

ANNÉE 2017

N° 027

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional
Le 02/06/2017
Par Emilie PRZYROWSKI

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

VARIABILITE DU GENE CODANT POUR LA PROTEINE
VP1 DU POLYOMAVIRUS BK. IMPLICATION DANS
L'ECHAPPEMENT A LA REPONSE HUMORALE.

Président : Mme le Pr Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE, PU-PH, chef de service du laboratoire de virologie, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques - Nantes

Membres du jury :

Mme le Dr Céline BRESSOLLETTE-BODIN, Directrice de thèse, MCU-PH, Laboratoire de virologie, UFR de Médecine - Nantes

Mme le Dr Marianne COSTE-BUREL, PH, Laboratoire de virologie - Nantes

Mme le Pr Maryvonne HOURMANT, PU-PH, Chef du service de néphrologie et immunologie clinique - Nantes

Mr le Dr Dorian MCILROY, MC, UFR de Médecine et UFR des Sciences et Techniques - Nantes

Remerciements

Je tiens à remercier

Mme le Professeur Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE

Pour m’avoir fait l’honneur de présider ce jury,
Soyez assurée de mon profond respect.

Mme le Docteur Céline BRESSOLLETTE-BODIN

Pour m’avoir confié ce travail,
Pour votre accompagnement dans ce travail, vos conseils pertinents et vos compétences,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Mme le Docteur Marianne COSTE-BUREL

Pour m’avoir fait l’honneur de participer à ce jury,
Veuillez recevoir l’expression de ma respectueuse gratitude.

Mme le Professeur Maryvonne HOURMANT

Pour l’honneur que vous me faites de juger ce travail,
Veuillez trouver ici l’assurance de ma sincère reconnaissance.

Mr le Docteur Dorian MCILROY

Pour avoir accepté de faire partie de ce jury,
Soyez assuré de mes sincères remerciements.

A Audrey RODALLEC et Laura LE GUEN

Pour votre sympathie, votre aide et vos conseils dans la réalisation de cette thèse.

A l’équipe du laboratoire de virologie du CHU de Nantes

Pour votre accueil chaleureux, votre savoir-faire et votre gentillesse.

A mes parents

Pour votre précieux soutien,

Que ce travail soit l'expression de mon affection et de mon estime pour vous.

A Mathilde, Maryam, Anne Sophie, Coralie, Julie...

Pour votre amitié et votre soutien pendant ces années d'internat passées en votre compagnie.

A mes amis de la faculté de Poitiers : Sarah, Nicolas, Isabelle, Aurélia, Mérédith, Nathalie...

Pour ces belles et heureuses années de fac et tous les bons moments passés ensemble. Je n'oublierai jamais nos soirées cinéma du mardi soir ni les réveillons.

A l'ensemble de mes co-internes de Nantes et Angers

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

Table des matières

INTRODUCTION	10
GENERALITES	11
I. Famille des Polyomaviridae.....	11
II. Le polyomavirus BK	14
II.1. Caractéristiques générales du virus	14
II.2. Génome.....	15
II.3. Epidémiologie.....	17
II.4. Cycle de réplication	18
II.5. Pouvoir pathogène	22
II.6. Néphropathie tubulo interstitielle associée au BKPyV	25
III. La protéine de capsid VP1 du polyomavirus.....	35
III.1. Structure de la protéine	35
III.2. Epidémiologie moléculaire	37
III.3. Evolution génétique de VP1	38
IV. La réponse humorale dirigée contre le BKPyV	42
IV.1. Etude de la réponse humorale chez les polyomavirus : le modèle du MPyV	42
IV.2. La réponse humorale lors des infections à BKPyV	43
DONNEES PRELIMINAIRES – OBJECTIFS DE L’ETUDE :..	48
I. Description de la cohorte prospective.....	48
II. Réponse humorale anti-BKPyV dans la cohorte	49
III. Objectifs	50
MATERIEL ET METHODES.....	51
I. Echantillons biologiques.....	51
II. Extraction de l’ADN viral	51
III. Amplification par PCR de la région VP1	52
IV. Séquençage du produit d’amplification VP1	55
IV.1. Purification des produits de PCR.....	55
IV.2. Réaction de séquence	55
IV.3. Filtration / purification des produits de séquence	56
IV.4. Electrophorèse capillaire.....	57
IV.5. Analyse des séquences	58

RESULTATS.....	60
I. Suivi longitudinal de l'apparition des mutations dans VP1 chez les patients.....	60
I.1. Description globale des résultats	60
I.2. Suivi longitudinal des patients	64
II. Comparaison des mutations présentes dans les urines avec celles du sang.....	74
DISCUSSION	77
BIBLIOGRAPHIE	85

Liste des abréviations

aa	Acide aminé	MEK1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
Ac	Anticorps	MWPyV	Malawi polyomavirus
ADN	Acide désoxyribonucléique	MPyV	Polyomavirus murin
Ag	Antigène	mTOR	Mammalian Target of rapamycin
ARN	Acide ribonucléique	NCCR	Non Coding Control Region
ARNm	ARN messenger	NJPyV	New Jersey polyomavirus
BET	Bromure d'éthidium	NK-κB	Nuclear factor-kappa B
BKPyV	BK polyomavirus	NR	Non réalisé
CMX 01	Hexadecyloxypropyl-cidofovir	ORI	Origine de réplication
cp	Copies	pb	Paires de base
CRE	cAMP Reponsive element	PCR	Polymerase chain reaction
CSH	Cellule souche hématopoïétique	PP2A	Protein phosphatase-2A
ddNTP	Didésoxyribonucléotide triphosphate	pRP	Protéine du rétinoblastome
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate	PyVAN	Polyomavirus associated nephropathy
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Rc	Récepteur
ERE	Estrogen response element	RE	Réticulum endoplasmique
ERK1	Extracellular signal-Regulated Kinase 1	RPA	Protéine de réplication A
HEK293	Human Embryonic Kidney Cells	RPTE	Renal proximal tubule epithelial
HIA	Hemagglutination Inhibition Assay	RR	Forme réarrangée
HPyV1	Human polyomavirus 1	SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
HPyV6	Human polyomavirus 6	STLPyV	St Louis olyomavirus 19
HPyV7	Human polyomavirus 7	SV40	Virus simien 40
HPyV9	Human polyomavirus 9	TBE	Tris, Borate, EDTA
HPyV12	Human polyomavirus 12	TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
Ig	Immunoglobuline	Tm	Température d'hybridation
JCPyV	JC polyomavirus	TSPyV	Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus
KIPyV	KI polyomavirus	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
LEMP	Leucoencéphalopathie multifocale progressive	VLP	Virus like particule
MCPyV	Merkel cell polyomavirus	WUPyV	WU polyomavirus
		WW	Forme archétype

Liste des figures

Figure 1 - Chronologie de la découverte des différents polyomavirus.	12
Figure 2 - BKPyV purifié en microscopie électronique.....	14
Figure 3 - Représentation de la structure du BKPyV.....	15
Figure 4 - Structure du génome du BKPyV.	17
Figure 5 - Séroprévalence du BK virus en fonction de l'âge.	18
Figure 6 - Structures des gangliosides.....	19
Figure 7 - Le cycle cellulaire du BKPyV.....	22
Figure 8 - Le pouvoir pathogène du BKPyV.....	25
Figure 9 – Fréquence des infections à BKPyV chez les greffés rénaux.	26
Figure 10 - Facteurs de risque de PyVAN chez les patients greffés de rein.	27
Figure 11 - Présence de Decoy cell, dans l'urine.	28
Figure 12 - Agrégat de virus (polyomavirus-Haufen) dans l'urine d'un patient atteint de PyVAN.....	29
Figure 13 - Biopsie rénale d'un patient stade B de PyVAN.....	30
Figure 14 - Dépistage, suivi et prise en charge des infections à BKPyV chez les patients transplantés de rein.....	32
Figure 15 - Vue d'une protéine VP1 correspondant à une sous unité du pentamère.	36
Figure 16 - Vue d'un pentamère de VP1 du virus SV40.	37
Figure 17 - Arbre phylogénétique des différents génotypes de BKPyV.....	38
Figure 18 - Modélisation du site de reconnaissance du Récepteur cellulaire (motif sialique) formé par VP1et interaction avec ce récepteur.	40
Figure 19 - Répartition de la cohorte de patients greffés rénaux inclus dans la cohorte au CHU de Nantes entre octobre 2010 et juillet 2013.....	48
Figure 20 - Répartition des génotypes du BKPyV chez les patients de la cohorte.....	49
Figure 21- Dosage des taux d'Ac anti BKPyV par technique ELISA avec BKPyV VLP.....	50
Figure 22 - L'automate PTC 100.....	54
Figure 23 - Exemple de gel de polyacrylamide.....	54
Figure 24 - Schématisation du séquençage : principe de la méthode de Sanger.....	56
Figure 25 - Purification des fragments d'ADN à séquencer.	56
Figure 26 - Séquençage par électrophorèse capillaire.....	57
Figure 27 - Le séquenceur ABI prism 3130® utilisé pour l'étape de séquençage capillaire...	58
Figure 28 - Vue du logiciel Mega7®.....	59

Figure 29 - Représentation schématique des patients étudiés selon leur charge virale urinaire et/ou sanguine et la présence ou non de mutations.	60
Figure 30 - Suivi immunovirologique du patient BLMA	64
Figure 31- Suivi immunovirologique du patient BAFA.	65
Figure 32 - Suivi immunovirologique du patient BAGA.....	66
Figure 33 - Suivi immunovirologique du patient BIMA.....	67
Figure 34 - Suivi immunovirologique du patient BROYV.....	68
Figure 35 - Suivi immunovirologique du patient DAJE.	69
Figure 36 - Suivi immunovirologique du patient EGFL.	70
Figure 37 - Suivi immunovirologique du patient GRPI.....	71
Figure 38 - Suivi immunovirologique du patient PEAN.....	72
Figure 39 - Suivi immunovirologique du patient SEMI en post greffe.	73
Figure 40- Modélisation de la protéine VP1 du BKPyV du patient BAGA.	80
Figure 41 - Modélisation de la protéine VP1 du BKPyV du patient GRPI.	80
Figure 42 - Modélisation de la protéine VP1 du BKPyV du patient SEMI.	81

Liste des tableaux

Tableau 1 - Les polyomavirus humains suivant la classification ICTV 2016	13
Tableau 2 - Description des différents stades de PyVAN.....	30
Tableau 3 - Critères diagnostiques d'une PyVAN.	31
Tableau 4 - Présentation des amorces utilisées pour l'amplification par PCR	52
Tableau 5 - Séquence du génome du BKPyV (NCBI Reference Sequence NC_001538.1)....	53
Tableau 6 - Mélanges réactionnels pour l'amplification de la région TR de VP1	53
Tableau 7 - Référence des séquences des différents sous-types BKPyV (GenBank) utilisées pour l'alignement	58
Tableau 8 - Positions mutées et chronologie d'apparition des mutations d'acides aminés de la protéine VP1 (entre les positions 60 et 84)	62
Tableau 9 - Modification des charges des acides aminés substitués.....	63
Tableau 10 - Chronologie d'apparition des mutations chez BAGA (BKPyV de génotype Ib-2) et comparaison des mutations présentes dans l'urine et le sang.	75
Tableau 11 - Chronologie d'apparition des mutations chez GRPI (BKPyV de génotype Ib-2) et comparaison des mutations présentes dans l'urine et le sang.	75
Tableau 12 - Chronologie d'apparition des mutations chez SEMI (BKPyV de génotype IV) et comparaison des mutations présentes dans l'urine et le sang.	76

INTRODUCTION

Le polyomavirus BK (BKPyV) fait partie de la famille des *Polyomaviridae* au même titre que le polyomavirus JC (JCPyV). Il a été découvert par Gardner *et coll.* en 1971. C'est un virus ubiquitaire, très répandu dans la population avec une forte séroprévalence. (Gardner *et al.*, 1971)

L'implication de ce virus en pathologie humaine est liée à des états d'immunodépression (SIDA, transplantation d'organe, greffe de cellules souches hématopoïétiques(CSH)...). Ainsi, malgré la séroprévalence élevée, il s'exprime peu chez les immunocompétents. La primo infection a lieu dans l'enfance et est le plus souvent asymptomatique. Le cycle de réplication du virus a entièrement lieu dans le noyau de la cellule hôte. De par la petite taille de leur génome, ils dépendent entièrement de la machinerie cellulaire pour leur multiplication. Puis le virus persiste dans l'organisme à l'état latent dans les cellules de l'épithélium urinaire et dans les leucocytes circulants. Suite à une transplantation rénale, la réactivation du BKPyV est très fréquente, une virurie est alors observée. Ceci peut se compliquer d'une néphropathie tubulo-interstitielle liée au BKPyV (PyVAN, Polyomavirus Associated Nephropathy). Le traitement repose essentiellement sur la réduction des doses d'immunosuppresseurs permettant de restaurer une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Une des cibles principales de la réponse humorale est la protéine principale de capsid VP1, contre laquelle est dirigée la réponse neutralisante. Une région de la protéine VP1 est particulièrement importante pour la reconnaissance par les anticorps : la région TR de VP1 située sur la boucle BC.

Chez la plupart des patients, la diminution du traitement immunosuppresseur permet de contrôler l'infection par le BKPyV. Cependant, certains patients, présentent une réplication virale persistante, et ce malgré l'augmentation du titre des anticorps totaux et neutralisants qui témoigne de la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique. Une des hypothèses qui peut être évoquée est l'une évolution du virus par l'acquisition de mutations au niveau du site reconnu par les anticorps (Ac). De cette façon, le virus pourrait échapper à la réponse immunitaire humorale de l'hôte et continuerait à se multiplier. L'objectif de ce travail a ainsi été de rechercher l'apparition de mutations dans la région TR de VP1 et d'étudier une éventuelle corrélation avec l'échappement à la réponse humorale.

GENERALITES

I. Famille des *Polyomaviridae*

Les polyomavirus, du grec *poly-* (plusieurs) et *-oma* (tumeurs) ont été découverts dans les années 1950. Ils étaient classés dans un 1er temps parmi les *Papovaviridae* auxquels appartiennent aussi les papillomavirus. C'est en 1999 (ICTV 7th report) qu'ils sont classés dans une famille à part, les *Polyomaviridae* (Van Regenmortel et Fauquet, 2000). Ces virus ont été découverts de façon accidentelle lors la caractérisation d'un agent causant des tumeurs multiples chez les rongeurs. En 1953, l'équipe de Gross observe l'apparition de tumeurs de la glande parotide chez une souris nouveau-née après inoculation d'un extrait de leucémie de souris filtré (Gross *et al.*, 1953). Par la suite, cet agent est identifié comme étant un virus (Stewart *et al.*, 1958). Ce virus fut nommé murine polyomavirus (MPyV) de par sa présence chez de nombreuses souris et sa capacité à développer des tumeurs chez les souris immunodéprimées ou les nouveau-nés. Le premier polyomavirus isolé chez le singe fut découvert en 1960 dans des cellules de rein de singe vert d'Afrique, cellules utilisées pour la production des vaccins anti-poliavirus. Ce virus fut dénommé simian virus 40 (SV40) par Sweet et Hilleman. Le SV40 comme le MPyV est capable d'induire des tumeurs chez les rongeurs. Le SV40 a été retrouvé comme contaminant de vaccins inoculés à l'homme. Malgré son pouvoir oncogène théorique, aucune pathologie tumorale associée au SV40 n'a jamais été identifiée chez l'homme (Sweet et Hilleman, 1960).

Les premiers polyomavirus isolés chez l'homme furent le JC polyomavirus et le BK polyomavirus. Ils furent découverts tous les deux en 1971.

En 1971, Gardner rapportait la découverte d'un nouveau papovavirus (Gardner *et al.*, 1971). Ce virus a été isolé chez un patient de 39 ans venant du Soudan. Il présentait trois mois après la greffe rénale, une douleur au niveau du greffon et une anurie, associées à une augmentation de la créatinine. L'examen montrait une fibrose et une ischémie de l'uretère. Des particules virales ressemblant à des membres du sous-groupe polyoma des papovavirus furent découvertes. L'inoculation de l'urine du patient sur cellules MK (cellules de rein de singe rhésus) montrait un effet cytopathique en 18 jours tandis que sur cellules Vero (cellules épithéliales de rein de singe), un effet n'était observé qu'au bout de plusieurs semaines. Le virus ainsi isolé fut nommé BK virus d'après les initiales du patient duquel il fut isolé. De même pour le JC virus dénommé d'après les initiales du patient chez qui il fut découvert est isolé en 1971 par Padgett *et coll.* à partir de biopsie cérébrale d'un patient. Ce patient présentait une maladie de Hodgkin compliquée d'une leucoencéphalopathie multifocale

progressive (LEMP). Ainsi ce virus est associé à la LEMP chez des patients immunodéprimés majoritairement chez des patients atteints du VIH (Padgett *et al.*, 1971).

Depuis, de nombreux autres polyomavirus ont été découverts chez les animaux et aussi chez l'homme (Dalianis *et al.*, 2013) (Figure 1 et Tableau 1).

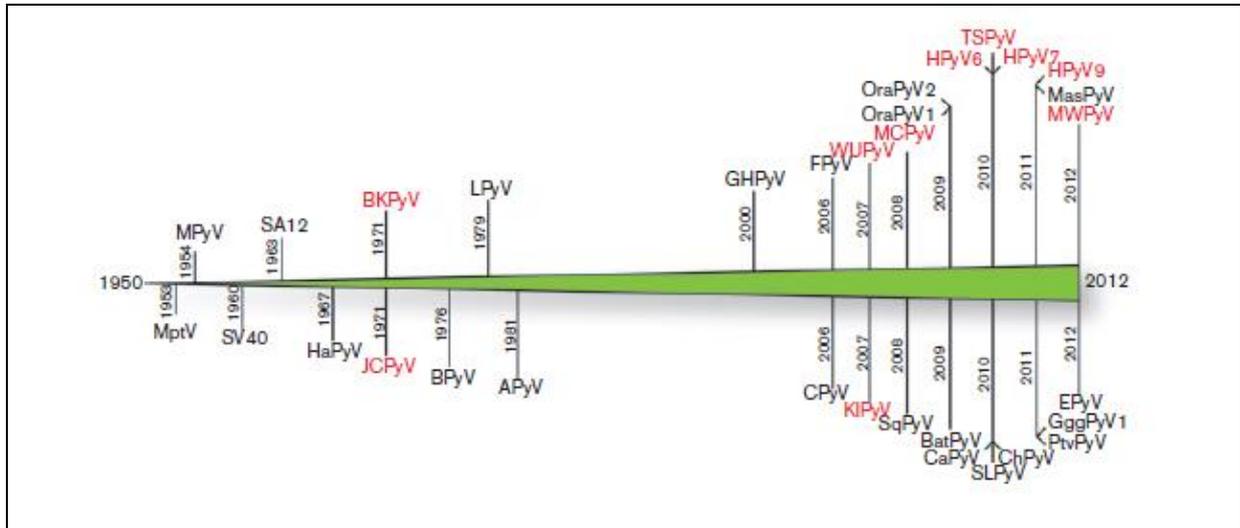


Figure 1 - Chronologie de la découverte des différents polyomavirus.

Les polyomavirus sont classés par ordre de découverte chronologique depuis 1950 jusqu'à 2012. Depuis, de nouveaux virus ont été découverts. Les virus infectant l'homme sont notés en rouge. (Feltkamp *et al.*, 2013)

Tableau 1 - Les polyomavirus humains suivant la classification ICTV 2016

Virus	Abbréviation	Source	Pathologies associées	1ère publication
Famille des <i>Polyomaviridae</i>				
Genre alphapolyomavirus				
Merkel cell polyomavirus	MCPyV =HPyV5	Peau	Carcinome à cellules de Merkel	Feng <i>et al.</i> , (2008)
Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus	TSPyV =HPyV8	Peau	Trichodysplasia spinulosa	van der Meijden <i>et al.</i> , (2010)
Human polyomavirus 9	HPyV9	Peau, sang, urine		Scuda <i>et al.</i> , (2011)
Human polyomavirus 12	HPyV12	Tractus digestif		Korup <i>et al.</i> , (2013)
New Jersey polyomavirus	NJPyV =HPyV13	Cellules endothéliales (muscle)	Myositis	Mishra <i>et al.</i> , (2014)
Genre betapolyomavirus				
BK polyomavirus	BKPyV =HPyV1	Urine, tissu rénal	Néphropathie associée au BKPyV, cystite hémorragique.	Gardner <i>et al.</i> , (1971)
JC polyomavirus	JCPyV =HPyV2	LCR, tissu cérébral	LEMP	Padgett <i>et al.</i> , (1971)
KI polyomavirus	KIPyV =HPyV3	Tissu nasopharyngé		Allander <i>et al.</i> , (2007)
WU polyomavirus	WUPyV =HPyV4	Tissu nasopharyngé		Gaynor <i>et al.</i> , (2007)
Genre deltapolyomavirus				
Human polyomavirus 6	HPyV6	Peau		Schwalter <i>et al.</i> , (2010)
Human polyomavirus 7	HPyV7	Peau		Schwalter <i>et al.</i> , (2010)
Malawi polyomavirus	MWPyV =HPyV10	Verrue, selles		Siebrasse <i>et al.</i> , (2012)
St Louis polyomavirus 19	STLPyV =HPyV11	Selles		Lim <i>et al.</i> , (2012)

(d'après DeCaprio et al., 2013)

II. Le polyomavirus BK

II.1. Caractéristiques générales du virus

Le Polyomavirus Humain de type 1 (HPyV1) mieux connu sous le nom de BK polyomavirus (BKPyV) est comme tous les membres de cette famille un petit virus d'environ 45 nm de diamètre, non enveloppé dont le génome est une molécule d'ADN double brin circulaire (Figure 2).

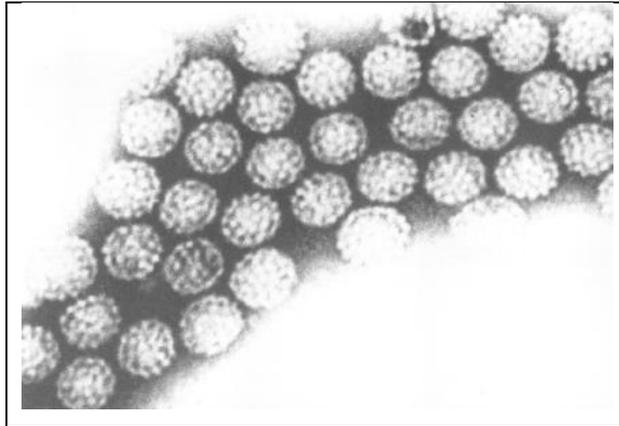


Figure 2 - BKPyV purifié en microscopie électronique

Les particules avec une morphologie typique virus mesurant 45 nm observation des capsomères. x 250,000. (Takemoto et al., 1973)

Le génome comporte environ 5200 paires de bases (pb). Dans la particule virale, l'ADN circulaire est complexé avec des histones cellulaires H2A, H2B, H3 et H4 créant une structure de mini chromosome.

Sa capside est icosaédrique et consiste en l'association des protéines VP1 dites protéines majeures avec les protéines VP2 et VP3 dites protéines mineures. Cette capside est formée de 360 molécules de VP1 arrangées en 72 pentamères ce qui lui donne sa forme icosaédrique. La partie C terminale d'une molécule de VP1 s'associe à la molécule VP1 d'à côté pour fermer le pentamère. Chaque pentamère de VP1 s'associe avec une protéine VP2 ou VP3 qui est placée en son centre. Ainsi, seule la protéine VP1 est en contact avec l'extérieur comme illustré sur la Figure 3.

