPyV* n'a pas mis en évidence de lien entre l'émergence de sous-populations virales réarrangées au niveau cette région et la survenue d'une néphropathie à *BKPyV* sur 44 patients d'un sous-groupe avec virémie prolongée. La présence de réarrangements n'était pas non plus liée à une intensité et une durée de répllication plus élevée du *BKPyV*. La variabilité génétique de la région NCCR ne semble donc pas avoir de rôle causal ou favorisant dans la survenue des néphropathies à *BKPyV*. Des sous-populations virales réarrangées ont néanmoins été retrouvées chez 11 des 31 patients (35,5%) pour lesquels au moins une séquence de la région NCCR a pu être analysée. La détection de la première virémie à *BKPyV* et du pic de virémie était plus tardive pour le groupe réarrangé dans notre étude. Ce résultat est potentiellement lié à un biais dû au recueil rétrospectif des données et à l'absence de suivi homogène et systématique de la répllication à *BKPyV* contrairement à ce qui se fait actuellement au CHU de Nantes depuis 2011. Les patients du groupe réarrangé semblent en effet avoir été moins bien suivis lors des premiers mois en post-greffe ce qui pourrait expliquer cette émergence de formes réarrangées chez des patients pour lesquels une virémie prolongée n'a pas été découverte précocement. Un suivi systématique avec une détection précoce de la virémie entraînerait probablement une diminution de la fréquence de détection des formes réarrangées. Du fait de la faible fréquence des néphropathies à *BKPyV* et des formes réarrangées de la région NCCR, une étude prospective multicentrique portant sur une cohorte de patients transplantés rénaux avec des effectifs plus élevés et un monitoring systématique régulier de la répllication du *BKPyV* permettrait d'étudier plus précisément la chronologie de l'émergence des formes réarrangées et leur lien avec l'infection à *BKPyV* chez les transplantés rénaux. L'utilisation d'extraits issus de plasma lors du suivi au lieu du sang total permettrait certainement d'améliorer l'amplification de la région NCCR avec un environnement probablement plus favorable pour l'ADN matrice.

Du point de vue du séquençage de la région NCCR, le développement actuel de nouvelles techniques comme le séquençage haut-débit (*Next Generation Sequencing*) offre des perspectives intéressantes pour l'étude de la région NCCR du *BKPyV*. Elles permettraient notamment la détection de sous-populations virales minoritaires encore difficiles à mettre en évidence actuellement.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahn, H. J., Ju, M. K., Jeong, H. J., Kim, M. S., Kim, H. S., Huh, K. H., Lee, J. H., Kim, S. I. and Kim, Y. S. (2008). Immunologic control for polyomavirus infection after kidney transplantation. *Nephron. Clinical practice*, 108 (2), p.148–154.
- Ali, F. N., Meehan, S. M., Pahl, E. and Cohn, R. A. (2010). Native BK viral nephropathy in a pediatric heart transplant recipient. *Pediatric transplantation*, 14 (4), p.E38–41.
- 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 (8), p.4130–4136.
- Andrei, G., Snoeck, R., Vandeputte, M. and De Clercq, E. (1997). Activities of various compounds against murine and primate polyomaviruses. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41 (3), p.587–593.
- Andrews, C. A., Shah, K. V., Daniel, R. W., Hirsch, M. S. and Rubin, R. H. (1988). A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *The Journal of infectious diseases*, 158 (1), p.176–181.
- Benavides, C. A., Pollard, V. B., Mauiyyedi, S., Podder, H., Knight, R. and Kahan, B. D. (2007). BK virus-associated nephropathy in sirolimus-treated renal transplant patients: incidence, course, and clinical outcomes. *Transplantation*, 84 (1), p.83–88.
- Bennett, S. M., Broekema, N. M. and Imperiale, M. J. (2012). BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes and infection*, 14 (9), p.672–683.
- Bofill-Mas, S., Pina, S. and Girones, R. (2000). Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Applied and environmental microbiology*, 66 (1), p.238–245.
- Bohl, D. L. and Brennan, D. C. (2007). BK virus nephropathy and kidney transplantation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 2 Suppl 1, p.S36–46.
- Boldorini, R., Veggiani, C., Turello, E., Barco, D. and Monga, G. (2005). Are sequence variations in the BK virus control region essential for the development of polyomavirus nephropathy? *American journal of clinical pathology*, 124 (2), p.303–312.
- 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 (8), p.1926–1933.
- Chatterjee, M., Weyandt, T. B. and Frisque, R. J. (2000). Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *Journal of medical virology*, 60 (3), p.353–362.
- Chesters, P. M., Heritage, J. and McCance, D. J. (1983). Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *The Journal of infectious diseases*, 147 (4), p.676–684.