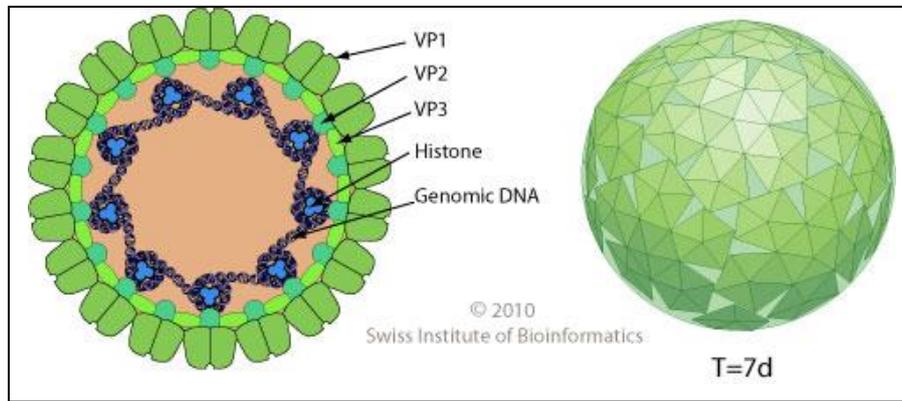


Figure 3 - Représentation de la structure du BKPyV.
 Propriété de Swiss Institute of Bioinformatics 2010

II.2. Génome

Le génome est organisé en trois régions, deux codantes et une non codante : une région codante précoce (Early region), une autre tardive (Late region), toutes deux séparées par une région régulatrice hypervariable non codante (NCCR= Non-coding control region) (Figure 4).

a. Région codante précoce

Les gènes de la région précoce d'environ 2.4 kb codent pour deux protéines régulatrices dites antigènes (Ag) de tumeur. Elles sont produites par épissage alternatif à partir d'un ARN pré messager précurseur commun. Les protéines produites sont distinguées par leur taille Ag grand T (t pour tumeur), Ag petit t.

- L'Ag T est considéré comme le principal régulateur du processus infectieux. C'est une protéine constituée de 695 acides aminés et présentant une homologie de 70% avec l'Ag T du SV40. Il possède de multiples fonctions et activités enzymatiques. Il peut se lier à l'ADN mais également à de nombreuses protéines cellulaires. Il permet ainsi la production de l'ARN messager précoce, initie la réplication de l'ADN et active la transcription des gènes tardifs. L'Ag T possède donc un rôle central dans la réplication du virus. L'Ag T initie la réplication de l'ADN en recrutant l'ADN polymérase au niveau de l'origine de réplication (ORI) au sein de la région NCCR. L'Ag T active le promoteur de la région codant les gènes tardifs et, associé à la présence de facteurs de transcription, entraîne l'expression des gènes tardifs. Il peut se lier aux protéines de la famille des suppresseurs de tumeur pRB (protéine du rétinoblastome) et p53. La liaison de l'Ag T sur la forme hyperphosphorylée de la pRB permet une libération du facteur de transcription E2F qui stimule les cellules quiescentes et les fait entrer en phase S du cycle cellulaire permettant ainsi la réplication du génome. L'association de l'Ag T avec p53 préviendrait l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Harris *et al.*, 1996, Eash *et al.*, 2006, Felsani *et al.*, 2006).

- L'Ag t est une protéine de 172 acides aminés dont le rôle est moins bien connu. Il semble avoir des fonctions multiples au cours du cycle de réplication et des interactions avec la cellule cible. Il s'associe notamment avec deux sous unités de la protéine phosphatase 2A (PP2A), inactive les protéines kinases ERK1 et MEK1 et favorise la progression dans le cycle cellulaire (Bennett *et al.*, 2012).

b. Région codante tardive

Les protéines codées par la région tardive d'environ 2.3 kb sont majoritairement des protéines de structure : la protéine majeure VP1 et les protéines mineures VP2 et VP3 ainsi que l'agnoprotéine. La capsid de BKPyV est composée de 360 VP1 organisées en 72 pentamères. Chaque protéine VP1 est associée avec une protéine VP2 ou VP3 pour former un capsomère. Les capsomères sont reliés entre eux grâce aux liaisons entre les domaines C terminaux des protéines VP1. Ce qui permet de former la capsid (Eash *et al.*, 2006).

Un paragraphe spécifique sera consacré à la protéine majeure VP1.

Les protéines mineures de capsid VP2 et VP3 s'associent avec un pentamère de VP1, ne sont pas en contact avec l'extérieur du virus. Il semble que chaque protéine joue un rôle unique et vital dans l'entrée cellulaire et l'assemblage de la capsid comme cela a été décrit chez le SV40. De plus, ces protéines semblent importantes pour l'entrée du virus dans le noyau (Gharakhanian *et al.*, 2003, Nakanishi *et al.*, 2007).

L'agnoprotéine est une protéine non structurale de 66 acides aminés. Elle n'est pas présente chez tous les polyomavirus. Son rôle a été principalement étudié chez le JCPyV. Elle semble impliquée dans de nombreuses fonctions permettant la libération des virions fonctionnels. Elle agirait au niveau de la modulation de la transcription des gènes viraux et la réplication virale par interaction avec l'Ag 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. Région NCCR

La forme archétype de la région régulatrice non codante NCCR fait environ 500 pb et est localisée entre les deux régions codantes.

Cette région est classiquement divisée en cinq séquences O, P, Q, R et S. L'origine de la réplication est contenue dans la région O. Cette région contient également le site d'initiation de la transcription des gènes précoces, des séquences symétriques qui constituent des sites de fixation pour l'Ag T et un site de fixation pour NK-κB. Les séquences P, Q et R correspondent à une région activatrice. Elles comportent des sites de fixation pour les facteurs

de transcription cellulaire. Il y a une région cis régulatrice CRE pour cAMP responsive element, une région riche en GC (GC box), plusieurs sites de fixation pour le facteur transrégulateur Sp1 et pour les facteurs NF1 et Ets 1. La séquence S possède le site d'initiation de la transcription des gènes tardifs et une séquence ERE de réponse aux œstrogènes (estrogen response element). Cette région NCCR peut subir des modifications à type de délétions-insertions distinguant ainsi les souches archétypes NCCR WW des souches réarrangées NCCR RR.

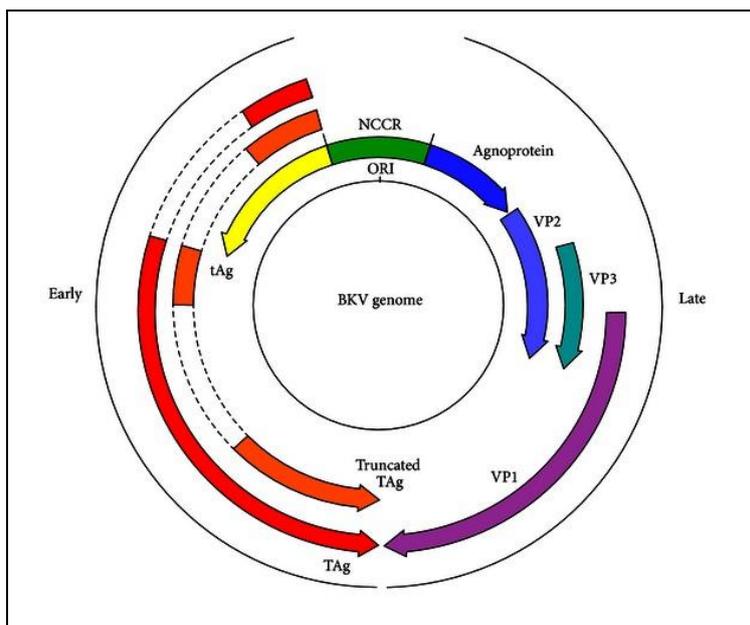


Figure 4 - Structure du génome du BKPyV.
(De Gascun et al., 2013)

II.3. Epidémiologie

Le BKPyV est un virus ubiquitaire. Les différentes études sérologiques montrent une séroprévalence à l'âge adulte d'environ 80%. D'après une étude portant sur 1501 adultes de plus de 21 ans, 82% possèdent des Ac anti BKPyV (Kean *et al.*, 2009). Une autre étude chez 400 donneurs sains de sang retrouve également une séroprévalence de 82% (Egli *et al.*, 2009). Cette prévalence tend à diminuer avec l'âge. De 87% chez les 20-29 ans, elle baisse à 71% chez les 50-59 ans sans doute à cause de la perte des Ac avec l'âge. Le même constat est réalisé par Kean *et coll.* avec une légère baisse de la séroprévalence chez les personnes les plus âgées.

C'est un virus qui infecte l'homme dès l'enfance. Chez des enfants entre 1 et 5 ans, la séroprévalence est de 38.3% tandis que dès 5-10 ans, la séroprévalence est quasiment identique à celle des adultes soit 74.6% (Kean *et al.*, 2009) (Figure 5). Ceci est concordant avec une primo infection survenant dès le plus jeune âge.

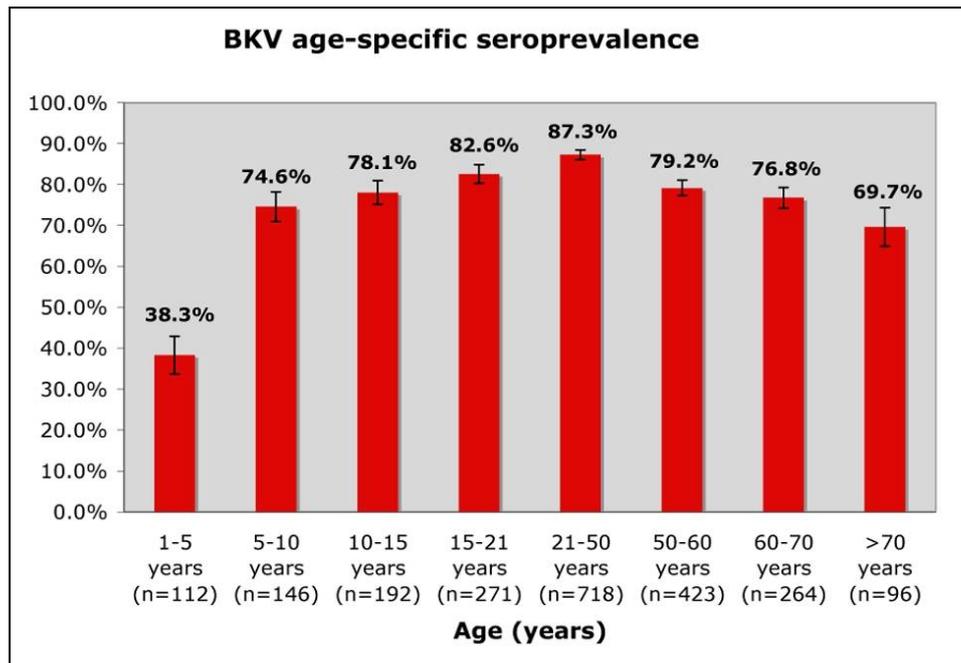


Figure 5 - Séroprévalence du BK virus en fonction de l'âge.

(Kean et al., 2009)

4 sous-types I, II, III et IV sont isolés correspondant à 4 sérotypes différents identifiés par réaction d'inhibition de l'hémagglutination (Jin *et al.*, 1993). La répartition de ces sérotypes dans le monde sera développée plus loin.

II.4. Cycle de réplication

a. Entrée dans la cellule

Il existe plusieurs types de cellules permissives au BKPyV dont les principales sont les cellules tubulaires rénales et du tractus urinaire. Ainsi, dans la plupart des études étudiant la multiplication virale *in vitro*, les cellules utilisées sont des lignées provenant de l'épithélium rénal.

Fixation au récepteur cellulaire

Pour induire une infection de la cellule, le virus doit pouvoir s'y attacher et avoir des interactions avec un récepteur présent à la surface de la cellule. Il pourra ensuite être internalisé et dirigé vers le site de réplication. Le récepteur utilisé par le BKPyV est de nature gangliosidique. Les gangliosides sont des oligosaccharides sialylés avec une queue lipidique céramide qui les ancre dans la membrane cellulaire. Ils peuvent contenir un ou plusieurs acides sialiques. Des études utilisant des cellules provenant de l'épithélium du tubule proximal de rein humain (RPTE pour renal proximal tubule epithelial) ont permis d'identifier

plus précisément les récepteurs cellulaires : les gangliosides GD1b et GT1b qui contiennent un résidu terminal acide di-sialique de type α -(2,8) (Figure 6). L'infection de cellules non permissives est rendue possible après l'ajout de ces gangliosides (Low *et al.*, 2006). Récemment, la supplémentation de cellules Vero en gangliosides GD2 et GD3 possédant le même acide sialique montre une augmentation de la permissivité de ces cellules au BKPyV, ce qui suggère que ce virus peut utiliser différents types de gangliosides pour entrer (Neu *et al.*, 2013).

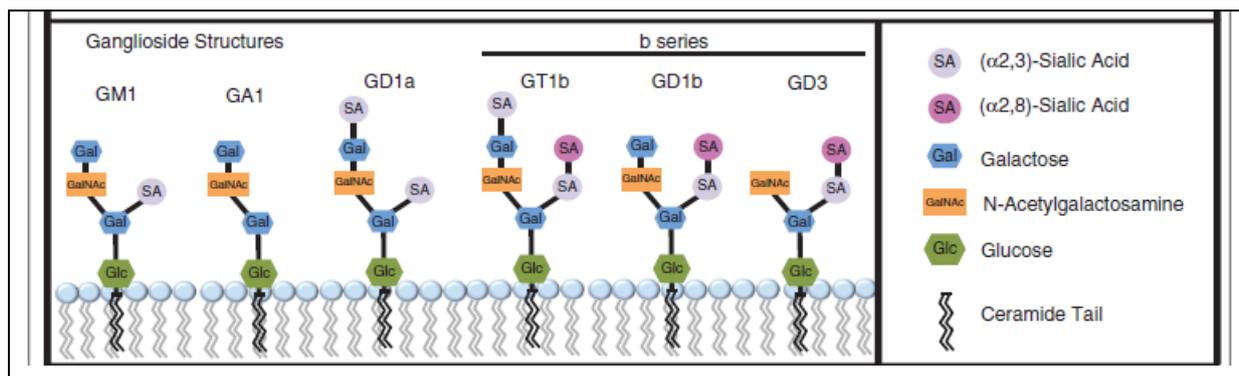


Figure 6 - Structures des gangliosides.

(O'Hara *et al.*, 2014)

Internalisation et signalisation intracellulaire

Après la fixation sur le récepteur, le virus doit entrer dans la cellule. L'internalisation est lente, et dans les hRPTECS semble être le résultat d'une endocytose médiée par la voie des cavéolines (Dugan *et al.*, 2006). Ceci diffère du JCPyV, dont l'entrée fait intervenir une endocytose médiée par un récepteur dépendant des clathrines. La cavéole est un type de microdomaine spécifique retrouvé au niveau d'invaginations de la membrane plasmique, enrichies en cholestérol. Sa formation est dépendante de protéines cavéolines comme la caveoline-1 (Bastiani *et al.*, 2010).

Par la suite, les capsides virales sont dirigées du cytoplasme jusqu'au réticulum endoplasmique. Ce transport dépend de la machinerie cellulaire et plus particulièrement d'un transport via le cytosquelette par les microtubules. L'utilisation d'inhibiteurs a permis de montrer la nécessité des microtubules mais pas de l'actine. Ainsi une déstabilisation des microtubules inhibe l'infection (Eash *et al.*, 2005, Jiang *et al.*, 2009).

Décapsidation du virus et entrée dans le noyau

Parmi les virus à ADN, le passage par le réticulum endoplasmique est spécifique aux polyomavirus. Le principal avantage du passage dans le réticulum endoplasmique, est

l'utilisation des protéines chaperonnes, d'isomérases disulfures, et réductase pour la décapsidation du virus.

Le SV40 semble entrer dans le noyau par l'intermédiaire d'un pore nucléaire. La particule virale complète du BKPyV fait environ 45 nm de diamètre, elle est trop grande pour pouvoir passer directement dans le pore du noyau mais une étape de décapsidation partielle préalable lui permet de diminuer sa taille (< 39nm) et de passer par le pore (Farhenkrog *et al.*, 2003, Pante *et al.*, 2002). Un signal de localisation nucléaire est présent sur les protéines de capsid (VP2 et VP3) mais n'est pas exprimé dans la particule virale complète, la décapsidation permettrait de le mettre en évidence (Nakanishi *et al.*, 2007).

b. Transcription et réplication

Expression des protéines précoces

Une fois dans le noyau, le BKPyV utilise les facteurs nucléaires pour permettre l'expression des gènes viraux. Les protéines régulatrices Ag T et Ag t sont exprimées en premier, suivies par l'initiation de la réplication puis l'expression des gènes tardifs. Le promoteur des gènes précoces situé dans la région NCCR permet l'expression d'un transcrit primaire par l'ARN polymérase de l'hôte qui donnera par épissage alternatif les ARN messagers (ARNm). Les ARNm seront dirigés vers le cytoplasme pour la traduction en protéines précoces.

Réplication du génome viral

L'Ag T exprime ses fonctions régulatrices, c'est la seule protéine virale importante pour la réplication, le reste des éléments est apporté par la cellule hôte. La liaison de l'Ag T sur le pRB permet de lever l'inhibition de la réplication par E2F et sa liaison au p53 bloque l'apoptose, permettant à la cellule de progresser dans le cycle cellulaire et d'entrer en phase S (Harris *et al.*, 1996, Felsani *et al.*, 2006). L'Ag t joue également un rôle dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Les fonctions des protéines régulatrices, altérant le cycle cellulaire confèrent de potentielles propriétés oncogènes au BKPyV. Pour l'instant, aucune preuve de transformation oncogénique associée au BKPyV n'a été trouvée chez l'homme.

La réplication commence au niveau de l'origine de réplication sur la région NCCR. L'Ag T se fixe sur cette région, et forme un double hexamère entraînant l'hydrolyse de l'ATP, le déroulement de la chromatine virale par l'action hélicase. Les hexamères d'Ag T recrutent ensuite la protéine de réplication A (RPA) qui initie le déroulement de la double molécule d'ADN, l'ADN polymérase- α /primase cellulaire ainsi que la topo isomérase I. L'ADN polymérase- α /primase cellulaire synthétise les amorces d'ARN servant de matrice de

réplication pour la polymérase lambda tandis que la topo isomérase I permet de maintenir la molécule d'ADN dans une conformation adéquate. La réplication de l'ADN viral commence (Tognon *et al.*, 2003). La synthèse se déroule de façon bidirectionnelle à partir de l'origine de la réplication jusqu'à ce que le complexe se retrouve de l'autre côté du génome. L'ADN nouvellement synthétisé se complexe avec des histones cellulaires pour prendre sa forme de mini chromosome.

Production des gènes tardifs

Les ARNm des gènes tardifs sont transcrits dans un 2^{ème} temps. Les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3 ainsi que l'agnoprotéine sont synthétisées dans le cytoplasme, elles contiennent des signaux de localisation leur permettant d'être redirigées vers le noyau.

c. Assemblage et libérations des virus néoformés.

Les virions sont assemblés dans le noyau. Ils sont formés par l'assemblage des capsomères autour d'un génome nouvellement synthétisé. Les protéines VP1 se lient entre elles par leur domaine C terminal en un pentamère s'associant avec une protéine mineure VP2 ou VP3 et les pentamères formés s'associent entre eux pour former la capsid. Des particules vides peuvent également être produites, les capsomères s'assemblant sans ADN à l'intérieur. Ces virions s'accumulent dans le noyau et sont visibles en microscopie électronique en transmission sous la forme d'inclusion intra nucléaire. L'accumulation de ces particules virales engorge le noyau provoquant une pression dans celui-ci, la lyse de la cellule entraîne la libération des virions. L'agnoprotéine semble avoir un rôle dans la formation de la capsid (par interaction avec VP1) et aussi dans la libération des virus.

Les différentes étapes du cycle de réplication du BKPyV sont représentées sur la Figure 7.

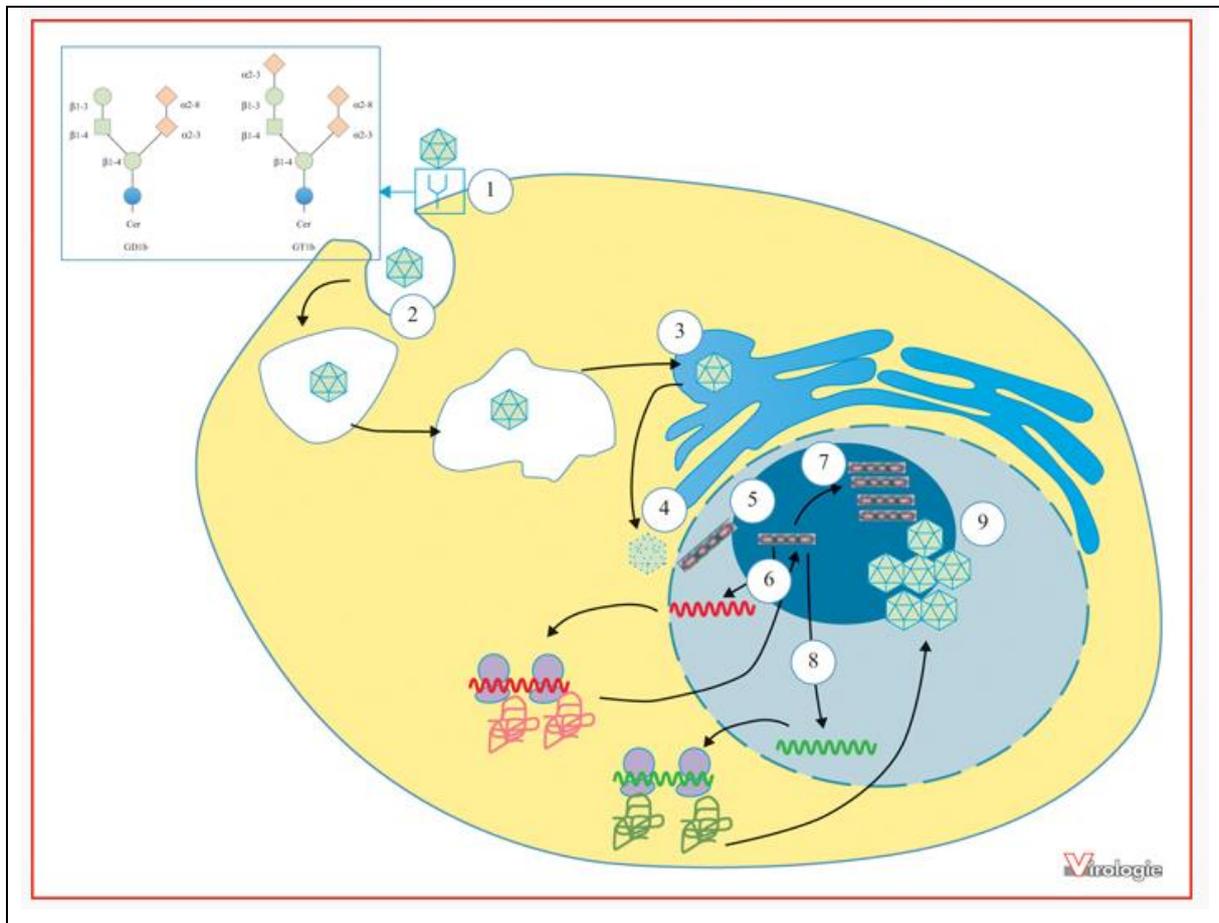


Figure 7 - Le cycle cellulaire du BKPyV

1. Fixation du virus sur son récepteur cellulaire. 2. Internalisation par endocytose médiée par la voie des cavéolines. 3. Transfert grâce aux microtubules vers le réticulum endoplasmique (RE). 4. Décapsulation partielle dans le RE. 5. Passage par le pore nucléaire. 6. Transcription des gènes précoces. 7. Réplication du génome viral. 8. Transcription des gènes tardifs. 9. Assemblage des virions dans le noyau. (Mazalrey et al., 2015)

II.5. Pouvoir pathogène

a. Primo infection

La primo infection survenant la plupart du temps dans l'enfance est asymptomatique dans la majorité des cas. Des publications anciennes suggèrent que la primo infection peut survenir sous forme de syndrome pseudo grippal. De façon anecdotique, des primo infections symptomatiques à type de cystite (hémorragique ou non) ou de syndrome néphrotique ont été rapportées (Hirsch *et al.*, 2003, Goudsmit *et al.*, 1982).

La voie de transmission n'est pas totalement élucidée. La voie principalement suspectée est la transmission par voie respiratoire à cause de la fréquence de séroconversion dans l'enfance, la possibilité de symptômes des voies respiratoires supérieures et la détection du virus par PCR au niveau salivaire et des amygdales chez des enfants. (Goudsmit *et al.*, 1982, Sundsfjord *et al.*, 1994). Par la suite, la dissémination dans l'organisme se ferait par voie hématogène.

D'autres voies ont été évoquées. La transmission urino-orale par l'intermédiaire d'aliments ou d'eau contaminés par des urines de patients infectés semble possible. Le BKPyV a ainsi été retrouvé dans l'environnement. (Bofill-Mas *et al.*, 2000)

La transmission transplacentaire serait possible mais est controversée, des IgM et de l'ADN du BKPyV ont été retrouvés respectivement dans du sérum issu de sang de cordon et au niveau du placenta et de tissus fœtaux. (Pietro Paolo *et al.*, 1998, Brown *et al.*, 1984)

Enfin d'autres voies comme les transfusions sanguines, la greffe d'organe surtout la greffe de rein et le sperme sont proposées. (Zambrano *et al.*, 2002, Dolei *et al.*, 2000, Andrews *et al.*, 1988)

b. Réactivation

Immunocompétents

Chez les immunocompétents, le BKPyV reste à l'état latent après la primo infection. Des réactivations asymptomatiques avec une excrétion du virus dans les urines par desquamation sont observées chez environ 10% des sujets sains. Egli *et coll.* observent une virurie chez 7% des donneurs sains. De même une virurie peut être détectée chez près de 25% des femmes enceintes. (Jin *et al.*, 1993, Egli *et al.*, 2009)

Le virus persiste principalement dans les cellules du tractus réno-urinaire mais il a aussi été retrouvé dans d'autres cellules comme les leucocytes dans le sang ou les cellules des glandes salivaires et l'ADN viral a pu être détecté dans un certain nombre de tissus (prostate, vessie...).

Immunodéprimés

Chez les immunodéprimés, les réactivations objectivées par une excrétion urinaire sont plus fréquentes. Des pathologies associées à cette réactivation peuvent être observées. Elles sont liées aux différents types d'immunodépression (Figure 8).

Immunodépression acquise

La cause la plus fréquente de dysimmunité acquise est l'infection par le VIH avec la diminution du taux de lymphocytes T CD4 associée à l'apparition d'infections opportunistes. D'autres causes de dysimmunité sont les greffes d'organe solide comme le rein ou les greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Lors des transplantations d'organe, le patient reçoit un traitement immunosuppresseur pour éviter une réaction de l'hôte contre le greffon ce qui par conséquent entraîne une immunodépression du patient.

- *VIH et BKPyV*

Le plus pathologique des polyomavirus dans le contexte de l'infection VIH est le JCPyV avec la LEMP affectant 1-6% des patients VIH au stade SIDA. Avant les traitements par antirétroviraux, il y avait quelques cas d'infections sévères à BKPyV chez les patients sidéens. Dans des publications anciennes, le BKPyV était retrouvé dans les urines de 27 à 51% des patients dès lors que les CD4 chutaient en dessous de 200 cellules/ μ L. De plus, la présence de Decoy cells était mise en évidence bien plus souvent avec un taux de CD4 en dessous de 200 cellules/ μ L (Markowitz *et al.*, 1993, Knowles *et al.*, 1999, Sundsfjord *et al.*, 1994). Cependant la présence du virus ou de Decoy cells ne signifie pas forcément que le patient est atteint de PyVAN. Cette pathologie n'était retrouvée que dans le cas d'immunodépression sévère chez des patients avec un taux de CD4 bas (<50 cellules/ μ L). Chez certains patients des défaillances multi viscérales avaient été mise en évidence avec une PyVAN, méningoencéphalite, pneumonie et/ou rétinite. De plus, des cas de cystites hémorragiques avaient été rapportés confirmées par la présence du BKPyV en microscopie électronique et PCR ou excrétion de Decoy cells par immunohistochimie (Bratt *et al.*, 1999).

- *Greffe de CSH et BKPyV*

Chez les patients greffés de CSH, l'incidence des cystites hémorragiques est de 10%. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de la cystite hémorragique : la toxicité sur le rein des molécules utilisées lors du conditionnement comme le cyclophosphamide ou le busulphan ainsi que l'irradiation totale, et les infections virales comme le BKPyV ou l'adénovirus. La cystite hémorragique chez les greffés de CSH résulterait de l'association de plusieurs mécanismes. Tout d'abord des lésions de la muqueuse dues à la chimiothérapie apparaissent puis il y a une réactivation du BKPyV pendant la phase d'aplasie avec une intensification des lésions et enfin une réaction inflammatoire avec un infiltrat lymphocytaire et la destruction des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxique. La cystite à BKPyV serait d'apparition tardive, de durée assez longue (plus d'une semaine) et il y aurait une virurie persistante, à la différence des cystites hémorragiques résultant de l'accumulation d'acroléine (métabolite toxique du cyclophosphamide) qui surviennent en général dans la semaine suivant la greffe et sont de courte durée. Cependant une excrétion du BKPyV n'est pas pathognomonique de la cystite hémorragique puisqu'une virurie est retrouvée chez environ la moitié des patients greffés de CSH. La présence d'une forte virurie $> 10^{10}$ cp/24h d'urine semble être associée à des cystites hémorragiques sévères. Le traitement repose sur l'administration d'un anti douleur, une hyperhydratation, l'irrigation de la vessie et chirurgie urothéliale. Quelques cas d'un traitement efficace par vidarabine ou cidofovir ont été rapportés. (Leung *et al.*, 2005, Hirsch *et al.*, 2003)

D'autres infections à BKPyV ont été décrites comme des dysfonctions hépatique, rénale ou pneumonies interstitielles. Ces cas sont rares.

- *Greffe d'organe solide et BKPyV*

Chez les patients greffés de rein, la principale pathologie liée au BKPyV est la néphropathie tubulo interstitielle associée au BKPyV. Cette pathologie sera développée dans la partie suivante. D'autres pathologies sont aussi retrouvées chez ces patients comme la sténose urétérale comme ce fut le cas chez le patient qui a permis la découverte du BKPyV.

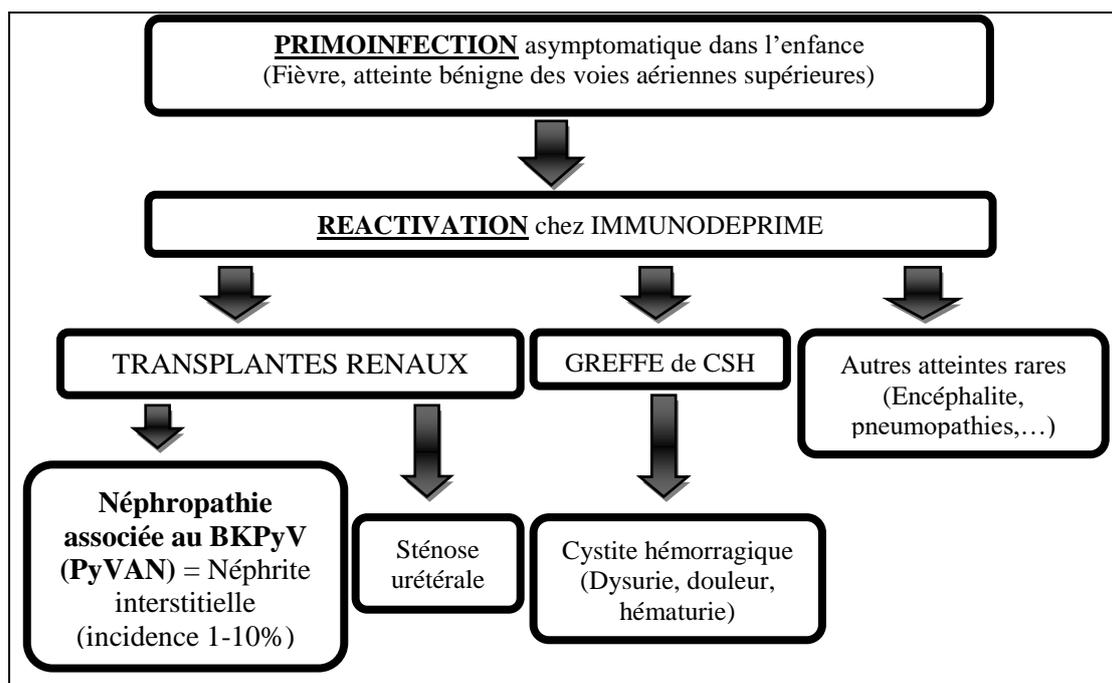


Figure 8 - Le pouvoir pathogène du BKPyV

II.6. Néphropathie tubulo interstitielle associée au BKPyV

a. Epidémiologie

En transplantation rénale, une excrétion du BKPyV peut être observée chez plus de 50% des transplantés et sa présence dans le sang peut être observée chez environ 10-30% des patients (Bressollette-Bodin *et al.*, 2005, Hirsch *et al.*, 2002). Chez certains greffés, l'infection par le BKPyV peut entraîner des sténoses urétrales, des dysfonctions transitoires du greffon ou une défaillance irréversible du greffon par néphropathie tubulo interstitielle liée au BKPyV ou PyVAN (polyomavirus associated nephropathy). Avant l'ère de la ciclosporine, les sténoses urétrales étaient les infections à BKPyV les plus décrites (Coleman *et al.*, 1978). L'émergence des PyVAN est liée à l'utilisation de nouvelles drogues immunosuppressives telles que le tacrolimus ou le mycophénolate mofétil dans les années 1990 (Purighalla *et al.*, 1995). La PyVAN est une néphropathie tubulo interstitielle survenant le plus souvent dans les

2 ans post greffe de rein. Elle est quasi exclusivement observée chez les greffés de rein et très rarement décrite chez d'autres types de greffés d'organe solide.

b. Physiopathologie

Tout d'abord, il y a une réplication intense et prolongée du virus au niveau des cellules épithéliales du rein et du tractus urinaire. Une virurie apparaît. Puis en l'absence de contrôle de l'infection par le système immunitaire de l'hôte, la réplication virale entraîne des effets cytopathogènes marqués par la lyse des cellules, et la lésion de la membrane basale qui laisse passer les virus dans le sang. Une virémie est alors présente. Ainsi le début de la maladie est marqué par l'infiltration du tissu par des cellules inflammatoires, évoluant vers une atrophie tubulaire et une fibrose interstitielle. L'apparition d'une dysfonction du greffon est progressive et peut être irréversible dans les stades tardifs (Randhawa *et al.*, 1999). En post transplantation rénale, 25-30% des patients vont développer une virurie et 10-15% une virémie. Dans environ 5 % des cas, la pathologie évoluera en PyVAN (Figure 9) (Hirsch *et al.*, 2002)

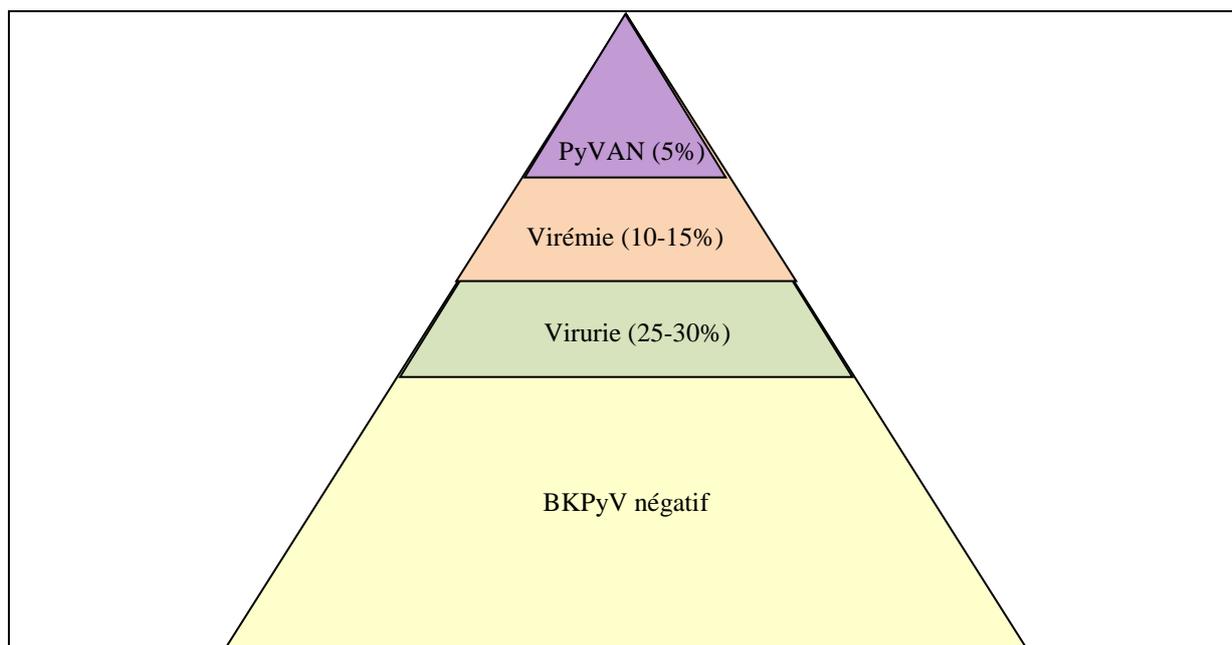


Figure 9 – Fréquence des infections à BKPyV chez les greffés rénaux.
(d'après Hirsch *et al.*, 2002)

c. Facteurs de risque de PyVAN

L'incidence de l'infection à BKPyV est plus élevée chez les greffés de rein par rapport aux autres greffes d'organe solide ou aux greffes de CSH. Certains facteurs de risque liés au donneur ont été suggérés : le nombre de mismatches HLA, la greffe à partir d'un donneur

décédé, un fort taux d'Ac anti BKPyV ou une charge virale élevée dans le greffon suggérant une infection récente, le sexe féminin.... D'autres facteurs sont liés au receveur comme le sexe masculin, un âge avancé, l'absence d'Ac anti BKPyV ou un taux faible, un système immunitaire défaillant. Et enfin des facteurs liés à la prise en charge post greffe comme la présence de stent dans l'uretère, un rejet aigu du greffon et un traitement anti rejet, l'administration de corticoïdes, la déplétion en lymphocytes producteurs d'Ac, une concentration importante en immunosuppresseurs, la faible réponse lymphocytes T anti BKPyV. Lors d'une deuxième transplantation rénale après une première perte de greffon liée à une PyVAN le patient est aussi plus à risque de développer une nouvelle fois une PyVAN. Parmi les immunosuppresseurs, certains seraient plus à risque d'induire une infection par le BKPyV comme l'association de tacrolimus et mycophénolate mofétil comparée à ciclosporine et mycophénolate mofétil ou inhibiteurs de mTOR (Figure 10) (Hirsch *et al.*, 2013).

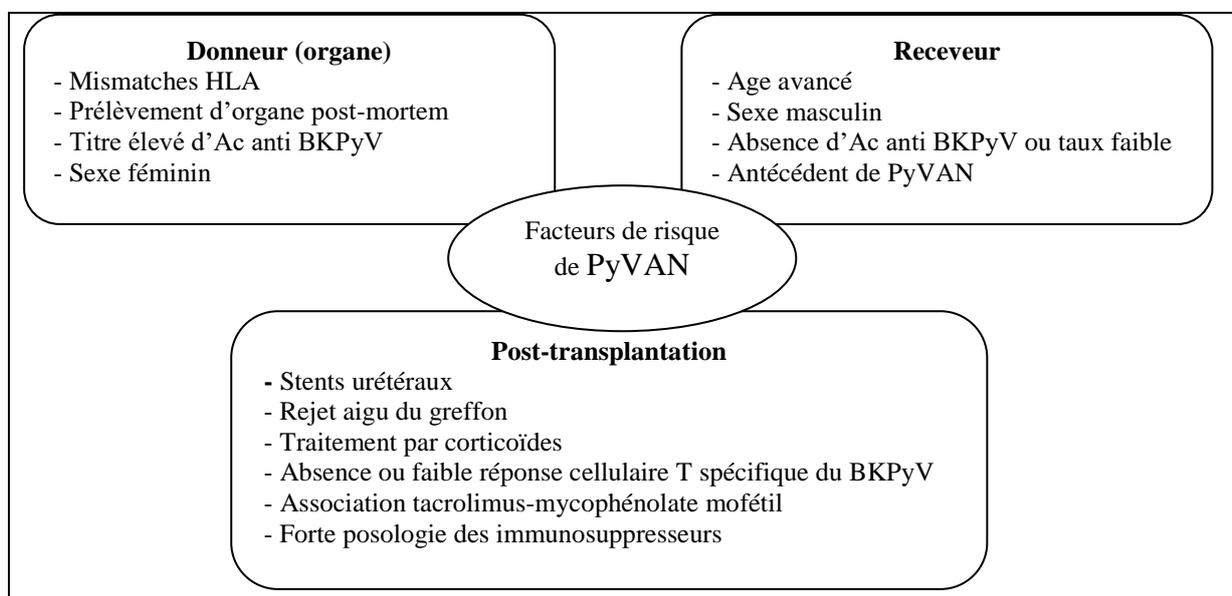


Figure 10 - Facteurs de risque de PyVAN chez les patients greffés de rein.
(Hirsch *et al.*, 2013)

d. Signes cliniques et biologiques

Il n'y a pas de signe clinique évoquant la PyVAN. Ainsi, la PyVAN passe inaperçue (pas de fièvre ou de symptôme d'infection virale). Il existe un signe biologique évoquant la dégradation de la fonction rénale : la baisse de la clairance rénale de la créatinine. Cependant ce signe est aspécifique et peut aussi correspondre à d'autres diagnostics différentiels de la PyVAN comme le rejet aigu de greffe. Il faut donc surveiller de près les patients greffés de reins à la recherche d'une répllication de ce virus puisque l'infection est inapparente cliniquement.

e. Méthodes diagnostiques

Cytologie urinaire (recherche de Decoy cells)

La cytologie urinaire correspond à la recherche de cellules infectées par le virus provenant de la desquamation de l'épithélium tubulaire rénal. Cette recherche est effectuée après une coloration spécifique, la coloration de Papanicolaou. Ces cellules sont appelées Decoy cells car elles peuvent être confondues de par leur aspect atypique avec des cellules malignes. Ce sont de volumineuses cellules avec un haut rapport nucléo-cytoplasmique. Le noyau est gros, homogène et présente un aspect en verre dépoli, l'inclusion centrale basophile paraît occuper tout le noyau (Figure 11). Ce test est assez sensible puisque 100% des patients présentant une PyVAN sont positifs. Mais il est très peu spécifique car seulement 29% des patients présentant des Decoy cells sont atteints de PyVAN. De plus, c'est un test qui est difficilement applicable au suivi systématique de larges cohortes car non automatisable (Dall *et al.*, 2008, Koh *et al.*, 2012).

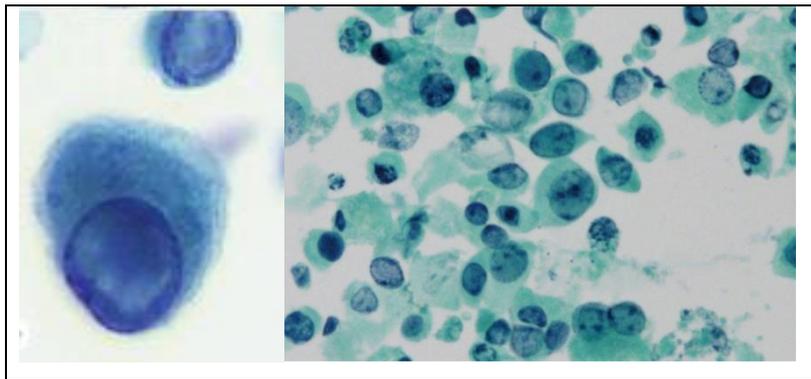


Figure 11 - Présence de Decoy cell, dans l'urine.

*Ce sont de grandes cellules basophiles à noyau élargi, chromatine en verre dépoli, inclusion nucléaire (Drachenberg *et al.*, 2005 à gauche, Koh *et al.*, 2012 à droite).*

Recherche d'agrégats de virus dans les urines par microscopie électronique (polyomavirus-Haufen test)

« Haufen » signifie agrégats en allemand. C'est un test non invasif, des agrégats de particules virales sont recherchés dans les urines des patients transplantés de rein par microscopie électronique. La détection des « polyomavirus-Haufen » est bien corrélée avec l'existence d'une PyVAN, avec une forte valeur prédictive positive et négative. Les agrégats de polyomavirus sont formés au niveau des tubules rénaux et résultent de la réplication virale aboutissant à la lyse cellulaire et à la libération de ces virions néoformés dans la lumière tubulaire (Figure 12) (Singh *et al.*, 2009).

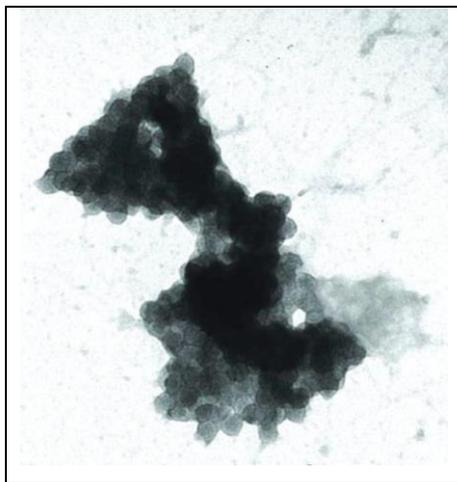


Figure 12 - Agrégat de virus (polyomavirus-Haufen) dans l'urine d'un patient atteint de PyVAN.
Microscopie électronique (uranyl acetate stain: $\times 100000$ magnification). (Nickleit et al., 2015).