Coleman, D. V., Mackenzie, E. F., Gardner, S. D., Poulding, J. M., Amer, B. and Russell, W. J. (1978). Human polyomavirus (BK) infection and ureteric stenosis in renal allograft recipients. *Journal of Clinical Pathology*, 31 (4), p.338–347.

DeCaprio, J. A. and Garcea, R. L. (2013). A cornucopia of human polyomaviruses. *Nature reviews. Microbiology*, 11 (4), p.264–276.

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

Dörries, K., Vogel, E., Günther, S. and Czub, S. (1994). Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology*, 198 (1), p.59–70.

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 (12), p.2082–2092.

Dropulic, L. and Jones, R. (2008). Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone marrow transplantation*, 41 (1), p.11–18.

Eash, S., Querbes, W. and Atwood, W. J. (2004). Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *Journal of virology*, 78 (21), p.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. *The Journal of infectious diseases*, 199 (6), p.837–846.

Ellis, L. C., Norton, E., Dang, X. and Koralnik, I. J. (2013). Agnogene deletion in a novel pathogenic JC virus isolate impairs VP1 expression and virion production. *PloS one*, 8 (11), p.e80840.

Fanning, E. and Zhao, K. (2009). SV40 DNA replication: From the A gene to a nanomachine. *Virology*, 384 (2), p.352–359.

Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. and Moore, P. S. (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science (New York, N.Y.)*, 319 (5866), p.1096–1100.

Ferguson, A. T. and Subramani, S. (1994). Complex functional interactions at the early enhancer of the PQ strain of BK virus. *Journal of virology*, 68 (7), p.4274–4286.

Fischer, M. K., Kao, G. F., Nguyen, H. P., Drachenberg, C. B., Rady, P. L., Tyring, S. K. and Gaspari, A. A. (2012). Specific detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus DNA in skin and renal allograft tissues in a patient with trichodysplasia spinulosa. *Archives of dermatology*, 148 (6), p.726–733.

Gabardi, S., Waikar, S. S., Martin, S., Roberts, K., Chen, J., Borgi, L., Sheashaa, H., Dyer, C., Malek, S. K., Tullius, S. G., Vadivel, N., Grafals, M., Abdi, R., Najafian, N., Milford, E.

- and Chandraker, A. (2010). Evaluation of fluoroquinolones for the prevention of BK viremia after renal transplantation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 5 (7), p.1298–1304.
- Galan, A., Rauch, C. A. and Otis, C. N. (2005). Fatal BK polyoma viral pneumonia associated with immunosuppression. *Human pathology*, 36 (9), p.1031–1034.
- Gardner, S., Field, A., Coleman, D. and Hulme, B. (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*, 1 (7712), p.1253–1257.
- Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G. A., Sloots, T. P. and Wang, D. (2007). Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS pathogens*, 3 (5), p.e64.
- Gerits, N. and Moens, U. (2012). Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology*, 432 (2), p.316–326.
- Giraldi, C., Noto, A., Tenuta, R., Greco, F., Perugini, D., Dodaro, S., Spadafora, M., Lo Bianco, A. M., Savino, O., Papalia, T., Greco, R. and Bonofiglio, R. (2007). Prospective study of BKV nephropathy in 117 renal transplant recipients. *The new microbiologica*, 30 (2), p.127–130.
- Gorczyńska, E., Turkiewicz, D., Rybka, K., Toporski, J., Kalwak, K., Dyla, A., Szczyra, Z. and Chybicka, A. (2005). Incidence, clinical outcome, and management of virus-induced hemorrhagic cystitis in children and adolescents after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation*, 11 (10), p.797–804.
- 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 (4), p.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 (2), p.91–99.
- Gross, L. (1953). A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 83 (2), p.414–421.
- Harris, K. F., Chang, E., Christensen, J. B. and Imperiale, M. J. (1998). BK virus as a potential co-factor in human cancer. *Developments in biological standardization*, 94, p.81–91.
- Harris, K. F., Christensen, J. B. and Imperiale, M. J. (1996). BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *Journal of Virology*, 70 (4), p.2378–2386.
- Hedquist, B. G., Bratt, G., Hammarin, A. L., Grandien, M., Nennesmo, I., Sundelin, B. and Seregard, S. (1999). Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology*, 106 (1), p.129–132.

- 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 (2), p.143–150.
- 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. *The New England journal of medicine*, 347 (7), p.488–496.
- Hirsch, H. H. and Randhawa, P. (2013). BK polyomavirus in solid organ transplantation. *American journal of transplantation*, 13 Suppl 4, p.179–188.
- Hirsch, H. H. and Steiger, J. (2003). Polyomavirus BK. *The Lancet infectious diseases*, 3 (10), p.611–623.
- Hirsch, H. H., Vincenti, F., Friman, S., Tuncer, M., Citterio, F., Wiecek, A., Scheuermann, E. H., Klinger, M., Russ, G., Pescovitz, M. D. and Prestele, H. (2013). Polyomavirus BK Replication in De Novo Kidney Transplant Patients Receiving Tacrolimus or Cyclosporine: A Prospective, Randomized, Multicenter Study. *American Journal of Transplantation*, 13 (1), p.136–145.
- Jeffers, L. K., Madden, V. and Webster-Cyriaque, J. (2009). BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: implications for transmission. *Virology*, 394 (2), p.183–193.
- Jiang, M., Abend, J. R., Johnson, S. F. and Imperiale, M. J. (2009a). The Role of Polyomaviruses in Human Disease. *Virology*, 384 (2), p.266–273.
- Jiang, M., Abend, J. R., Tsai, B. and Imperiale, M. J. (2009b). Early events during BK virus entry and disassembly. *Journal of virology*, 83 (3), p.1350–1358.
- Jin, L., Gibson, P. E., Knowles, W. A. and Clewley, J. P. (1993). BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *Journal of medical virology*, 39 (1), p.50–56.
- Johannessen, M., Walquist, M., Gerits, N., Dragset, M., Spang, A. and Moens, U. (2011). BKV agnoprotein interacts with α -soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein, and negatively influences transport of VSVG-EGFP. *PLoS one*, 6 (9), p.e24489.
- Josephson, M. A., Gillen, D., Javaid, B., Kadambi, P., Meehan, S., Foster, P., Harland, R., Thistlethwaite, R. J., Garfinkel, M., Atwood, W., Jordan, J., Sadhu, M., Millis, M. J. and Williams, J. (2006). Treatment of renal allograft polyoma BK virus infection with leflunomide. *Transplantation*, 81 (5), p.704–710.
- Kean, J. M., Rao, S., Wang, M. and Garcea, R. L. (2009). Seroepidemiology of Human Polyomaviruses. *PLoS Pathog*, 5 (3), p.e1000363.
- Khalili, K., White, M. K., Sawa, H., Nagashima, K. and Safak, M. (2005). The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. *Journal of cellular physiology*, 204 (1), p.1–7.

Knight, R. J., Gaber, L. W., Patel, S. J., DeVos, J. M., Moore, L. W. and Gaber, A. O. (2013). Screening for BK viremia reduces but does not eliminate the risk of BK nephropathy: a single-center retrospective analysis. *Transplantation*, 95 (7), p.949–954.

Knowles, W. A. (2006). Discovery and Epidemiology of the Human Polyomaviruses BK Virus (BKV) and JC Virus (JCV). In: *Polyomaviruses and Human Diseases*, Advances in Experimental Medicine and Biology 577, New York: Springer, p.19–45.

Kuypers, D. R. J., Vandooren, A.-K., Lerut, E., Evenepoel, P., Claes, K., Snoeck, R., Naesens, L. and Vanrenterghem, Y. (2005). Adjuvant low-dose cidofovir therapy for BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *American journal of transplantation*, 5 (8), p.1997–2004.

Lesprit, P., Chaline-Lehmann, D., Authier, F. J., Ponnelle, T., Gray, F. and Levy, Y. (2001). BK virus encephalitis in a patient with AIDS and lymphoma. *AIDS*, 15 (9), p.1196–1199.

Liang, B., Tikhanovich, I., Nasheuer, H. P. and Folk, W. R. (2012). Stimulation of BK virus DNA replication by NFI family transcription factors. *Journal of virology*, 86 (6), p.3264–3275.