Recherche du génome viral dans les urines et le sang

La détection de l'ADN viral se fait par PCR temps réel et quantitatives. Il existe des techniques maison mais aussi des kits commerciaux. C'est actuellement la méthode de référence utilisée pour le suivi des patients à risque. La détection de l'ADN viral dans les urines (virurie) présente les avantages suivant : une forte valeur prédictive négative de PyVAN, une positivité plus précoce que l'apparition de la virémie (6-12 semaines), le prélèvement est non invasif. Ses inconvénients sont la faible valeur prédictive positive, la virurie peut être fluctuante, le BKPyV peut persister plus longtemps dans les urines après l'initiation du traitement par rapport au virus détecté dans le sang (Hirsch *et al.*, 2002, Randhawa *et al.*, 2005, Drachenberg *et al.*, 2004, Funk *et al.*, 2008). La virémie peut être recherchée tous les mois, lorsqu'elle est positive avec une charge supérieure à 4 log cp/mL de façon soutenue, elle oriente vers une PyVAN probable et ce même sans confirmation par la biopsie.

Ponction biopsie rénale

C'est l'examen permettant une confirmation de la PyVAN et il permet d'objectiver l'étendue des lésions. Lors de la ponction biopsie rénale, les lésions observées sont classées en 3 stades A, B et C (Tableau 2).

Le stade A est le stade le plus précoce, la fonction rénale est le plus souvent préservée et les lésions sont modérées et focales. A ce stade, la biopsie peut être faussement négative si elle n'est pas réalisée au niveau d'une lésion. La répétition des biopsies peut être utile.

Le stade B correspond à des lésions d'inflammation et un effet cytopathogène plus marqués, ainsi que des lésions d'atrophie et de fibrose progressive (Figure 13).

Le stade C est le stade le plus sévère, les lésions y sont importantes (fibrose), irréversibles et il est associé à une dysfonction sévère du greffon. Le stade est prédictif du devenir du greffon (Hirsch et Randhawa, 2013).

Pour confirmer l'implication du BKPyV, la détection des antigènes viraux est réalisée par immunohistochimie (Figure 13). Ceci permet de différencier les infections liées au BKPyV des autres infections virales comme celles liées à l'adénovirus ou à l'herpès. Le plus souvent, les Ac utilisés sont des Ac dirigés contre l'Ag T du SV40. Ils croisent avec les Ag T du BKPyV et du JCPyV. Il existe des Ac spécifiques du BKPyV utilisés à visée de recherche. (Hirsch et Randhawa, 2013)

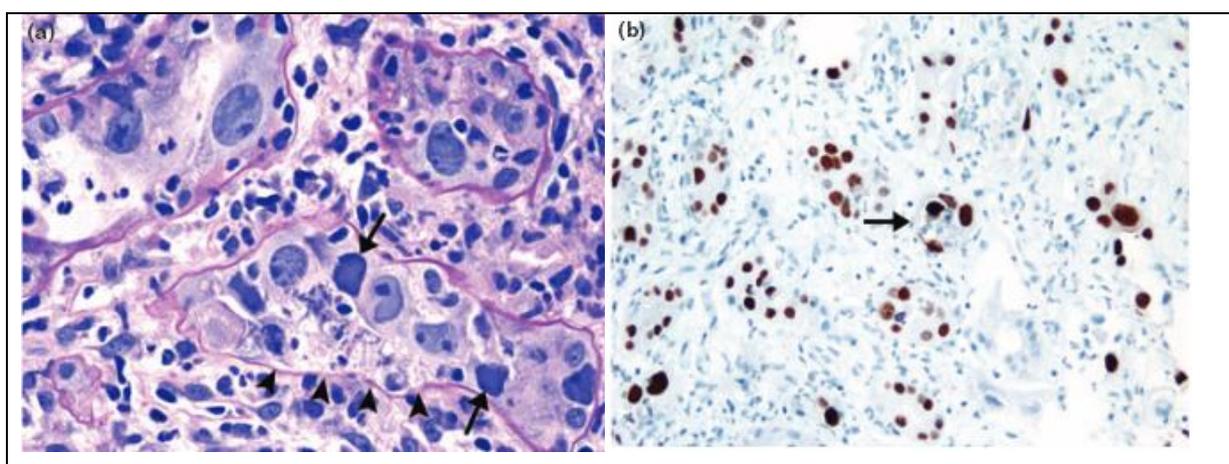


Figure 13 - Biopsie rénale d'un patient stade B de PyVAN

(Nickleit et al., 2006)

(a) Biopsie rénale d'un patient stade B de PyVAN. Les flèches montrent des inclusions intranucléaires dans les cellules tubulaires. Les têtes de flèches montrent la dénudation des membranes basales tubulaires et la lyse de cellules épithéliales tubulaires. Le compartiment interstitiel montre des œdèmes et infiltrat de cellules inflammatoires Coloration PAS (Periodic acid schiff) épithéliales x 140.

(b) Révélation des cellules infectées par immunohistochimie. La flèche montre une dénudation de la membrane basale. Tissu paraffiné fixé par la formaline, Ac dirigés contre l'Ag T du SV40. X 100.

Tableau 2 - Description des différents stades de PyVAN.

	Stade A	Stade B			Stade C
		B1	B2	B3	
Altérations cytologiques	≤25%	11-50%			Variable
Inflammation interstitielle	≤10%	11-25%	Variable	>50%	Variable
Atrophie tubulaire	≤10%	<50%			>50%
Fibrose interstitielle	≤10%	<50%			>50%
Risque de perte du greffon	<10%	25%	50%	75%	>80%

(d'après Hirsch et Randhawa, 2013)

Les différents tests utilisés lors du screening à la recherche de la réplication du BKPyV permettent de classer les patients en fonction de la probabilité du diagnostic de PyVAN en diagnostic possible, probable ou prouvé voir le Tableau 3.

Tableau 3 - Critères diagnostiques d'une PyVAN.

Tests		Diagnostic de PyVAN		
		Possible	Probable	Prouvé
Urine	-Recherche de Decoy cells -Virurie > 7 log cp/mL - « polyomavirus-Haufen »	+	+	+
Sang	Virémie > 4 log cp/mL	-	+	+
Biopsie	Lésions de PyVAN	-	-	+
Traitement		Non	Oui	Oui

(d'après Hirsch et Randhawa, 2013)

f. Démarche diagnostique

Selon les recommandations internationales, la recherche de la réplication du BKPyV doit être effectuée de façon systématique en post greffe de rein. Devant l'absence de traitement antiviral efficace, la détection précoce de la réactivation du BKPyV permet d'initier la réduction des immunosuppresseurs et de limiter l'évolution vers une PyVAN. Pour cela, il est conseillé d'effectuer une recherche au moins tous les 3 mois pendant les 2 premières années post greffe puis annuellement jusqu'à la 5^{ème} année. La détection de la réplication du virus peut être réalisée par PCR quantitative dans les urines ou recherche de Decoy cell et/ou PCR quantitative dans le sang. Ceci permettrait d'identifier au moins 80% des patients à risque de PyVAN avant l'altération de la fonction rénale. Plusieurs types de stratégies peuvent être mises en place. La Figure 14 explique la démarche diagnostique préconisée par Hirsch et Randhawa. (Hirsch et Randhawa, 2013)

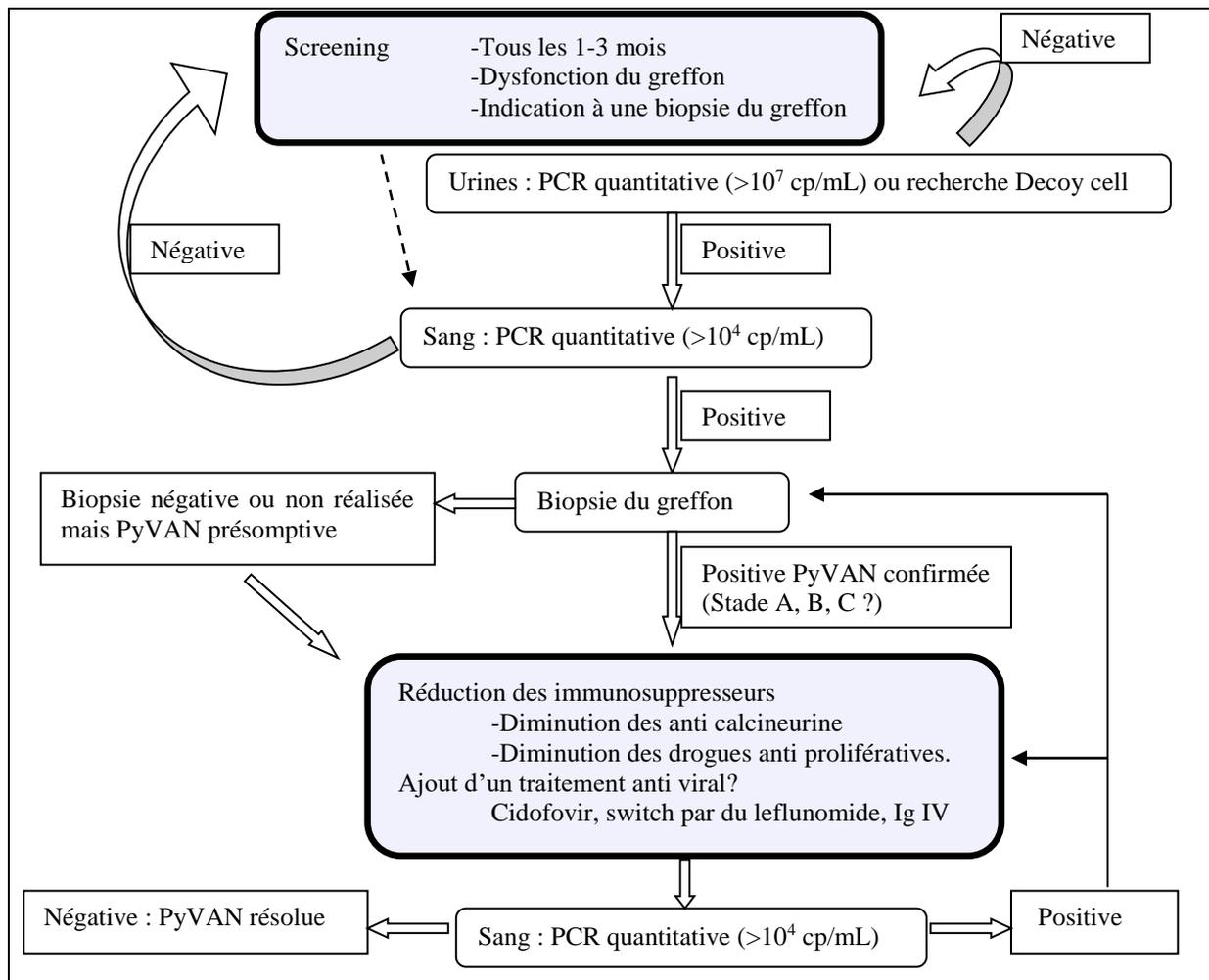


Figure 14 - Dépistage, suivi et prise en charge des infections à BKPyV chez les patients transplantés de rein.

(d'après Hirsch et Randhawa, 2013)

Au CHU de Nantes, la détermination de la virurie et de la virémie sont réalisées de façon concomitante.

g. Traitement des PyVAN

Le traitement immunosuppresseur classique après transplantation rénale associe corticoïdes, inhibiteur de calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) et inhibiteur de prolifération cellulaire (mycophénolate mofétil). Lors d'une PyVAN confirmée ou probable, plusieurs stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées :

- Réduction de l'immunosuppression

Devant une PyVAN, le premier traitement consiste en la diminution de l'immunosuppression. L'objectif est de restaurer le système immunitaire en diminuant le

traitement immunosuppresseur voir en l'arrêtant. Un monitoring des charges virales du BKPyV dans le sang et les urines par PCR permettra d'adapter les immunosuppresseurs. Ainsi de nombreuses études observationnelles ont prouvé que plus de 85% des virémies disparaissent à la suite d'une réduction de l'immunosuppression. (Wadei *et al.*, 2006, Schaub *et al.*, 2010, Giraldi *et al.*, 2007).

La corticothérapie sera fortement réduite voire arrêtée.

Certains immunosuppresseurs sont plus à risque d'induire des PyVAN : le mycophénolate mofétil ou le tacrolimus.

De plus, des taux cibles des immunosuppresseurs sont préconisés (Hirsch et Rhandawa, 2013).

Tacrolimus < 6 ng/mL

Ciclosporine < 150 ng/mL

Sirolimus <6 ng/mL

Mycophénolate mofétil dose équivalente par jour < 1000mg

Chez des patients présentant une PyVAN avancée, une diminution plus importante des doses peut être nécessaire.

- **Changement d'immunosuppresseur**

Certains immunosuppresseurs sont plus à risque de PyVAN que d'autres ainsi leur changement pour un autre immunosuppresseur peut être évoquée. Par exemple, il peut être proposé de changer le tacrolimus par de la ciclosporine à faible dose, l'inhibiteur de calcineurine par du sirolimus à faible dose ou le mycophénolate mofétil par de faibles doses de sirolimus....

Le Sirolimus est un inhibiteur de mTOR, il agit comme immunosuppresseur, réduit la translation et la progression du cycle cellulaire.

- **Ajout d'un traitement anti viral**

Chez des patients, malgré la réduction du traitement immunosuppresseur, la charge virale du BKPyV reste élevée. Dans ce cas, un traitement anti viral peut être proposé. Il n'y a pas de traitement antiviral spécifique du BKPyV mais plusieurs thérapies ont été étudiées.

Cidofovir et CMX 001

Le cidofovir est un analogue nucléosidique utilisé dans le traitement du CMV en inhibant l'ADN polymérase. Il inhibe la réplication du BKPyV *in vitro* mais présente une toxicité cellulaire. Un traitement par une faible dose de cidofovir chez des patients greffés de

CSH a présenté des effets positifs cliniquement et biologiquement avec une réduction de la virurie et de la virémie. (Savona *et al.*, 2007). Cependant, chez des patients greffés de rein, le traitement par cidofovir est limité de par sa néphrotoxicité et sa faible biodisponibilité par voie orale (Safrin *et al.*, 1997).

Le CMX 001 (hexadecyloxypropyl-cidofovir, brincidofovir) est un dérivé du cidofovir conjugué à un lipide. Il permet d'augmenter la biodisponibilité orale du cidofovir et de diminuer sa néphrotoxicité. Le CMX 001 est plus efficace que le cidofovir sur la réplication du BKPyV *in vitro*. (Rinaldo *et al.*, 2010) Plusieurs cas de patients traités efficacement par le CMX 001 ont été rapportés. Pour l'instant, l'action *in vivo* n'a pas encore été confirmée par des études randomisées

Léflunomide

Le léflunomide est un immunosuppresseur qui inhibe la dihydroorotate déhydrogénase, la tyrosine kinase et la synthèse de la pyrimidine. Il a une faible activité inhibitrice sur la réplication du BKPyV *in vitro*. Les études *in vitro* sur des cellules RPTE montrent des résultats contradictoires (Farasati *et al.*, 2005, Bernhoff *et al.*, 2010). Une étude rétrospective sur de patients transplantés de rein a montré une diminution des charges virales urinaires et sanguines chez les patients traités par léflunomide. Cependant, de nombreux effets indésirables ont été décrits : hépatite, hémolyse, microangiopathie thrombotique, pneumonie fongique et aplasie médullaire. (Josephson *et al.*, 2006, Williams *et al.*, 2005)

Fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques qui inhibent la réplication de l'ADN bactérien en agissant sur la topoisomérase de type II. Sur les virus, elles inhiberaient l'activité hélicase de l'Ag T. (Ali *et al.*, 2007). L'utilisation de fluoroquinolone avec une diminution de l'immunosuppression est efficace *in vitro*. (Portolani *et al.*, 1988). L'utilisation de fluoroquinolone en prophylaxie de PyVAN chez les greffés de rein ou de cystite hémorragique chez les greffés de CSH semble efficace. (Gabardi *et al.*, 2010, Leung *et al.*, 2005)

Immunoglobulines intraveineuses

Les Ig IV contiennent des Ac neutralisants dirigés contre le BKPyV, en association avec une diminution de l'immunosuppression, elles ont été utilisées pour traiter des infections à BKPyV. Les Ig IV ne pénètrent pas dans le compartiment intracellulaire mais elles agissent par leur action neutralisante et des effets immunomodulateurs indirects. Ceci a été démontré *in vitro*. Cependant des données contradictoires ont été observées *in vivo*, ainsi, un titre élevé d'Ac ne protège pas de l'infection (Randhawa *et al.*, 2010, Randhawa *et al.*, 2015, Bohl *et al.*, 2008).

III. La protéine de capsid VP1 du polyomavirus

La protéine VP1 est la protéine majeure de capsid. La capsid du BKPyV est de forme icosaédrique contenant 360 protéines VP1 associées en 72 pentamères. Chaque partie C terminale permet de se fixer sur le pentamère d'à côté et donc de constituer la capsid. Un pourcentage d'identité de séquence élevé est retrouvé entre les polyomavirus. Il existe une homologie d'environ 70% entre la protéine VP1 du BKPyV et du SV40. (Kean *et al.*, 2009)

III.1. Structure de la protéine

La structure cristallographique de la particule du SV40 a été publiée pour la 1^{ère} fois par Liddington en 1991. La protéine de capsid VP1 est divisée en plusieurs domaines de A à J (Liddington *et al.*, 1991).

La structure tertiaire d'une protéine VP1 (soit une sous unité du pentamère) est constituée d'un bras N-terminal, d'un sandwich de feuillets β et un bras C-terminal qui permet de faire la jonction entre les différents pentamères.

La structure est présentée Figure 15. Les 2 feuillets β correspondent aux domaines BIDG2 et CHEFG1. Les différents domaines se placent de façon presque parallèle autour d'un axe à 5 cotés. Des boucles émergent de la structure du feuillet β : BC, DE, EF, GH et HI. Les boucles BC, DE et HI sont des structures proches et placées à l'extérieur du sandwich. La longue boucle EF de 64 résidus est à l'intérieur du virus et a une forme de spirale donnant sur le côté de la protéine. Deux domaines s'ajoutent au feuillet BIDG1 quatre résidus de N terminal forment le domaine A et la partie C terminale d'un pentamère adjacent le domaine J. Le domaine A ainsi que l'hélice A bloquent le domaine J de la sous unité adjacente et le maintiennent en place, permettant le maintien du pentamère. Le bras C terminal est constitué de 3 segments l'hélice C (302-314), l'insert C (315-344) contenant le domaine J (résidus 330-336) et la boucle C (345-361) (Figure 15).

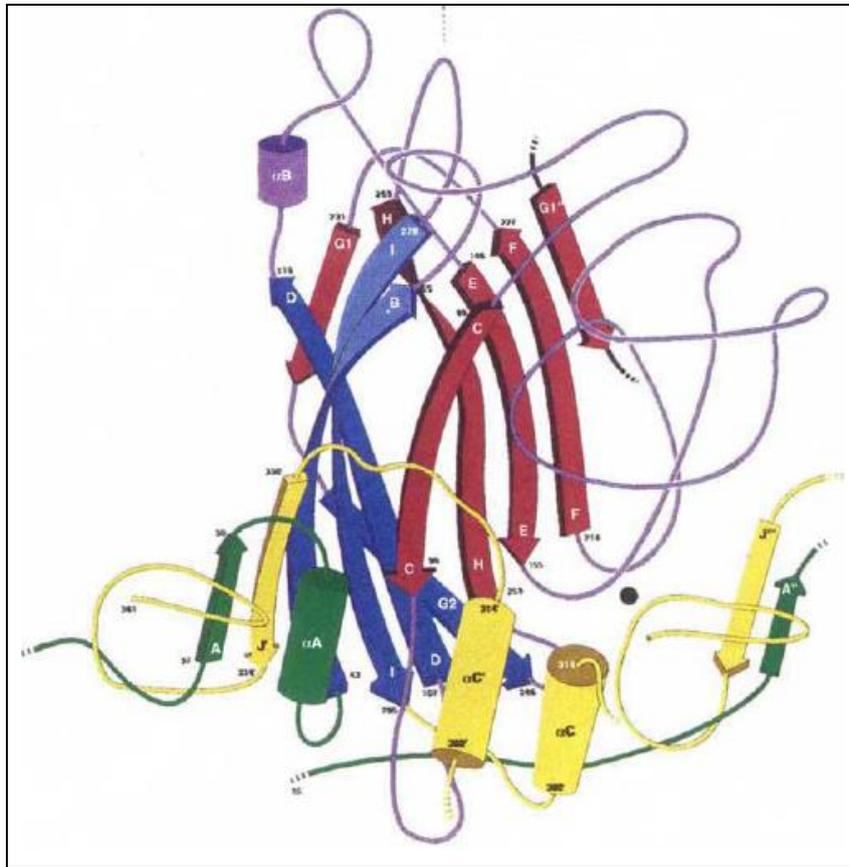


Figure 15 - Vue d'une protéine VP1 correspondant à une sous unité du pentamère.

En bleu : le feuillet β BIDG2, en rouge : le feuillet β CHEFG1, en violet : boucles liant les brins des feuilletts β (BC, DE, EF, GH, HI), en vert les parties N-terminale, en jaune les parties C-terminale (Liddington et al., 1991)

Cinq sous unités VP1 s'associent pour former un pentamère (Figure 16). Le domaine G est divisé en 2 parties. La partie C terminale de G nommée G2 réalise plusieurs liaisons hydrogènes avec le feuillet BIDG. La partie N terminale de G nommée G1 correspond à un 5^{ème} domaine du feuillet CHEF de la sous unité voisine. Le brin D quitte à mi-parcours le feuillet BIDG ; il forme la boucle DE contenant une hélice α se situant dans la spirale des boucles EF et les boucles BC et HI de la sous unité voisine.

Le pentamère possède une forme conique la base se situant à la partie interne de la capsid. Les boucles BC, DE et HI forment la surface du pentamère ce sont les seules parties exposées à la surface du virus et donc sont en contact avec le milieu extérieur. Ce sont ces régions qui sont impliquées dans la reconnaissance et la fixation au récepteur cellulaire.

La base est formée par les brins F et G.

Chaque pentamère reçoit (fixe) cinq bras invasifs (C terminal) et envoie cinq bras invasifs (un venant de chaque sous unité) permettant de se lier aux pentamères voisins.

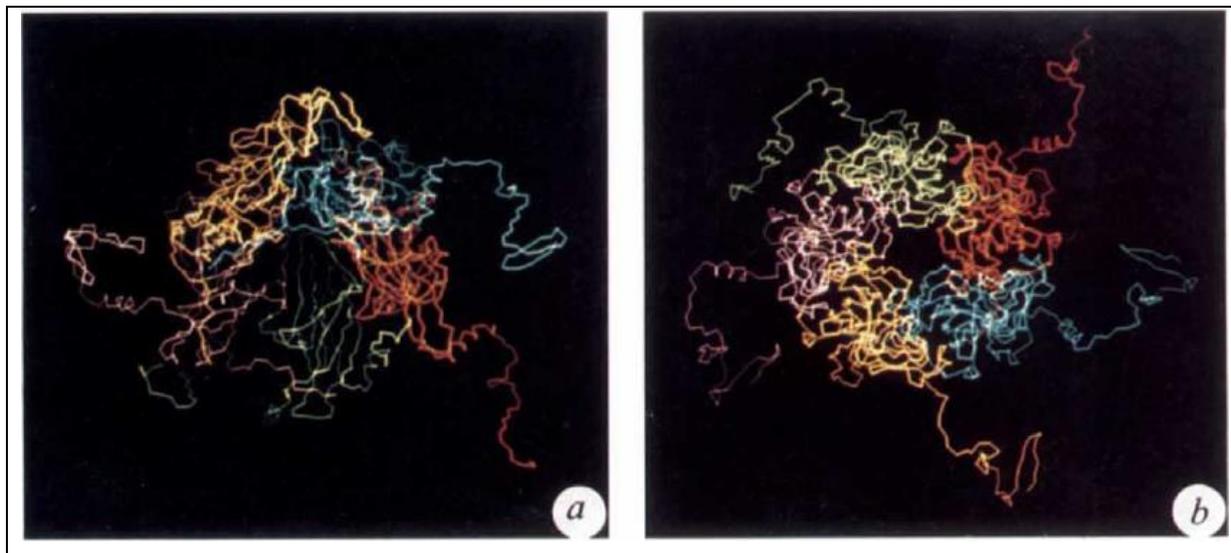


Figure 16 - Vue d'un pentamère de VP1 du virus SV40.