Lim, E. S., Reyes, A., Antonio, M., Saha, D., Ikumapayi, U. N., Adeyemi, M., Stine, O. C., Skelton, R., Brennan, D. C., Mkakosya, R. S., Manary, M. J., Gordon, J. I. and Wang, D. (2013). Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*, 436 (2), p.295–303.

Low, J. A., Magnuson, B., Tsai, B. and Imperiale, M. J. (2006). Identification of Gangliosides GD1b and GT1b as Receptors for BK Virus. *Journal of Virology*, 80 (3), p.1361–1366.

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*, 6 (7), p.e1001024.

Memon, I. A., Parikh, B. A., Gaudreault-Keener, M., Skelton, R., Storch, G. A. and Brennan, D. C. (2012). Progression from Sustained BK Viruria to Sustained BK Viremia with Immunosuppression Reduction Is Not Associated with Changes in the Noncoding Control Region of the BK Virus Genome. *Journal of transplantation*, 2012, p.761283.

Moens, U., Subramaniam, N., Johansen, B., Johansen, T. and Traavik, T. (1994). A steroid hormone response unit in the late leader of the noncoding control region of the human polyomavirus BK confers enhanced host cell permissivity. *Journal of virology*, 68 (4), p.2398–2408.

Moriyama, T., Marquez, J. P., Wakatsuki, T. and Sorokin, A. (2007). Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 81 (16), p.8552–8562.

Myhre, M. R., Olsen, G.-H., Gosert, R., Hirsch, H. H. and Rinaldo, C. H. (2010). Clinical polyomavirus BK variants with agnogene deletion are non-functional but rescued by trans-complementation. *Virology*, 398 (1), p.12–20.

- Nakanishi, A., Itoh, N., Li, P. P., Handa, H., Liddington, R. C. and Kasamatsu, H. (2007). Minor Capsid Proteins of Simian Virus 40 Are Dispensable for Nucleocapsid Assembly and Cell Entry but Are Required for Nuclear Entry of the Viral Genome. *Journal of Virology*, 81 (8), p.3778–3785.
- Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E. and Kasamatsu, H. (2002). Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *Journal of virology*, 76 (18), p.9368–9377.
- Nickeleit, V., Klimkait, T., Binet, I. F., Dalquen, P., Del Zenero, V., Thiel, G., Mihatsch, M. J. and Hirsch, H. H. (2000). Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *The New England journal of medicine*, 342 (18), p.1309–1315.
- Nickeleit, V. and Mihatsch, M. J. (2006). Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Transplant international*, 19 (12), p.960–973.
- O'Donnell, P. H., Swanson, K., Josephson, M. A., Artz, A. S., Parsad, S. D., Ramaprasad, C., Pursell, K., Rich, E., Stock, W. and van Besien, K. (2009). BK virus infection is associated with hematuria and renal impairment in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Biology of blood and marrow transplantation*, 15 (9), p.1038–1048.
- Okada, Y., Suzuki, T., Sunden, Y., Orba, Y., Kose, S., Imamoto, N., Takahashi, H., Tanaka, S., Hall, W. W., Nagashima, K. and Sawa, H. (2005). Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Reports*, 6 (5), p.452–457.
- Olsen, G.-H., Andresen, P. A., Hilmarsen, H. T., Bjørang, O., Scott, H., Midtvedt, K. and Rinaldo, C. H. (2006). Genetic variability in BK Virus regulatory regions in urine and kidney biopsies from renal-transplant patients. *Journal of medical virology*, 78 (3), p.384–393.
- Olsen, G.-H., Hirsch, H. H. and Rinaldo, C. H. (2009). Functional analysis of polyomavirus BK non-coding control region quasispecies from kidney transplant recipients. *Journal of medical virology*, 81 (11), p.1959–1967.
- Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J. and Dessel, B. H. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*, 1 (7712), p.1257–1260.
- Pante, N. and Kann, M. (2002). Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm. *Molecular Biology of the Cell*, 13 (2), p.425–434.
- Pietropaolo, V., Di Taranto, C., Degener, A. M., Jin, L., Sinibaldi, L., Baiocchini, A., Melis, M. and Orsi, N. (1998). Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *Journal of medical virology*, 56 (4), p.372–376.
- Prince, O., Savic, S., Dickenmann, M., Steiger, J., Bubendorf, L. and Mihatsch, M. J. (2009). Risk factors for polyoma virus nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation*, 24 (3), p.1024–1033.

- 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 (4), p.671–673.
- Randhawa, P. S., Schonder, K., Shapiro, R., Farasati, N. and Huang, Y. (2010). Polyomavirus BK neutralizing activity in human immunoglobulin preparations. *Transplantation*, 89 (12), p.1462–1465.
- Randhawa, P., Zygmunt, D., Shapiro, R., Vats, A., Weck, K., Swalsky, P. and Finkelstein, S. (2003). Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney international*, 64 (2), p.743–747.
- Van Regenmortel, M. and Fauquet, C. (2000). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses (Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses)*. Academic Press. [Online]. Available at: <http://www.virustaxonomyonline.com>.
- Sahney, S., Yorgin, P., Zuppan, C., Cutler, D., Kambham, N. and Chinnock, R. (2010). BK virus nephropathy in the native kidneys of a pediatric heart transplant recipient. *Pediatric transplantation*, 14 (3), p.E11–15.
- Sandler, E. S., Aquino, V. M., Goss-Shohet, E., Hinrichs, S. and Krisher, K. (1997). BK papova virus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, 20 (2), p.163–165.
- Schaub, S., Hirsch, H. H., Dickenmann, M., Steiger, J., Mihatsch, M. J., Hopfer, H. and Mayr, M. (2010). Reducing Immunosuppression Preserves Allograft Function in Presumptive and Definitive Polyomavirus-Associated Nephropathy. *American Journal of Transplantation*, 10 (12), p.2615–2623.
- 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 (2), p.120–125.
- Schold, J. D., Rehman, S., Kayle, L. K., Kayler, L. K., Magliocca, J., Srinivas, T. R. and Meier-Kriesche, H.-U. (2009). Treatment for BK virus: incidence, risk factors and outcomes for kidney transplant recipients in the United States. *Transplant international*, 22 (6), p.626–634.
- Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. A., Moyer, A. L. and Buck, C. B. (2010). Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell host & microbe*, 7 (6), p.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 (9), p.4586–4590.
- Sener, A., House, A. A., Jevnikar, A. M., Boudville, N., McAlister, V. C., Muirhead, N., Rehman, F. and Luke, P. P. W. (2006). Intravenous immunoglobulin as a treatment for BK virus associated nephropathy: one-year follow-up of renal allograft recipients. *Transplantation*, 81 (1), p.117–120.

- Shah, K. V., Daniel, R. W. and Warszawski, R. M. (1973). High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. *The Journal of infectious diseases*, 128 (6), p.784–787.
- Sharma, B. N., Li, R., Bernhoff, E., Gutteberg, T. J. and Rinaldo, C. H. (2011). Fluoroquinolones inhibit human polyomavirus BK (BKV) replication in primary human kidney cells. *Antiviral research*, 92 (1), p.115–123.
- Sharma, P. M., Gupta, G., Vats, A., Shapiro, R. and Randhawa, P. S. (2007). Polyomavirus BK non-coding control region rearrangements in health and disease. *Journal of medical virology*, 79 (8), p.1199–1207.
- Shinohara, T., Matsuda, M., Cheng, S. H., Marshall, J., Fujita, M. and Nagashima, K. (1993). BK virus infection of the human urinary tract. *Journal of medical virology*, 41 (4), p.301–305.
- 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 (19), p.10321–10326.
- Stewart, S. E., Eddy, B. E. and Borgese, N. (1958). Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *Journal of the National Cancer Institute*, 20 (6), p.1223–1243.
- Sundsford, A., Spein, A. R., Lucht, E., Flaegstad, T., Seternes, O. M. and Traavik, T. (1994). Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *Journal of clinical microbiology*, 32 (5), p.1390–1394.
- Suzuki, T., Semba, S., Sunden, Y., Orba, Y., Kobayashi, S., Nagashima, K., Kimura, T., Hasegawa, H. and Sawa, H. (2012). Role of JC virus agnoprotein in virion formation. *Microbiology and immunology*, 56 (9), p.639–646.
- Takemoto, K. K. and Mullarkey, M. F. (1973). Human Papovavirus, BK Strain: Biological Studies Including Antigenic Relationship to Simian Virus 40. *Journal of Virology*, 12 (3), p.625–631.
- Tedesco Silva, H., Jr, Cibrik, D., Johnston, T., Lackova, E., Mange, K., Panis, C., Walker, R., Wang, Z., Zibari, G. and Kim, Y. S. (2010). Everolimus plus reduced-exposure CsA versus mycophenolic acid plus standard-exposure CsA in renal-transplant recipients. *American journal of transplantation*, 10 (6), p.1401–1413.
- Tikhanovich, I. and Nasheuer, H. P. (2010). Host-Specific Replication of BK Virus DNA in Mouse Cell Extracts Is Independently Controlled by DNA Polymerase ? Primase and Inhibitory Activities. *Journal of Virology*, 84 (13), p.6636–6644.
- Vats, A., Shapiro, R., Singh Randhawa, P., Scantlebury, V., Tuzuner, A., Saxena, M., Moritz, M. L., Beattie, T. J., Gonwa, T., Green, M. D. and Ellis, D. (2003). Quantitative viral load monitoring and cidofovir therapy for the management of BK virus-associated nephropathy in children and adults. *Transplantation*, 75 (1), p.105–112.