(a) vue de l'intérieur du virus sur un pentamère de VP1 à noter la forme en cône au niveau de l'axe principal.
 (b) vue de l'extérieur du virus d'un pentamère de VP1 (Liddington et al., 1991).

III.2. Epidémiologie moléculaire

La boucle BC contient une courte séquence appelée BK subtyping region (TR) de 69pb soit allant des nucléotides 1744 à 1812 correspondant aux acides aminés 61 à 83. Cette région variable est utilisée pour identifier les 4 génotypes (Jin *et al.*, 1993). Elle est aussi responsable de l'existence de variants antigéniques du BKPyV.

4 sous-types I, II, II et IV ont été décrits correspondant à 4 sérotypes différents identifiés par réaction d'inhibition de l'hémagglutination. L'analyse de séquences d'ADN du gène VP1 provenant de différents isolats montre des différences entre les virus, ces différences sont corrélées avec l'appartenance aux différents sérotypes. Ainsi les génotypes du BKPyV I et BKPyV IV correspondent à des sérotypes distincts au regard de la réponse Ac neutralisante chez l'homme. Un virus d'un génotype peut échapper aux Ac neutralisants spécifiques d'un autre génotype (Pastrana *et al.*, 2012, Ambalathingal *et al.*, 2017). Le génotype I est ensuite séparé en plusieurs sous types : Ia, Ib-1, Ib-2 et Ic. La formation de pseudo virus et l'étude de la neutralisation par des sérums de patients sains permettent de montrer que les différents génotypes correspondent à des sérotypes distincts. Et que les génotypes Ib-1 et Ib-2 correspondent à des sérotypes séparés (Pastrana *et al.*, 2013).

La distribution des différents génotypes varie en fonction de la localisation géographique. Le sous type I est le sous type majoritaire retrouvé partout dans le monde l'incidence est de 46 à 82% selon la localisation géographique. Le sous type IV est le deuxième plus répandu avec une très forte prévalence dans l'Est asiatique ainsi qu'en Europe, il n'est pas retrouvé en

Afrique. Les autres sous types II et III sont plus rares. Le sous type I est subdivisé en 4 groupes Ia, Ib-1, Ib-2 et Ic de répartition géographique différente. Le Ia est présent en Afrique, Ib-1 en Asie du sud-est, Ib-2 en Europe et Amérique et le Ic en Asie (Figure 17).

Il n'existe pas de corrélation entre un sous type et un risque accru de pathologie (Zheng *et al.*, 2007, Takasaka *et al.*, 2004, Ikegaya *et al.*, 2006, Yogo *et al.*, 2009).

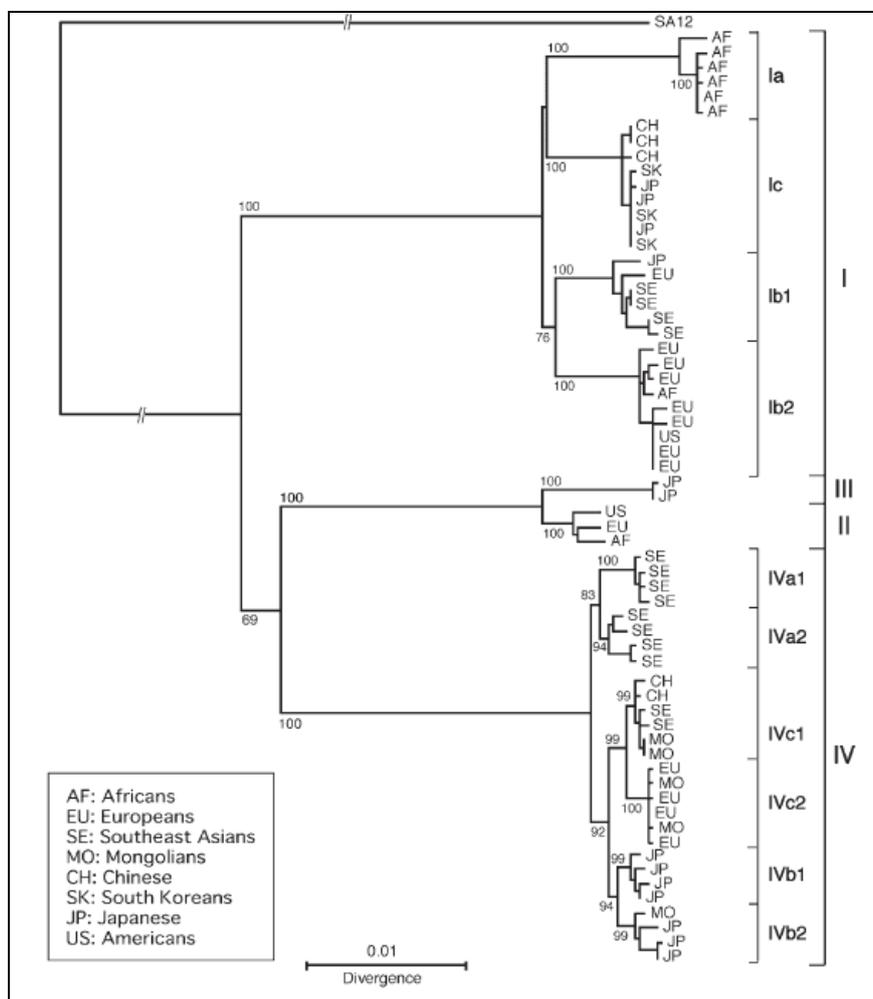


Figure 17 - Arbre phylogénétique des différents génotypes de BKPyV.
 (Yogo *et al.*, 2009)

III.3. Evolution génétique de VP1

a. Interaction VP1 et récepteur cellulaire

Le rôle principal de la protéine VP1 est la reconnaissance du récepteur cellulaire du BKPyV et sa fixation sur ce récepteur. La structure des boucles donnant sur l'extérieur du virus BC, DE et HI est essentielle pour le virus. Cette structure de VP1 est primordiale pour la formation de la capsid et la fixation au récepteur cellulaire. Des changements dans les acides aminés des boucles externes de VP1 du MPyV peuvent entraîner des modifications dans les propriétés du virus à induire des tumeurs chez la souris *in vivo* (Freund *et al.*, 1991a). *In vitro*,

les modifications des acides aminés peuvent modifier les propriétés d'hémagglutination du virus, de propagation dans les cultures cellulaires ou d'intégrité de la capsid. (Dugan *et al.*, 2007, Freund *et al.*, 1991b)

Dugan *et coll.* ont créé des virus possédant une mutation ponctuelle au niveau des boucles externes BC, DE et HI de VP1. Cette étude porte sur l'efficacité de la transfection des cellules Vero et l'expression de VP1. Certaines mutations engendrent une instabilité de la capsid avec une faible viabilité du virus et une absence de formation de la capsid (R281A, H130A, R64A, G65A, D79A, G282A). Ces mutations ne sont pas bénéfiques pour le virus puisqu'elles empêchent la formation de la capsid. D'autres mutations ne semblent pas affecter la viabilité du virus mais entraînent un défaut de fixation sur le récepteur cellulaire (K84A, K69A et H137A), ces mutations sont aussi péjoratives tandis que d'autres mutations permettent une fixation plus forte sur le récepteur (R83A et E61A) (Dugan *et al.*, 2007). Certaines mutations ponctuelles n'ont aucun impact sur la formation de la capsid ni sur la capacité infectieuse du virus.

Une modélisation de VP1 et de l'interaction VP1 - motif sialique du récepteur cellulaire permet de mettre en lumière les implications de modification des acides aminés sur les boucles BC, DE et HI (Figure 18). Ainsi des mutations au niveau de ces boucles peuvent entraîner un défaut de viabilité par altération de formation de la capsid ou par défaut de fixation au récepteur cellulaire.

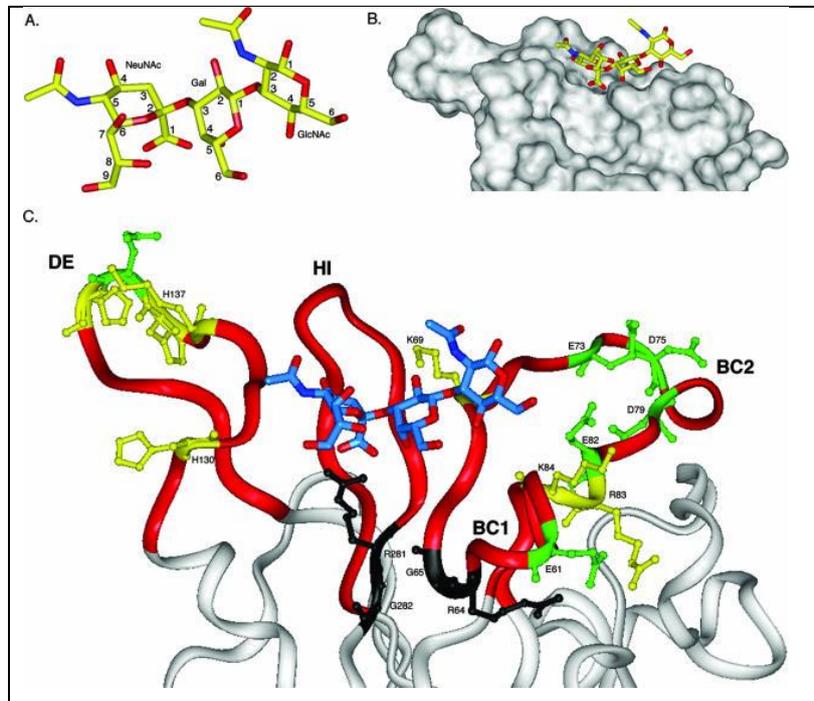


Figure 18 - Modélisation du site de reconnaissance du Récepteur cellulaire (motif sialique) formé par VP1et interaction avec ce récepteur.

A: Motif sialique du récepteur cellulaire.

B: Interaction récepteur cellulaire - VP1

C: Détail de la zone d'interaction avec le récepteur (boucles BC, DE et HI)

En jaune les aa chargés positivement sont dirigés vers le centre de la dépression tandis que les aa chargés négativement sont projetés vers l'extérieur des boucles. (Dugan et al., 2007)

Le séquençage d'isolats cliniques à partir d'urines de patients infectés par le BKPyV par Krautkrämer *et coll.* montre la présence de mutations chez 10 des 45 isolats et 6 mutations sur les 10 changent la charge de l'acide aminé. Les mutations retrouvées sont : F66L, E82D, E73Q, A72V, H139N, D77H. Des mutations déjà décrites par Dugan *et coll.* n'affectant pas la réplication virale sont observées tandis que les mutations entraînant une instabilité et un défaut de fixation sur la cellule hôte n'ont pas été retrouvées dans les isolats cliniques. Il existe donc des virus qui mutent mais restent infectieux.

Cependant, il n'y a pas de différence significative dans la virurie entre les BKPyV mutés et les non mutés (Krautkrämer *et al.*, 2009).

De par son implication dans la fixation au récepteur cellulaire et aussi la reconnaissance par les Ac dirigés contre le virus, la boucle BC joue un rôle central pour le BKPyV.

b. Impact sur le tropisme

Le BKPyV se fixe sur les gangliosides présents sur la cellule hôte. Ces gangliosides sont : GD1b, GT1b essentiellement mais aussi GD2 et GD3. Mais il ne se fixe pas sur le GM1. Chez le SV40, la fixation se fait sur le ganglioside GM1. Entre ces deux virus, l'acide aminé en position 68 est différent. Le BKPyV possède une lysine tandis que le SV40 possède une sérine. Neu *et coll*, ont muté le BKPyV sur cette position. La substitution K68S entraîne une modification de l'attachement du BKPyV qui ne se fixe plus au GD3 mais se fixe sur le GM1 comme le SV40. Ainsi, ils démontrent que des mutations ponctuelles peuvent être à l'origine de changement de récepteur cellulaire et donc de tropisme (Neu *et al.*, 2013).

c. Impact sur la pathogénicité (modèle du JCPyV)

Dans le contexte du JCPyV, le rôle de VP1 dans la fixation au récepteur cellulaire est également prouvé. La poche créée par les boucles HI et BC du JCPyV va permettre au virus de se fixer au niveau de l'acide sialique présent sur le récepteur. Des mutations ponctuelles générées *in vitro* sur certains acides aminés peuvent entraîner une infection abortive avec un virus défectueux tandis que d'autres mutations ne modifient pas le virus qui peut se propager de façon identique au virus sauvage. Une mutation R56G qui entraîne une infection abortive n'entraîne pas de défaut d'encapsidation du virus. Cette mutation modifie la fixation au récepteur cellulaire. Le virus est formé normalement mais il ne peut plus se fixer au récepteur et donc ne peut plus se propager (Gee *et al.*, 2004).

Au vue de l'importance des boucles externes de VP1, des propositions concernant l'association d'une augmentation du potentiel pathogène avec les changements d'acides aminés ont été proposées.

Des mutations au niveau des boucles BC, DE et HI de VP1 ont été observées chez des patients atteints de LEMP. Ces mutations sont retrouvées dans les virus présent au niveau du LCR. Une accumulation de mutations est retrouvée chez les patients présentant une propagation du virus. Ainsi, lors d'un long suivi, 3 mutations sont retrouvées chez un patient avec une LEMP en progression tandis qu'une seule est observée chez un patient avec une LEMP stabilisée. Des mutations dans les boucles de la protéine VP1 du JC virus sont corrélées avec une progression de la LEMP (Zheng *et al.*, 2005).

IV. La réponse humorale dirigée contre le BKPyV

La réponse immunitaire contre le BKPyV associe comme pour toutes les infections virales une médiation cellulaire avec une réponse humorale.

IV.1. Etude de la réponse humorale chez les polyomavirus : le modèle du MPyV

L'immunité a été étudiée chez un autre polyomavirus infectant les souris le MPyV formant des tumeurs chez celles-ci (Swanson *et al.*, 2009). Le MPyV n'est pas pathogène chez les souris adultes immunocompétentes. Les tumeurs peuvent être observées chez les souris immunodéficientes (SCID, déplétions cellules T ou délétions en molécule HLA) ce qui a permis de montrer le rôle de l'immunité médiée par les lymphocytes T sur le contrôle du développement des tumeurs induites par le MPyV. Ainsi lors d'une infection par le MPyV des souris, il y a tout d'abord mise en jeu d'une réponse anticorps T indépendante suivie d'une réponse cellulaire associant les lymphocytes T CD4 et T CD8 puis une réaction humorale T dépendante avec formation également de cellules B mémoires.

La réponse humorale ne semble pas être au 1^{er} plan de la réponse immunitaire. Un fort taux d'Ac neutralisants est retrouvé chez les souris qu'elles soient susceptibles ou non aux tumeurs. La réponse humorale est présente chez toutes les souris. Par contre, des études montrent que des souris nées de mères immunisées pour le MPyV sont résistantes au développement de tumeurs par le MPyV grâce au rôle protecteur des Ig maternelles. Une immunisation passive avec du sérum prévient également la formation de tumeurs si l'injection des Ig est réalisée avant l'infection par le MPyV. Par contre, si les Ac sont donnés dans un second temps, soit quelques jours après l'inoculation, ils ne protègent pas des infections. En plus de leur action protectrice, les Ac neutralisants permettent de diminuer les charges virales lors d'une infection.

Chez les souris immunocompétentes après l'infection par le MPyV, il y a apparition des IgM en 4 jours puis diminution de ces IgM et apparition des IgG en 7 jours avec un pic à 21-28 jours. Les IgM ne sont pas spécifiques, ni neutralisantes contre le MPyV. Les lymphocytes B contribuent à baisser la charge virale en association avec les cellules T. Chez des souris déficientes en cellules B, la charge virale est beaucoup plus élevée. Une réponse Ac est retrouvée chez les souris déficientes en cellules T, ainsi ces cellules T peuvent être absentes lors de la phase aiguë. Par contre les souris déficientes en cellules T et B (SCID) meurent au bout de quelques semaines de leur infection au MPyV. La supplémentation en cellules B naïves chez les souris SCID permet une survie de toutes les souris et des charges virales plus

faibles. Ceci confirme que la réponse B même en l'absence de cellules T protège du MPyV (production d'IgG et IgM T indépendante). Mais le titre d'Ac est plus faible que chez les souris sauvages (seulement 10% du titre des souris sauvages). Il semble donc qu'il y ait une réponse Ac T indépendante faible, avant une réponse T dépendante par les cellules B. Cependant, ces données concernent le MPyV mais ne sont pas forcément extrapolables pour le BKPyV.

IV.2. La réponse humorale lors des infections à BKPyV

a. Les techniques d'étude de la réponse anticorps

Les Ac spécifiques du BKPyV peuvent être mesurés par différentes méthodes. L'inhibition de l'hémagglutination (HIA = Hemagglutination inhibition assays) ou la méthode ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) qui utilise des VLP (Virus like particule) sont le plus souvent choisies. Les méthodes neutralisantes sont spécifiques des Ac neutralisants anti- BKPyV.

Knowles *et coll.* utilisent l'HIA pour mesurer le titre d'Ac anti BKPyV chez des sujets sains. La séroprévalence retrouvée est d'environ 81% avec une diminution chez les personnes les plus âgées. Egli *et coll.* comme vu précédemment obtiennent une séroprévalence de 82% avec également une baisse des Ac chez les personnes les plus âgées (Knowles *et al.*, 2003, Egli *et al.*, 2009).

Leuenberger *et coll.* comparent le titre d'Ac dirigés contre différentes protéines du BKPyV (Ag T, VP1 et agnoprotéine). La séropositivité des Ac est de 63% contre VP1, 41% contre Ag T et 15% contre l'agnoprotéine. Le titre d'Ac est équivalent entre les personnes saines et les patients greffés de rein sans répllication virale (séropositivité des Ac contre VP1 est de 80%, contre l'Ag T 63% et contre l'agnoprotéine 8%) (Leuenberger *et al.*, 2007).

b. La réponse humorale anti-BKPyV en transplantation rénale

Le rôle de la sérologie BKPyV dans la transplantation rénale pour évaluer le risque d'infection est controversé.

Bohl *et coll.* ont étudié les statuts des donneurs et receveur de reins et les ont classés en différents groupes selon leur séropositivité pour le BKPyV 48% de D+R+ (D pour donneur et R pour receveur + pour séropositif, - pour séronégatif), 19.6% D+R-, 18% D-R+ et 13.6% D-R-. Ils retrouvent une association significative avec le risque d'infection à BKPyV seulement

chez les donneurs séropositifs. La virurie dans la 1^{ère} année post greffe est corrélée avec le titre d'Ac anti VLP BKPyV du donneur. Ainsi, plus le titre d'Ac du donneur est élevé, plus il y a de risque de développer une virurie. Une virémie en post greffe n'a été retrouvée que quand le donneur était séropositif, quand le donneur était séronégatif aucune virémie persistante n'était décrite. Il semble bien que la séropositivité du donneur soit un facteur de risque de PyVAN. Un donneur séropositif pour le BKPyV donne ses deux reins, les deux receveurs sont infectés par le BKPyV. Les séquences du BKPyV retrouvé chez les receveurs sont étudiées et elles correspondent entre elles confirmant la provenance de l'infection. Plus récemment, l'équipe de Wunderink a étudié de façon rétrospective une cohorte de greffés rénaux. A la différence du taux d'IgG du receveur en pré greffe, le titre d'IgG anti BKPyV du donneur était corrélé avec la virémie retrouvée chez le receveur et avec le développement de PyVAN, (Bohl *et al.*, 2005, Prosser *et al.*, 2006, Wunderink *et al.*, 2017).

Dans la cohorte de Bohl, les patients ne présentaient pas de PyVAN. L'étude de Hariharan *et coll.* est intéressante car ils s'intéressent aux patients atteints de PyVAN. Ils séparent les patients en différents groupes : diagnostic de PyVAN (précoce ou tardive) avec une fonction rénale qui se dégrade une virémie augmentée avant baisse de l'immunosuppression, PyVAN stabilisée, la fonction rénale est stable, la virémie baisse d'au moins 80% après baisse des immunosuppresseurs et PyVAN résolue, stabilisation de la fonction rénale, virémie non détectable ou très faible après diminution des immunosuppresseurs. Lors du diagnostic la virémie est élevée le titre d'IgG est bas ainsi que le titre d'IgM. Lors de la stabilisation, le titre d'IgM augmente tandis que la virémie commence à diminuer. Et dans le groupe de patients avec PyVAN résolue, le titre d'IgG est très élevé celui d'IgM a baissé et la virémie est faible ou indétectable. Ainsi, il semblerait que l'augmentation des IgG soit corrélée avec la baisse de la virémie. De plus ils ont réalisé un suivi longitudinal de quelques patients, chez ces patients, le titre d'IgG augmente entre le moment du diagnostic et la résolution de la PyVAN. Ceci indique une action neutralisante des Ac entraînant une diminution de la charge virale (Hariharan *et al.*, 2005).

Cependant les équipes de Comoli, Leuenberger et Chen, montrent que les Ig Anti BKPyV ont déjà un taux qui augmente lors de l'augmentation de la virémie indiquant que l'action des Ac n'est pas suffisante pour prévenir la virémie ou la PyVAN. Ceci est confirmé plus récemment par Ginevri *et coll.*, les Ac semblent être le reflet de l'histoire actuelle ou récente d'exposition à l'Ag (Comoli *et al.*, 2008, Leuenberger *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2006, Ginevri *et al.*, 2007).

D'après Bohl *et coll.*, le taux d'Ac augmente avec l'intensité de l'infection en post greffe, la séropositivité pré greffe ne protège pas contre une virémie soutenue et la réponse Ac n'est pas associée avec la clairance de l'infection. Il mesure par ELISA les IgG spécifiques du BKPyV. En pré greffe, le taux d'IgG mesuré était plus faible chez les patients qui présenteront en post greffe une virémie par rapport à ceux qui développent seulement une virurie sans virémie. En post greffe tous les patients présentent une augmentation de leur titre d'IgG. On observe une faible augmentation du taux d'IgG chez les patients présentant uniquement une virurie alors que ceux présentant une virémie ont dans un 1er temps une faible augmentation de leur taux d'IgG (correspondant à la phase de virurie) puis plus fortement quand la virémie apparaît. Ces Ac persistent que la virémie soit transitoire ou soutenue. Ainsi l'augmentation du taux d'Ac est corrélé avec l'intensité de l'infection : par rapport au titre d'Ac en pré greffe, le taux d'Ac est 7 fois plus élevé lors d'une virurie transitoire, 200 fois plus élevée dans le cas de la virurie soutenue, 13000 fois plus élevée chez le patient avec une virémie transitoire et 150000 fois plus élevée lorsque la virémie est soutenue. Lors de cette étude le suivi a été réalisé sur un an, malgré l'augmentation des Ac, des patients présentaient toujours une virurie mais la virémie se négativait chez 96% des patient virémiques. La protection apportée par la réponse humorale semble être incomplète (Bohl *et al.*, 2008).

Les autres isotypes d'immunoglobuline ont été étudié par Randhawa. Chez les donneurs et receveurs, la séropositivité IgG était de 80%, IgA de 20% et IgM de 0%. Les patients avec une charge virale BKPyV positive présentent un titre d'IgA plus élevé que les patients ne répliquant pas le virus. Ceci est peut-être en lien avec la notion d'exposition au niveau des muqueuse (tractus urinaire) (Randhawa *et al.*, 2006).

c. Interactions entre le virus et les Ac dans le contexte du JCPyV et du SV40.

Une étude récente sur le JCPyV montre qu'il peut échapper à l'action neutralisante d'Ac. Les patients immunodéprimés avec une LEMP présentent un virus avec des mutations au niveau des boucles externes de VP1. L'action neutralisante de plasma de patients atteints de LEMP est étudiée. Le plasma de ces patients neutralise les JCPyV sauvages mais pas les mutants. Ceci contraste avec l'action neutralisante des Ac chez les patients sains puisque le plasma neutralise aussi bien le virus sauvage que les virus mutés. L'immunodépression semble donc diminuer la capacité de neutraliser les virus ayant évolué. Dans la même publication est rapporté un cas clinique d'une femme avec une LEMP et présentant un taux faible de lymphocytes T CD4 qui est vaccinée par des VLP du JCPyV. Cette vaccination

augmente le titre d'Ac neutralisant, et ces Ac sont capables de neutraliser son virus muté (Ray *et al.*, 2017).

Jelcic *et coll.* confirment l'étude de Ray. Après reconstitution immune chez des patients atteints de LEMP, leur titre d'Ac augmente et ces Ac peuvent reconnaître des variants du JCPyV. Cette augmentation des Ac est accrue chez des patients présentant un syndrome de reconstitution immune. Ils émettent l'idée que les Ac produits à partir de lymphocytes B mémoires de patients guéris de leur infection au JCPyV sont capables de neutraliser les JCPyV aussi bien sauvages que mutés (Jelcic *et al.*, 2017).

En conclusion, le développement de stratégies vaccinales permettant de générer une réponse neutralisante, ou l'injection d'Ac neutralisants, pourraient être des thérapeutiques intéressantes pour la prévention des infections sévères à JCPyV ou BKPyV.

Murata *et coll.* ont identifié un épitope reconnu par les Ac neutralisants du SV40. Des Ac possédant une activité neutralisante vis-à-vis du SV40 ont été rapportés (Babé *et al.* 1989), mais ces Ac ne réagissent pas avec la protéine VP1 dénaturée ce qui suggère que ces Ac sont dirigés contre un épitope conformationnel. Ils peuvent être formés par des acides aminés proches de par la conformation spatiale mais éloignés dans la structure primaire de la protéine. Ainsi, Murata *et coll.* a sélectionné et séquencé des virus SV40 mutants échappant aux Ac neutralisants. Des mutations sont observées dans les boucles BC et EF (K73E, D77E, K171R et Q175H). Ces résidus sont proches dans la structure tertiaire de la protéine, suggérant leur participation à la reconnaissance antigénique par l'Ac neutralisant (Murata *et al.*, 2008).

d. Les immunoglobulines humaines – Activité neutralisante

Dans une étude de l'équipe de Randhawa, l'activité neutralisante contre le BKPyV et le MPyV des IgIV humaines comme le Gammagard® sont étudiées (Randhawa *et al.*, 2010). Lors d'une co incubation du BKPyV et des IgIV pendant 2h sur des cellules, ils observent une inhibition de plus de 90% de l'ADN du BKPyV après 7 jours de culture. L'effet thérapeutique est abaissé si les IgIV sont ajoutées 2 heures après le BKPyV (26-46%) ou si le BKPyV est mis 2h après les IgIV (41-49%). L'effet inhibiteur nécessite la pré incubation des IgIV avec le BKPyV d'où un effet direct de l'IgIV neutralisante sur le BKPyV mais pas sur l'infection en elle-même. La préparation des Ig IV se fait à partir d'Ig de patients sains. La présence de ces Ac anti BKPyV est cohérente avec l'ubiquité du virus et sa forte prévalence dans la population générale. Il semblerait que ces Ac puissent protéger les individus sains des

réactivations et infections. Par contre, aucune inhibition de l'ADN du MPyV n'est retrouvée après utilisation des IgIV ce qui semble logique puisque le MPyV n'infecte pas les hommes, les patients ne synthétisent donc pas d'Ig anti MPyV, on ne peut pas les retrouver dans les IgIV.

D'autres actions liées aux Ac autres que la neutralisation peuvent être possible : encombrement stérique empêchant le virus de se fixer sur son Rc cellulaire, cytotoxicité dépendante du complément, agglutination virale, phagocytose facilitée par les Ac...

DONNEES PRELIMINAIRES – OBJECTIFS DE L’ETUDE :

I. Description de la cohorte prospective

L’étude d’une cohorte de patient au CHU de Nantes a permis de suivre la réactivation du BKPyV chez ces patients et de différencier plusieurs groupes de patients. Certains de ces patients seront de nouveau étudiés dans notre étude.

La cohorte est constituée de 160 patients greffés de rein du service de Néphrologie-Immunologie du CHU de Nantes suivis entre Octobre 2010 et Juillet 2013. Le traitement immunosuppresseur était l’association de tacrolimus et de mycophénolate mofétil. 160 patients ont ainsi été suivis pendant au moins 12 mois suivant leur greffe. Le sang et les urines de ces patients ont été recueillis à différents temps 1, 2, 3, 6, 9 et 12 mois (Bressollette-Bodin *et al.*, 2005). Ils sont intéressants car plusieurs données sont disponibles : leurs charges virales BKPyV dans le sang et les urines ainsi que le taux d’Ac totaux et neutralisants à certains temps (0, 3 et/ou 6mois)

Cette cohorte est subdivisée en 3 sous-groupes selon que les prélèvements sont positifs pour le BKPyV dans les urines et le sang (Figure 19).

Groupe 1 : pas de PCR BKPyV positive dans le sang ni les urines, virurie et virémie négatives.

Groupe 2 : présence d’une virurie positive mais virémie négative ou faible ($<10^3$ cp/mL).

Groupe 3 : présence d’une virurie et d’une virémie positives.

Seuls les groupes 2 et 3 seront étudiés, ils présentent une répllication du BKPyV.

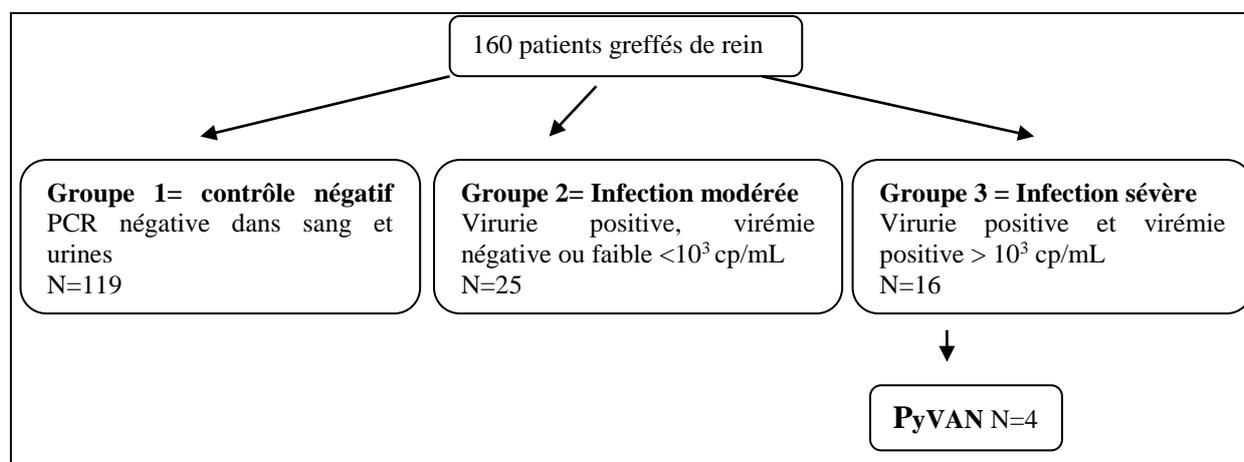


Figure 19 - Répartition de la cohorte de patients greffés rénaux inclus dans la cohorte au CHU de Nantes entre octobre 2010 et juillet 2013.

L'épidémiologie chez ces patients est cohérente avec ce qui est retrouvé dans les études (Figure 20). Le génotype majoritairement retrouvé est le génotype I et parmi ces BKPyV de génotype I, le sous type prédominant est le Ib-2.

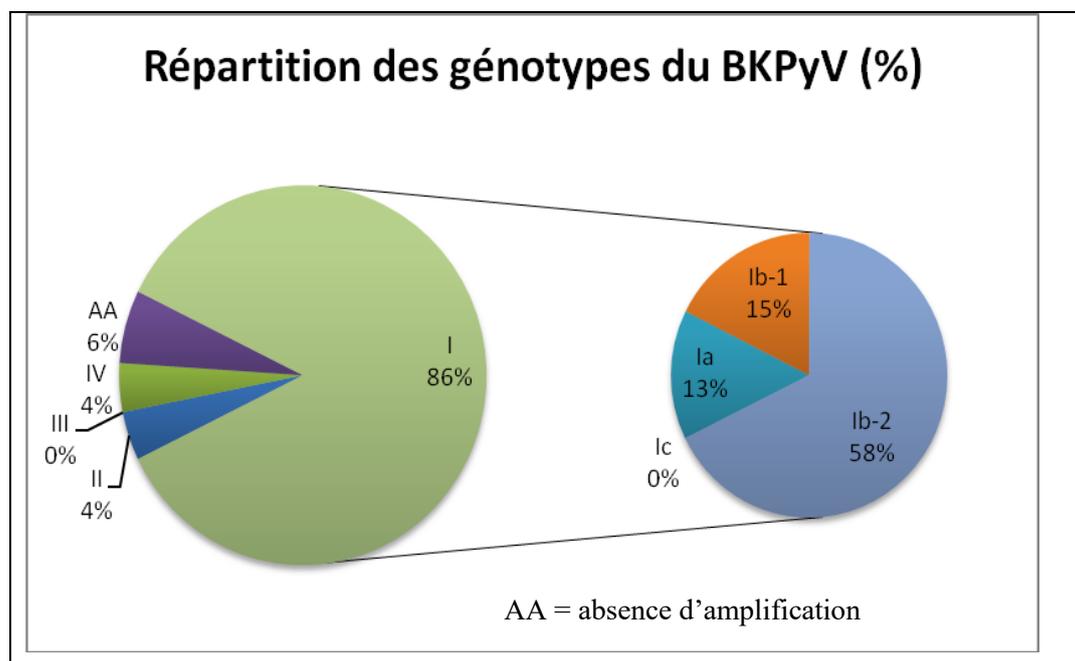


Figure 20 - Répartition des génotypes du BKPyV chez les patients de la cohorte.

II. Réponse humorale anti-BKPyV dans la cohorte

Le titre d'Ac anti BKPyV a été mesuré par technique ELISA avec des VLP BKPyV. Les titres d'Ac sont représentés sur la Figure 21 (collaboration Antoine Touze, Tours).

Chez les patients ne présentant pas d'infection à BKPyV, le titre d'Ac totaux reste stable en post greffe. Chez les patients présentant une virurie, une augmentation modérée du titre d'Ac est observée, cette augmentation est majorée chez les patients présentant une virémie.

Cependant le suivi des charges virales urinaires et sanguines montre que certains patients présentent une virémie persistante malgré l'augmentation de leur taux d'Ac et une prise en charge classique de leur infection (baisse de l'immunosuppression).

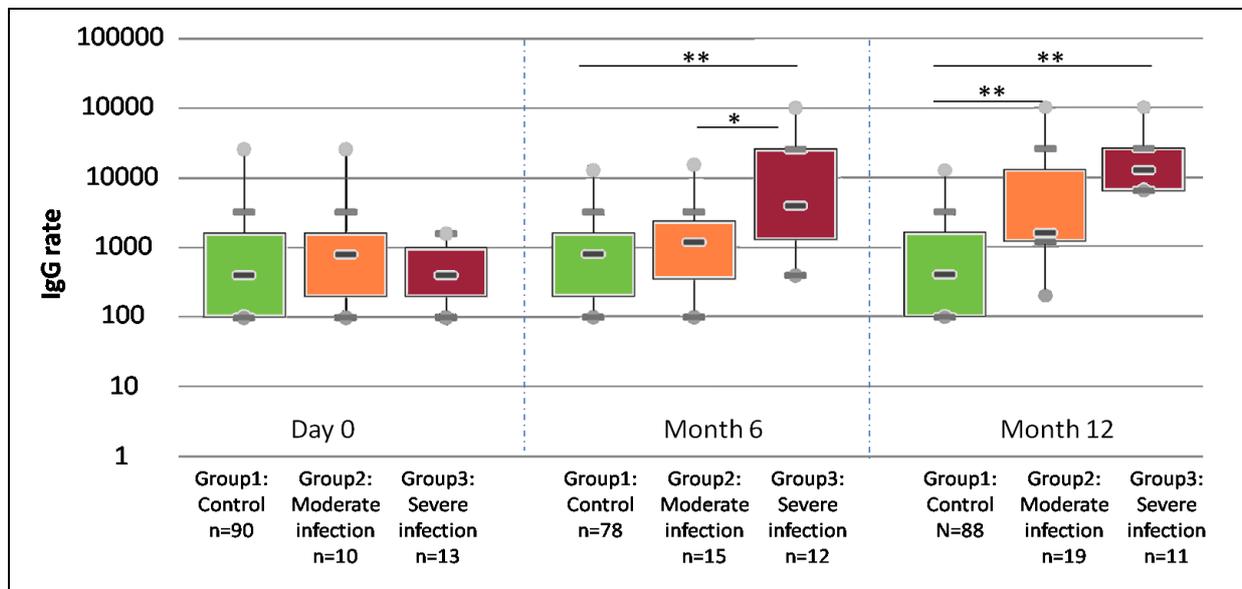


Figure 21- Dosage des taux d'Ac anti BKPyV par technique ELISA avec BKPyV VLP.

Sont représentés en vert le titre moyen d'Ac des patients du groupe contrôle ne présentant pas d'infection par le BKPyV pas de virurie ni de virémie, en orange le groupe infection modérée patients présentant une virurie mais pas de virémie et en rouge le groupe infection sévère patients avec une virémie soutenue. Les dosages d'Ac sont réalisés à M0, M6 et M12 post greffe chez les patients de la cohorte. (Antoine Touze, Tours)

III. Objectifs

L'hypothèse est que chez ces patients, le virus échappe à la réponse humorale. Il a été montré précédemment que les Ac ciblent la protéine VP1 du BKPyV et plus particulièrement la boucle BC.

L'objectif de cette étude était ainsi de montrer une corrélation éventuelle entre l'échappement à la réponse humorale du patient avec persistance de la virémie et l'apparition de mutations sur la région TR située sur la boucle BC de VP1 impliquée dans la liaison aux Ac.

Nous avons donc l'évolution du virus dans le temps et rechercher l'apparition de mutations au niveau des acides aminés 61 à 83 de VP1, qui pourraient expliquer un défaut de reconnaissance de la part de l'Ac.

Pour cela, la région TR du BKPyV a été séquencée à différents temps post greffe chez des patients présentant une virurie et/ou une virémie certains éliminant l'infection et d'autres non.

MATERIEL ET METHODES

I. Echantillons biologiques

Les échantillons étudiés sont de deux sortes : les urines et le sang de patients greffés de rein au CHU de Nantes. Ces patients ont été sélectionnés en fonction de leur suivi virologique post greffe. Certains sont issus d'une cohorte prospective présentée précédemment, d'autres sont des patients greffés de rein au CHU qui présentent un suivi virologique intéressant. Leur suivi virologique est réalisé sur au moins un an avec détermination de la charge virale urinaire et sanguine en parallèle. Les patients sélectionnés sont des patients présentant une virurie ou une virurie et une virémie prolongée dans le temps (virémie $> 10^3$ cp/mL sur au moins deux prélèvements consécutifs).

Parmi les patients de la cohorte, 4 patients du groupe 2 sont sélectionnés, 7 parmi le groupe 3 et pour les patients hors cohorte 4 présentant une virurie et/ou une virémie non contrôlées malgré une prise en charge classique.

L'étude porte donc sur 15 patients greffés de rein au CHU de Nantes, 5 patients présentant une virurie prolongée mais pas de virémie ou une virémie faible ($< 10^3$ cp/mL) transitoire : BIMA, BLMA, DIMO, GRMI et LEGPH, et 10 patients présentant une virurie et une virémie persistante : BAFA, BAGA, BARO, BROYV, DAJE, EGFL, GRPI, JARO, PEAN et SEMI.

II. Extraction de l'ADN viral

Les urines sont diluées au 1/20ème dans du PBS. Puis l'extraction de l'ADN du BKPyV est réalisée par extraction thermique. Pour cela, les urines diluées sont chauffées à 100°C pendant 8 minutes, puis centrifugées à 10000 tours /min pendant 5 min. Les extraits obtenus sont conservés à -20°C jusqu'à la réalisation de la PCR.

Les échantillons à virurie faible sont extraits par technique automatisée sur l'automate QIASYMPHONY® (QIAGEN®), avec le kit d'extraction commercialisé DSP Virus/Pathogen kit® (QIAGEN®).

Les extraits de sang utilisés sont obtenus par extraction sur l'automate d'extraction QIASymphony SP (QIAGEN®) avec le kit d'extraction commercialisé DNA Mini kit® (QIAGEN®). L'extraction consiste en plusieurs étapes. Tout d'abord il y a lyse par la protéinase K puis liaison des acides nucléiques (ADN) à des particules magnétiques. Ces

particules sont captées par un aimant. Plusieurs lavages successifs sont réalisés puis il y a une étape d'élution dans un tampon d'élution.

III. Amplification par PCR de la région VP1

La méthode de PCR utilisée ici a été mise au point précédemment au laboratoire de virologie du CHU de Nantes à partir des conditions décrites par T. Takasaka pour sérotyper les BKPyV (Takasaka *et al.*, 2004).

L'amplification du génome viral est réalisée en utilisant le kit Prémix SYBR® Ex Taq 2X Tli RNasesH Plus (Takara Bio Inc) et les amorces BK VPS1/VPS2.

Les amorces BK VPS1/VPS2 (S pour short amorce) synthétisées par Eurogentec (Seraing Belgique) permettent l'obtention d'un amplicon de 307 paires de bases correspondant à la région TR de VP1 (Tableau 4). Elles sont fournies lyophilisées et sont reconstituées à une concentration de 200µM puis conservées à -20°C. La localisation des amorces sur le gène VP1 est représentée ci-dessous (Tableau 5).

En pièce blanche, les mix sont préparés à partir du kit Prémix SYBR® Ex Taq 2X Tli RNasesH Plus (Takara Bio Inc) en mélangeant en proportions bien définies (Tableau 6) :

- Master mix comprenant le tampon, les dNTPs, le MgCL2 et la Taq polymérase
- Eau
- Amorces BKVPS1 et BKVPS2.

Tableau 4 - Présentation des amorces utilisées pour l'amplification par PCR

Nom de l'amorce	Séquence	Tm
BKVPS1 anti-sens (1630-1649 pb)	5' CAA-GTG-CCA-AAA-CTA-CTA-AT 3'	54 °C
BKVPS2 sens (1956-1937 pb)	5' TGC-ATG-AAG-GTT-AAG-CAT-GC 3'	58°C

Tableau 5 - Séquence du génome du BKPyV (NCBI Reference Sequence NC_001538.1).

1561	AAGATGGCCCCAACCAAAAGAAAAGGAGAGTGTCCAGGGGCAGCTCCCAAAAAGCCAAAG		GENE VP1
1621	GAACCCGTGCAAGTGCCAAAACACTACTAATAAAAGGAGGAGTAGAAGTTCTAGAAGTTAAA	BKVPS1	
1681	ACTGGGGTAGATGCTATTACAGAGGTAGAATGCTTCCTAAACCAGAAATGGGGATCCA		
1741	GATGAAAACCTTAGGGGCTTTAGTCTAAAGCTAAGTGCTGAAAATGACTTTAGCAGTGAT		
1801	AGCCCAGAGAGAAAATGCTTCCCTGTTACAGCACAGCAAGAATCCCCCTCCCAATTTA		
1861	AATGAGGACCTAACCTGTGGAATCTACTGATGTGGGAGGCTGTAAGTGTACAAACAGAG		
1921	GTTATTGGAATAACTAGCATGCTTAACCTTCATGCAGGGTCACAAAAGTGCATGAGCAT	BKVPS2	
1981	GGTGGAGGAAAACCTATTCAAGGCAGTAATTTCCACTTCTTTGCTGTAGGTGGAGAACC		
2041	TTGGAATGCAGGGAGTGCTAATGAATTACAGGTCAAAGTACCCTGATGGTACTATAACC		
2101	CCTAAAACCCAACAGCCAGTCCAGGTAATGAATACTGACCATAAGGCCTATTTGGAC		
2161	AAAAACAATGCTTATCCAGTTGAGTGCTGGGTACCTGATCCCAGTAGAAAATGAAAATGCT		
2221	AGGTATTTTGGGACTTTCACAGGAGGGGAAAATGTTCCCCAGTACTTCATGTGACCAAC		
2281	ACAGCTACCACAGTGTGTGCTAGATGAACAGGGTGTGGGCCTCTTTGTAAAGCTGATAGC		
2341	CTGTATGTTTCAGCTGCTGATATTTGTGGCCTGTTTACTAACAGCTCTGGAACACAACAG		
2401	TGGAGAGGCCCTTGCAAGATATTTTAAGATCCGCCTGAGAAAAGATCTGTAAGAATCCT		
2461	TACCCAATTTCTCTTTTGTCTAAGTGACCTTATAAACAGGAGAACCCAGAGAGTGGATGGG		
2521	CAGCCTATGTATGGTATGGAATCCCAGGTAGAAGAGGTTAGGGTGTGTTGATGGCACAGAA		
2581	AGACTTCCAGGGGACCCAGATATGATAAGATATATTGACAAAACAGGGACAATTGCAAACC		
2641	AAAATGCTTTAAACAGGTGCTTTTATTGTACATATACATTTAATAAATGCTGCTTTTGTA		

Le gène VP1 est représenté en vert, la localisation des amorces sont représentées surlignées en jaune.

Tableau 6 - Mélanges réactionnels pour l'amplification de la région TR de VP1

	Concentration initiale	Volume pour 1 tube (µL)	Concentration finale
Master mix (tampon, dNTP, MgCL2, Taq)	2X	12.5	1X
Eau		6.25	
Amorce BKVPS1	20 µM	0.625	0.5 µM
Amorce BKVPS2	20 µM	0.625	0.5 µM

Puis 20µL de mix sont distribués par tube, auxquels sont ajoutés 5 µL d'urine ou de sang extrait.