Wadei, H. M., Rule, A. D., Lewin, M., Mahale, A. S., Khamash, H. A., Schwab, T. R., Gloor, J. M., Textor, S. C., Fidler, M. E., Lager, D. J., Larson, T. S., Stegall, M. D., Cosio, F. G. and Griffin, M. D. (2006). Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). *American journal of transplantation*, 6 (5 Pt 1), p.1025–1032.

White, M. K. and Khalili, K. (2006). Interaction of retinoblastoma protein family members with large T-antigen of primate polyomaviruses. *Oncogene*, 25 (38), p.5286–5293.

White, M. K., Safak, M. and Khalili, K. (2009). Regulation of gene expression in primate polyomaviruses. *Journal of virology*, 83 (21), p.10846–10856.

Williams, J. W., Javaid, B., Kadambi, P. V., Gillen, D., Harland, R., Thistlewaite, J. R., Garfinkel, M., Foster, P., Atwood, W., Millis, J. M., Meehan, S. M. and Josephson, M. A. (2005). Leflunomide for Polyomavirus Type BK Nephropathy. *New England Journal of Medicine*, 352 (11), p.1157–1158.

Wu, S.-W., Chang, H.-R. and Lian, J.-D. (2009). The effect of low-dose cidofovir on the long-term outcome of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *Nephrology, dialysis, transplantation*, 24 (3), p.1034–1038.

Zambrano, A., Kalantari, M., Simoneau, A., Jensen, J. L. and Villarreal, L. P. (2002). Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *The Prostate*, 53 (4), p.263–276.

Zheng, H.-Y., Nishimoto, Y., Chen, Q., Hasegawa, M., Zhong, S., Ikegaya, H., Ohno, N., Sugimoto, C., Takasaka, T., Kitamura, T. and Yogo, Y. (2007). Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes and infection*, 9 (2), p.204–213.

Zhong, S., Randhawa, P. S., Ikegaya, H., Chen, Q., Zheng, H.-Y., Suzuki, M., Takeuchi, T., Shibuya, A., Kitamura, T. and Yogo, Y. (2009). Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. *Journal of General Virology*, 90 (1), p.144–152.

NOM : **OLIVERO**

PRÉNOM : **BENJAMIN**

Titre de Thèse : Réarrangements de la région régulatrice non codante du génome viral au cours des infections à *Polyomavirus BK* en transplantation rénale adulte : étude rétrospective monocentrique

RÉSUMÉ

Le *Polyomavirus BK* est un virus ubiquitaire dont le rôle pathogène s'exprime essentiellement en cas d'immunosuppression. Il est responsable notamment de néphropathies interstitielles chez les transplantés rénaux. La variabilité génétique de la région régulatrice non codante NCCR du génome a été étudiée rétrospectivement sur un groupe de 44 patients présentant une virémie prolongée, sélectionnés à partir d'une cohorte monocentrique de patients transplantés rénaux entre 2008 et 2011. Des sous-populations réarrangées étaient retrouvées chez 11 patients. Une néphropathie à *BKPyV* était retrouvée après biopsie de greffon chez 16 patients. Aucun lien n'a pu être mis en évidence entre la présence de ces formes réarrangées et la présence d'une néphropathie à *BKPyV*, que ce soit au niveau des caractéristiques virologiques ou histologiques.

MOTS-CLÉS

***Polyomavirus BK*, Néphropathie, Région régulatrice non codante, Séquençage, Variabilité génétique, Réarrangements, Transplantation rénale, Sang.**