La PCR est réalisée sur le thermocycleur PTC 100 (Figure 22) selon les conditions suivantes :

95°C pendant 5 min	} 40 cycles
94°C pendant 30 sec	
54°C pendant 30 sec	
72°C pendant 1 min	
4°C	



Figure 22 - L'automate PTC 100

Il est utilisé pour les étapes de PCR, purification des produits de PCR et séquençage (Programmable Thermal Controller, de MJ Research Inc.).

La vérification de l'amplification est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 9%. Pour préparer un gel de 14 puits, il faut mélanger dans l'ordre :

- 10mL d'acrylamide Bisacrylamide 9%
- 100 μ L de Persulfate d'ammonium 10%
- 10 μ L de TEMED

Le mélange est homogénéisé par retournements puis les gels sont coulés immédiatement. Environ 15 minutes sont nécessaires pour la polymérisation.

Dans un puits, sont déposés 2 μ L de marqueur de taille n° V (8-587 pb) Roche Diagnostic qui permet d'identifier la bande correspondant à la région d'intérêt amplifiée (307 pb). Dans les autres puits en parallèle, sont déposés 3 μ L de produit de PCR ou de témoin négatif mélangés à 2 μ L de tampon de chargement (bleu de bromophénol). La migration s'effectue dans du tampon TBE 1X à 180 volts pendant 30 minutes. Après la migration, le gel est placé dans un bain de BET (bromure d'éthidium) un agent intercalant pendant 15 min. Les bandes sont ensuite révélées par les ultra-violet. La réaction d'amplification est réussie s'il y a une bande correspondant à 307 pb et aucune bande au niveau du témoin négatif (Figure 23).

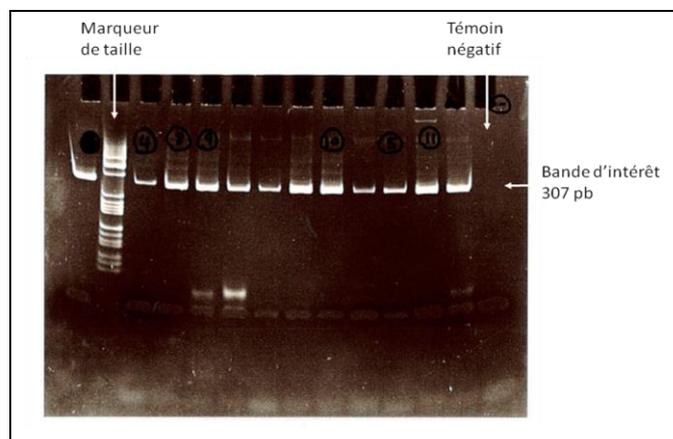


Figure 23 - Exemple de gel de polyacrylamide

Ce gel permet de confirmer l'obtention d'une séquence d'intérêt de 307 pb avec le marqueur de taille, un témoin négatif et des échantillons amplifiés.

IV. Séquençage du produit d'amplification VP1

IV.1. Purification des produits de PCR

L'élimination des amorces et dNTPs en excès provenant de la PCR est nécessaire car lors du séquençage, les amorces sont utilisées seules de façon indépendantes, il ne faut pas qu'il reste de trace des amorces utilisées précédemment. Les produits de PCR sont purifiés enzymatiquement.

Sur la glace, 1 μ L d'Exostar (GE, Healthcare) est mélangé avec 5 μ L de produit de PCR obtenu. Ce mélange est centrifugé 30 sec à 3500 rpm. L'Exostar est constituée de 2 enzymes l'Exonucléase 1 qui permet l'élimination des amorces et l'Alcaline phosphatase qui inactive les dNTPs résiduels. La purification est effectuée sur l'automate PTC 100 et comprend 2 étapes : 15 min à 37°C pour activer les deux enzymes puis 15 min à 80°C pour les inactiver. Les produits ainsi purifiés sont dilués avec de l'eau ppi, le volume d'eau est ajusté en fonction de l'intensité de la bande obtenue sur le gel. Plus l'intensité est forte, plus le produit est dilué.

IV.2. Réaction de séquence

Le séquençage bidirectionnel est réalisé selon la technique de Sanger sur l'ABI Prism 3130®. Le séquençage est une succession de cycles de 3 étapes. Tout d'abord, l'ADN double brin est dénaturé puis l'amorce sens ou anti sens s'hybride sur l'ADN simple brin. S'en suit 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. Un dNTP ne peut pas s'incorporer à la suite d'un ddNTP car aucune liaison n'est possible sans le radical OH en 3'. Ainsi, la synthèse du brin d'ADN s'arrête à la suite de l'incorporation du 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).

Pour chaque échantillon 2 puits sont nécessaires : un puits avec l'amorce sens BKVPS1 et un autre puits contenant l'amorce anti sens BKVPS2. Sur la glace, 2 μ L d'amorce sont mélangés à 5 μ L du produit de PCR dilué par puits. 3 μ L de Big Dye Terminator™ dilué au 1/3 dans du tampon 5X y sont ajoutés. Le Big Dye Terminator™ est un terminateur de chaîne, composé de dNTPs, ddNTPs, tampon, magnésium et de la Taq polymérase. Le mélange est centrifugé 30 sec à 3500 rpm. La réaction de séquence est lancée sur le PTC-100, un cycle correspondant à 15 sec à 96°C suivis de 5 sec à 50°C puis 2 min à 60°C. 25 cycles sont nécessaires.

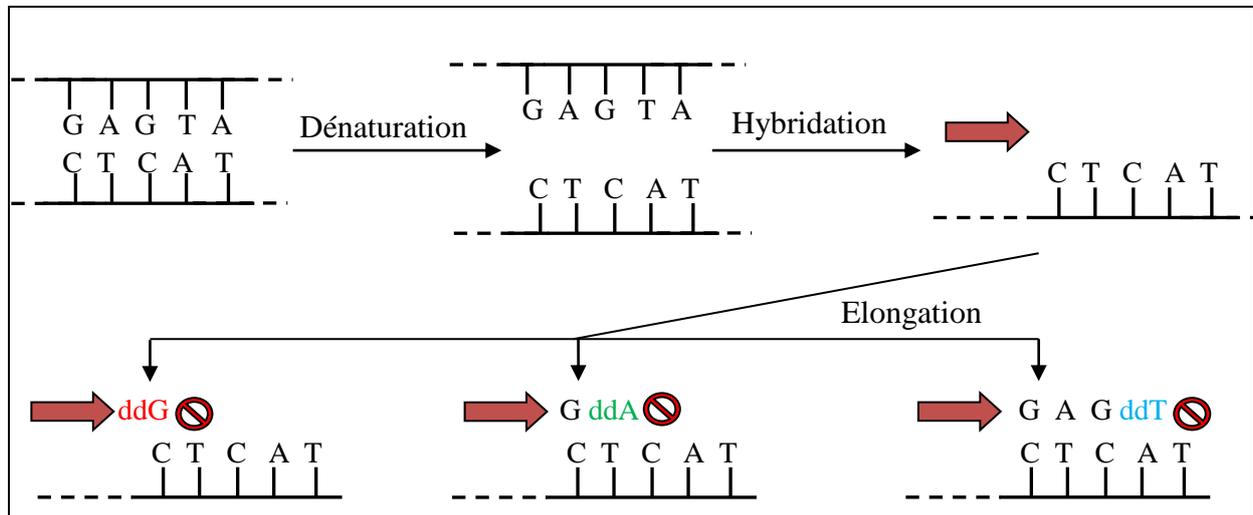


Figure 24 - Schématisation du séquençage : principe de la méthode de Sanger

IV.3. Filtration / purification des produits de séquence

Une colonne de filtration est créée dans une plaque de filtration Millipore à l'aide de billes G50 (50g de billes dans 1L d'eau extra pure) qui constituent une résine. Pour cela, 300µL de G50 homogénéisé sont déposés par puits. Puis la plaque est centrifugée à 2000 tr/min pendant 1min 30 à 4°C. Le filtrat obtenu est éliminé. 300 µL de G50 sont de nouveau déposés dans les puits et une deuxième centrifugation est réalisée à 2000 tours pendant 3min 30 à 4°C. Le filtrat est de nouveau éliminé. La colonne de filtration est alors prête à être utilisée.

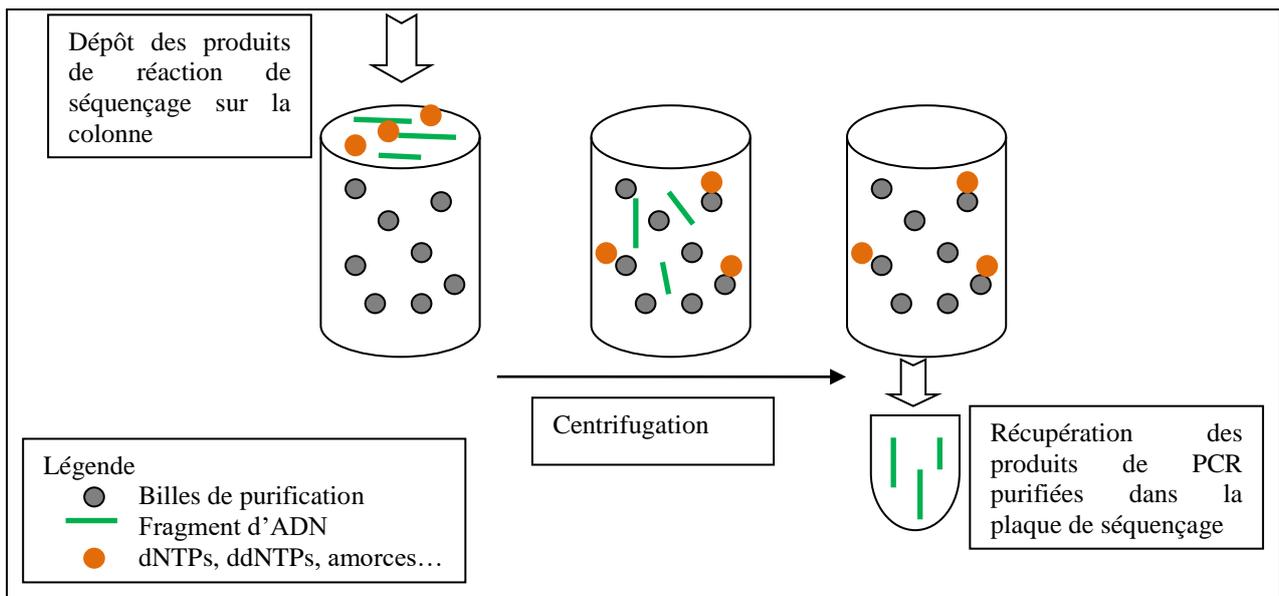


Figure 25 - Purification des fragments d'ADN à séquençer.

Dans la plaque de séquençage, 10µL de formamide HIDI (dénature les brins d'ADN) sont déposés par puits. Ensuite, dans la plaque de filtration la totalité des produits de PCR à séquencer est déposée puis la plaque de séquençage contenant le formamide HIDI est posée en dessous de la plaque de filtration pour recueillir l'ADN une fois filtrée. Après centrifugation (2000 tours 4 min 4 °C), les éléments non désirés (dNTPs, ddNTPs, amorces...) sont retenus par les billes tandis que les fragments d'ADN à séquencer (de taille plus importante) sortent plus rapidement de la colonne car ils contournent les billes comme illustré sur la Figure 25.

IV.4. Electrophorèse capillaire

Les fragments de différentes tailles obtenus lors du séquençage sont séparés par électrophorèse capillaire sur le Séquenceur ABI Prism 3130® (Figure 27) en fonction de leur taille (Figure 26). Chaque ddNTP utilisé est marqué d'un fluorochrome différent soit 4 fluorochromes correspondant aux 4 ddNTPs utilisés. Chaque fragment est identifié par le ddNTP marqué à son extrémité 3' grâce à la technique de fluorescence par transfert de résonance ou FRET. Ainsi, de par la présence des fragments de différentes tailles et l'identification du dernier nucléotide incorporé par le ddNTP marqué, la séquence entière de la région amplifiée peut être obtenue. La fluorescence est traduite en spectre d'émission. Un chromatogramme est ainsi formé, l'analyse des différents pics est réalisée sur le logiciel Seqscape®.

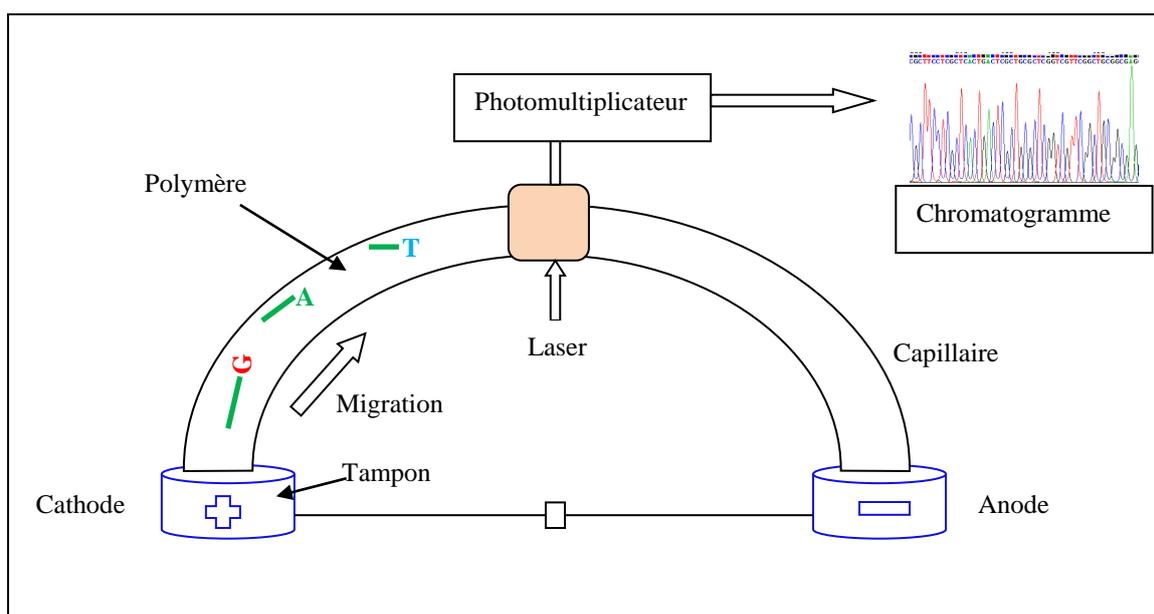


Figure 26 - Séquençage par électrophorèse capillaire.



Figure 27 - Le séquenceur ABI prism 3130® utilisé pour l'étape de séquençage capillaire

IV.5. Analyse des séquences

Les séquences sont importées à l'aide du logiciel Seqscape®.

Les séquences obtenues lors du séquençage sont alignées et comparées à des séquences de référence présentées ci-dessous grâce au logiciel Mega7® (Tableau 7 et Figure 28). Ces séquences permettent de déterminer le génotype du BKPyV et aussi d'étudier le polymorphisme des souches en vérifiant la présence ou non de mutations.

Tableau 7 - Référence des séquences des différents sous-types BKPyV (GenBank) utilisées pour l'alignement

Sous-type	N° de référence GenBank
Ia	V01109 (MM)
Ib-1	AB211369 (Dik)
Ib-2	AB263918 (FNL-12)
Ic	AB211377 (RYU-2)
II	AB263920 (GBR-12)
III	M23122 (AS)
IV	AB260033 (FIN-2)

RESULTATS

I. Suivi longitudinal de l'apparition des mutations dans VP1 chez les patients

I.1. Description globale des résultats

Le détail du suivi virologique de chaque patient est détaillé en annexe (cf. annexes). Pour chaque patient les échantillons urinaires séquencés ont été répertoriés en fonction du délai post greffe, de la charge virale urinaire et sanguine. Pour chaque échantillon l'obtention d'une séquence de VP1 et la présence ou non de mutations ont aussi été indiquées. Le séquençage de VP1 était réalisé à partir de la première virurie positive, puis tous les 3 mois chez chacun des patients sélectionnés.

La figure 29 ci-dessous résume les résultats obtenus chez les 15 patients étudiés. Au moins une mutation était retrouvée dans la séquence TR de VP1 chez 8/10 patients virémiques, mais chez un seul des 5 patients viruriques. Au cours du suivi longitudinal, les mutations étaient retrouvées soit dans une seule séquence, donc transitoires, tandis que d'autres persistaient.

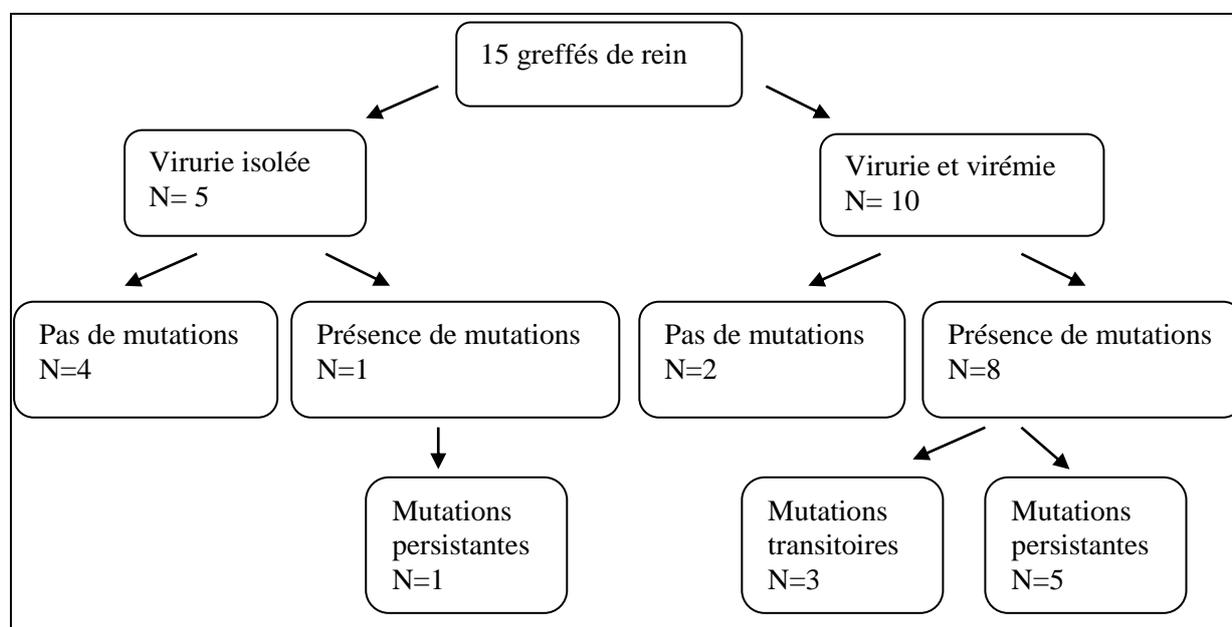


Figure 29 - Représentation schématique des patients étudiés selon leur charge virale urinaire et/ou sanguine et la présence ou non de mutations.

Le Tableau 8 représente les positions mutées pour chaque patient ainsi que la chronologie d'apparition des mutations dans les urines. Les mutations étaient toutes retrouvées entre les positions 60 et 82 de la séquence de VP1 en acides aminés. Elles concernaient les acides aminés en positions 60, 61, 68, 69, 72, 73, 75, 77, et 82. Les positions les plus fréquemment touchées sont : 69 (4 patients sur 9), 72 (5/9), 73 (7/9) et 77 (4/9).

Les mutations retrouvées chez les patients présentant des mutations transitoires sont sur les positions 60 (1/3), 64 (1/3), 69 (1/3), 73 (1/3), 75 (2/3), 77 (1/3).

Les mutations retrouvées chez les patients présentant des mutations persistantes sont sur les positions : 60 (2/6), 61 (1/6), 62 (1/6), 68 (2/6), 69 (3/6), 72 (5/6), 73 (6/6), 75 (1/6), 77 (3/6) et 82 (2/6). Chez ces patients les mutations persistantes (retrouvées sur plusieurs prélèvements) sont : 60 (2/6), 61 (1/6), 68 (2/6), 69 (2/6), 72 (3/6), 73 (5/6), 75 (1/6), 77 (2/6), 82 (2/6) tandis que celles qui sont transitoires sont 62 (1/6), 69 (1/6), 72 (2/6), 73 (1/6), 77 (1/6). Il n'y a que les mutations en positions 82 qui sont retrouvées uniquement en mutations persistantes.

Tableau 8 - Positions mutées et chronologie d'apparition des mutations d'acides aminés de la protéine VP1 (entre les positions 60 et 84)

Patients	Génotype	Mois post greffe	Positions des acides aminés mutés											
			60	61	62	64	68	69	72	73	75	77	82	
PEAN	Ib-1	2	D	E	N	R	L	K	A	E	D	S	E	
		6												
		12					V		A/V	A				
		19					V		V	A				
BAFA	Ib-2	2	D	E	N	R	L	K	A	E	D	S	E	
		4									D/H			
		5										R		
BAGA	Ib-2	9	D	E	N	R	L	K	A	E	D	S	E	
		17								E/Q				
		21								E/Q			E/Q	
		24							A/V	E/Q			E/Q	
		28						K/M	A/V	E/Q	D/N		E/Q	
		32							V	E/Q	D/N		Q	
BROYV	Ib-2	1 ^{ère} greffe	33	D	E	N	R	L	K	A	E	D	S	E
			35											
			51							A				
	2 ^{ème} greffe	1							E/A					
		7				V		V	A					
		12				V		V	A					
	18			N/H	V		V	A		S/I				
DAJE	Ib-2	3	D	E	N	R	L	K	A	E	D	S	E	
		5									D/N			
		7									D/N			
		10								E/Q				
EGFL	Ib-2	1	D	E	N	R	L	K	A	E	D	S	E	
		4												
		6	D/H			R/T		K/R						
GRPI	Ib-2	8	D	E	N	R	L	K	A	E	D	S	E	
		12												
		15								E/Q				
		20												
		32	H/N					N					Q	
		37	N					N/S	A/V				Q	
48	H					K/N					Q			
BIMA	IV	1	D	N	D	R	L	R	A	E	A	D/N	D	
		3										N		
		9								K		D		
		11								K		D		
		13							A/V	E/K		D/N		
SEMI	IV	1	D	S	D	R	L	R	A	E	A	D	D	
		3												
		6												
		12						R/K				D/N/H		
		16	D/Y					K		E/A		D/N		
		18	D/Y					K		E/A		D/N		
24						K		E/A		D/N				

Parmi les mutations observées dans ce travail, certaines modifient la charge au niveau de la capsid tandis que d'autres non. Le Tableau 9 résume les substitutions des acides aminés observées et la modification des charges.

Tableau 9 - Modification des charges des acides aminés substitués.

Substitution acide aminé	Charge
D60N	- / neutre
D60H	- / +
D60Y	- / neutre
N61S	neutre / neutre
L68V	neutre / neutre
R69K	+ / +
K69N	+ / neutre
A72V	neutre / neutre
E73E/Q	- / neutre
E73A	- / neutre
E73K	- / neutre
D75D/N	- / neutre
D75D/H	- / +
N77D	neutre / -
E82Q	- / neutre

I.2. Suivi longitudinal des patients

a. Patients ne présentant pas de mutations au cours du suivi

Chez certains patients, aucune mutation ponctuelle n'était détectée au cours du suivi. Ces patients étaient : BARO, BLMA, DIMO, GRMI, JARO, LEGPH (voir tableaux de suivi en annexe). Une augmentation d'au moins un log du titre des Ac neutralisant spécifiques du génotype identifié dans les urines était observée chez tous sauf un patient. Plusieurs d'entre eux ont présenté une virurie prolongée, avec une virémie transitoire ou faiblement positive. Parmi ces patients, une PyVAN à un stade B avait été diagnostiquée dès 3 mois chez BARO, régressive après modulation du traitement immunosuppresseur qui a permis la diminution de la virémie et de la virurie.

Par exemple : BLMA était une patiente de 27 ans au moment de la greffe. La virurie apparaissait à 6 mois après la greffe et se négativait à 12 mois post greffe. La charge virale maximale retrouvée dans les urines était de 7.4 log cp/mL. Une virémie faible et transitoire a été observée 258 jours après la greffe (Figure 30).

A 7 mois post greffe, aucune mutation n'a été retrouvée. Une augmentation du titre des Ac totaux et neutralisants était observée de façon concomitante à la négativation de la virémie et de la virurie.

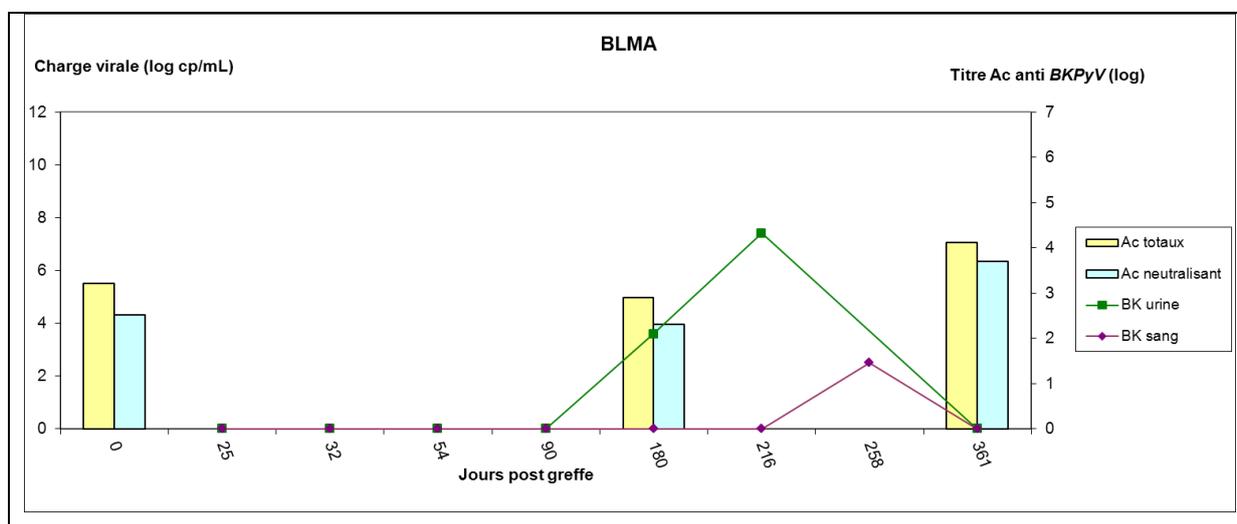


Figure 30 - Suivi immunovirologique du patient BLMA

b. Patients présentant une mutation au cours du suivi

Huit patients présentaient une ou plusieurs mutations d'apparition concomitante ou séquentielle, dans la région TR de VP1. Ces patients présentaient le plus souvent une virurie >7 log cp/ml persistante dans le temps et une virémie >4 log cp/ml, à l'exception d'un patient (BIMA). Une augmentation du titre d'Ac neutralisants de plus de 1 log était observée pour tous les patients pour lesquels les données étaient disponibles. Le délai d'apparition des mutations par rapport à la première virurie est très variable (de 1 mois à plus de 2 ans). Le suivi virologique et le titre des Ac sont représentés pour chacun de ces patients sous forme graphique dans les paragraphes suivants :

Patient n°1 BAFA

Patient infecté par un BKPyV de génotype Ib-2. Une virurie et une virémie apparaissent dès le 2^{ème} mois post transplantation. Les charges virales étaient maximales à ce moment avec une charge virale urinaire de 8,2 log cp/mL et une charge virale sanguine de 4,1 log cp/mL. Des mutations ont été retrouvées, en position 75 correspondant à une double population seulement présente lors du séquençage au 4^{ème} mois mais pas par la suite, puis une mutation en position 77 au 5^{ème} mois.

La virémie s'avérait négative au 5^{ème} mois puis la virurie lors 6^{ème} mois post greffe concordant avec une augmentation du titre d'Ac totaux et neutralisants (Figure 31).

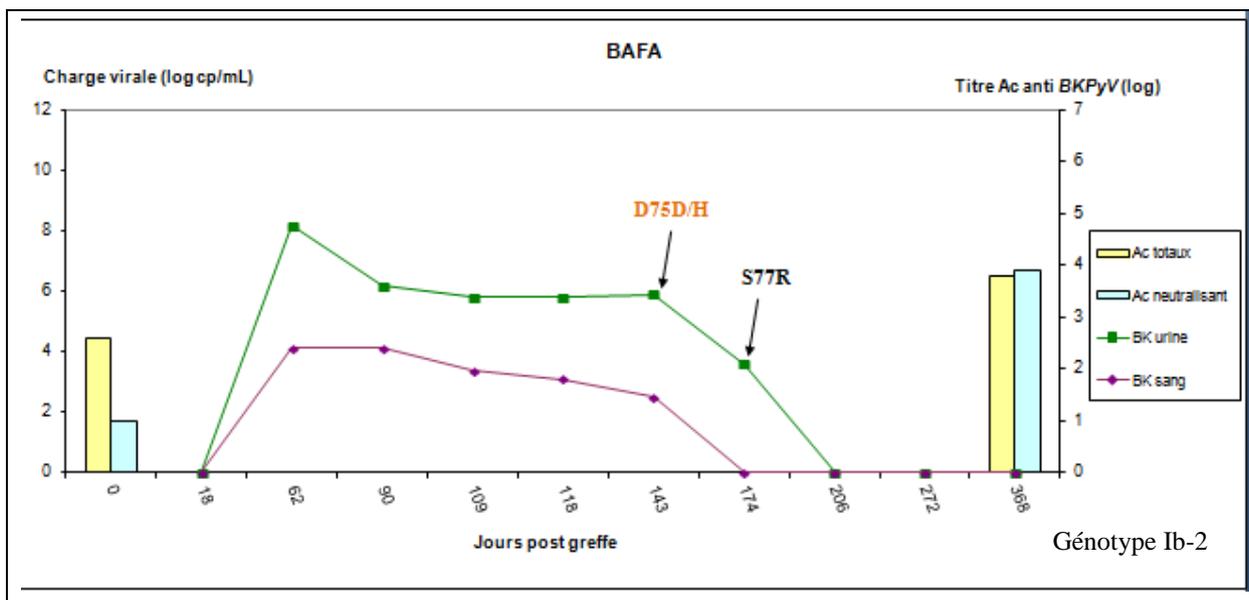


Figure 31- Suivi immunovirologique du patient BAFA.

Patient n°2 BAGA

Patient de 28 ans présentant une réactivation du BKPyV détectée pour la première fois à 8 mois post greffe et persistant pendant toute la durée du suivi (> 31 mois) associant une virurie comprise entre 8-10 log cp/mL et une virémie stable à 4 log cp/mL. Il n'y avait pas de clairance virale malgré une diminution du traitement immunosuppresseur. Le titre des Ac spécifiques augmentait en parallèle de la réactivation virale. Des mutations s'accumulaient progressivement dans la partie TR de VP1. Ainsi des mutations au niveau des positions 69, 72, 73, 75 et 82 étaient apparues (Figure 32).

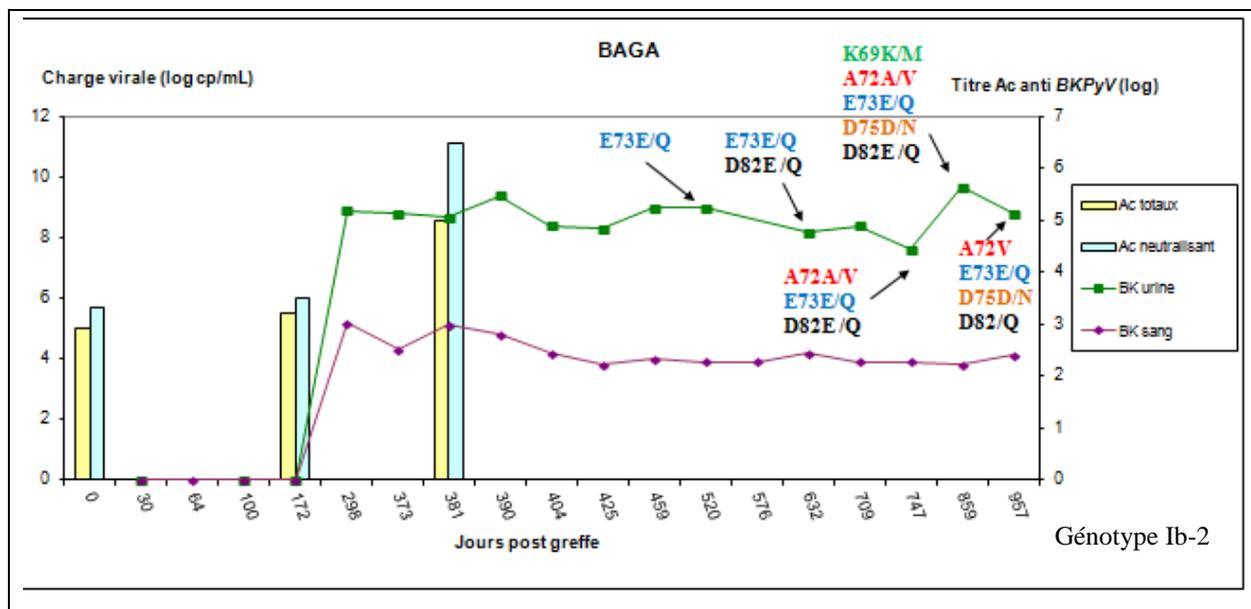


Figure 32 - Suivi immunovirologique du patient BAGA.

Patient n°3 BIMA

Patient ayant présenté une réactivation caractérisée par une virurie > 8 log cp/mL, prolongée, sans virémie. Cette virurie était présente dès le 1^{er} mois post greffe et persistait toute la durée du suivi. Chez ce patient, des mutations apparaissaient dans la région TR de VP1. Les positions touchées de façon persistante étaient : 73 et 77 (Figure 33). Il n'y avait pas de dosage des Ac neutralisants à 6 ni à 12 mois post greffe.

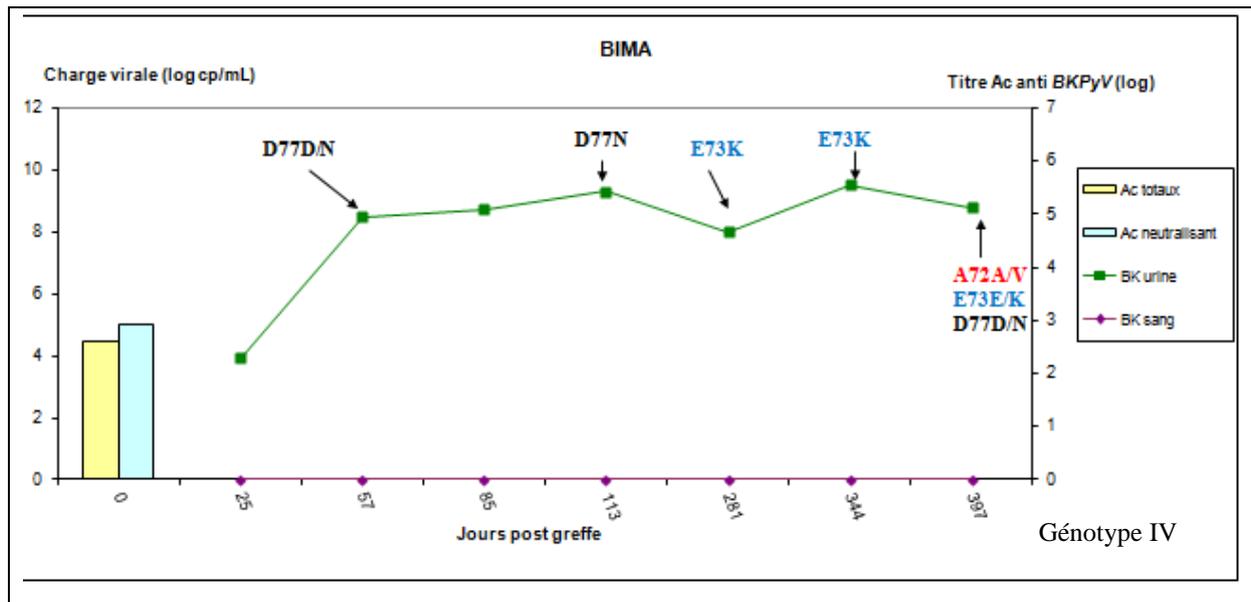


Figure 33 - Suivi immunovirologique du patient BIMA.

Patient n°4 BROYY

Infection tardive à BKPyV lors d'une première greffe, compliquée d'une PVAN (33^{ème} mois post-greffe) et ayant nécessité une transplantectomie (44^{ème} mois post greffe). Une première mutation était observée en position 73 sur un prélèvement obtenu après la transplantectomie. Une 2^{ème} greffe de rein a ensuite eu lieu. Une augmentation des charges virales urinaires et une virémie positive étaient détectées précocement après la 2^e greffe. Le virus séquencé lors du 1^{er} mois après cette 2^{ème} greffe présente une mutation sur la même position que le virus retrouvé lors de la 1^{ère} greffe. Puis de nouvelles mutations étaient détectées à 6 mois post greffe (Figure 34). Les mutations persistantes étaient situées sur les acides aminés 68, 72 et 73.

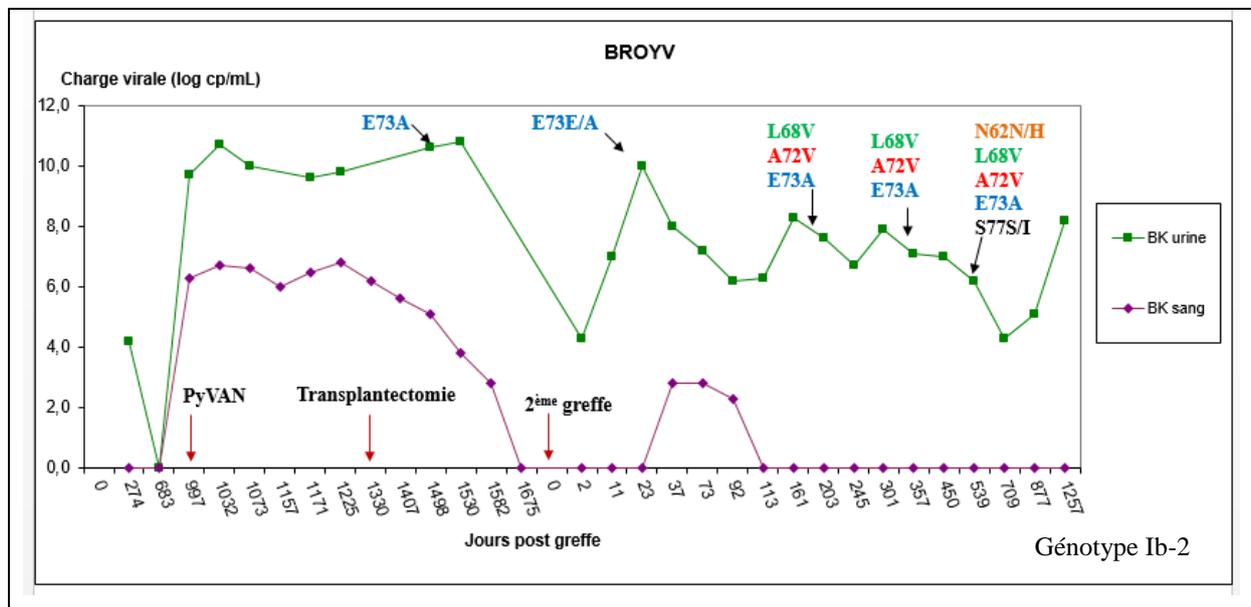


Figure 34 - Suivi immunovirologique du patient BROYY.

Patient n°5 DAJE

La virurie et la virémie apparaissaient simultanément au cours du 3^{ème} mois post greffe, pic de charges virales observé à 6 mois post-greffe puis diminution progressive jusqu'à négativation de la virémie à plus d'un an post greffe. Parallèlement, le titre d'Ac augmentait (Figure 35). Cette patiente présentait une PyVAN stade A sur la ponction de biopsie rénale réalisée à 6 mois post greffe au moment des charges virales maximales. Une régression de la PyVAN était observée sur la biopsie réalisée à 12 mois post greffe au moment où la virémie se négativait. Des mutations correspondant à des doubles populations au niveau des acides aminés 75 et 73 ont été retrouvées lors du séquençage mais elles n'étaient pas persistantes. La mutation en 75 n'était pas retrouvée lors du dernier séquençage au 10^{ème} mois post greffe, tandis que la mutation en 73 n'apparaissait qu'au moment de ce séquençage.

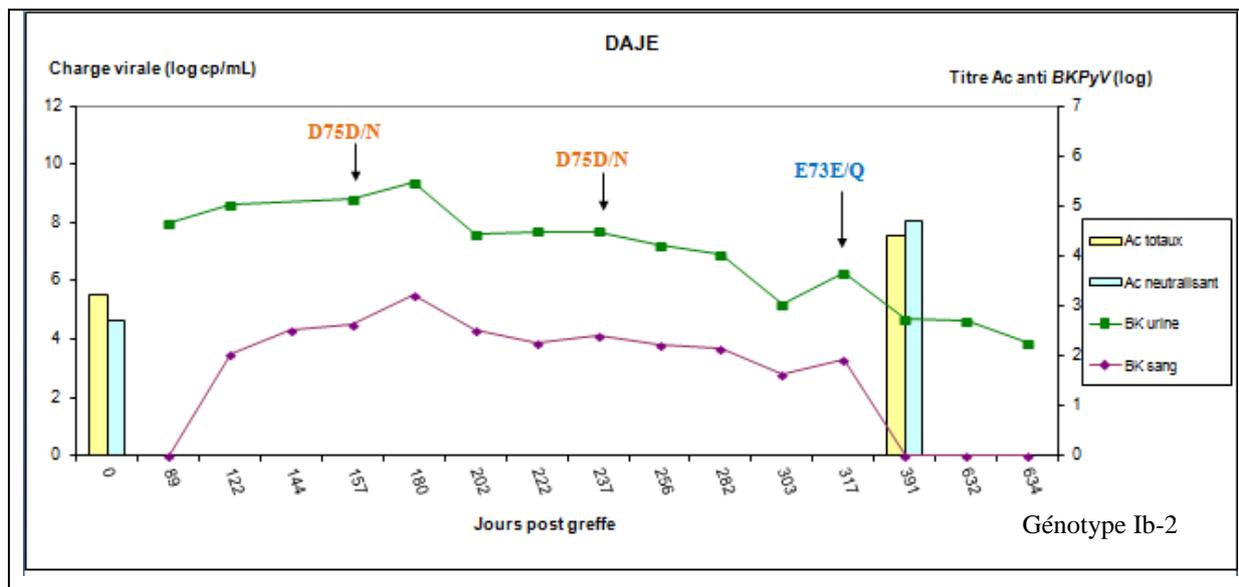


Figure 35 - Suivi immunovirologique du patient DAJE.

Patient n°6 EGFL

Patient chez lequel on observait une virurie et une virémie qui apparaissaient successivement au cours du 1^{er} puis du 4^{ème} mois après la greffe et se négatifaient entre le 6^e et le 14^{ème} mois post greffe (Figure 36).

Ce patient ne présentait que des mutations correspondant à des doubles populations en fin de suivi au niveau des positions 60, 64 et 69. Il n'y avait pas de mutation stable et persistante. Les titres d'Ac neutralisants n'étaient pas disponibles chez ce patient.

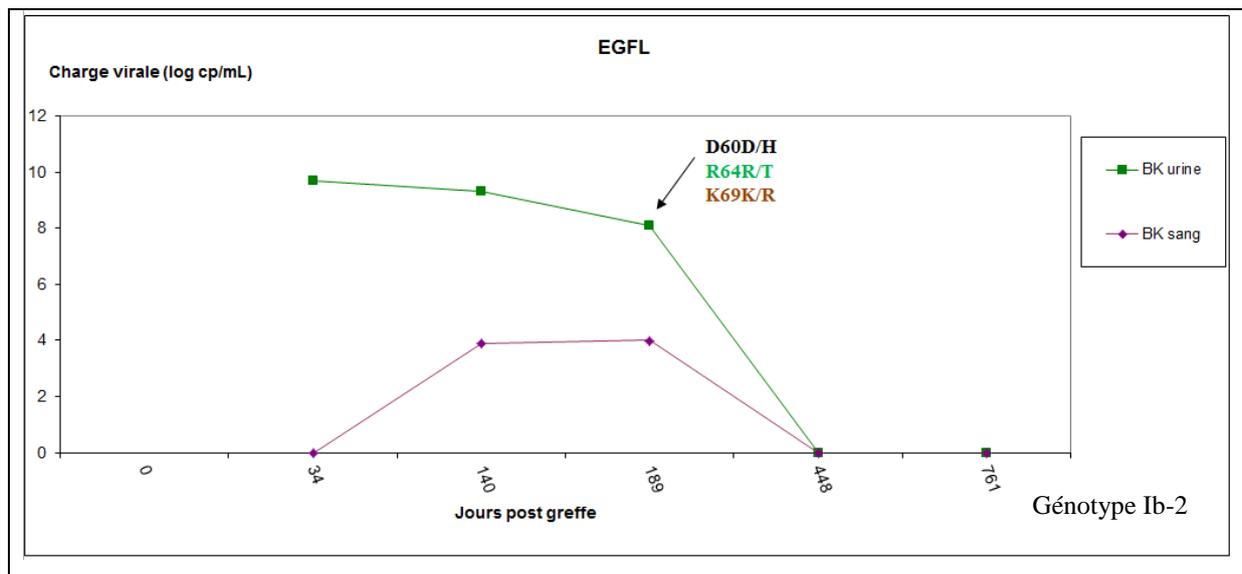


Figure 36 - Suivi immunovirologique du patient EGFL.

Patient n°7 GRPI

Patient de 64 ans. Au 3^{ème} mois post greffe une virurie transitoire apparaissait sans augmentation du titre d'Ac. Par contre, lors de l'apparition de la virurie prolongée (8 mois post greffe) et de la virémie, le titre d'Ac neutralisant (à 12 mois) augmentait. A la suite de l'augmentation du titre d'Ac, la virémie et virurie disparaissaient mais seulement de façon transitoire (Figure 37). Par la suite, une nouvelle ascension des charges virales a été observée avec à ce moment-là apparition de mutations (lors du séquençage à 32 mois). Ainsi, des mutations persistantes ont été observées au niveau des acides aminés 60, 69 et 82. Ce patient a présenté une PyVAN de stade C et son greffon a été enlevé au 49^{ème} mois post greffe.

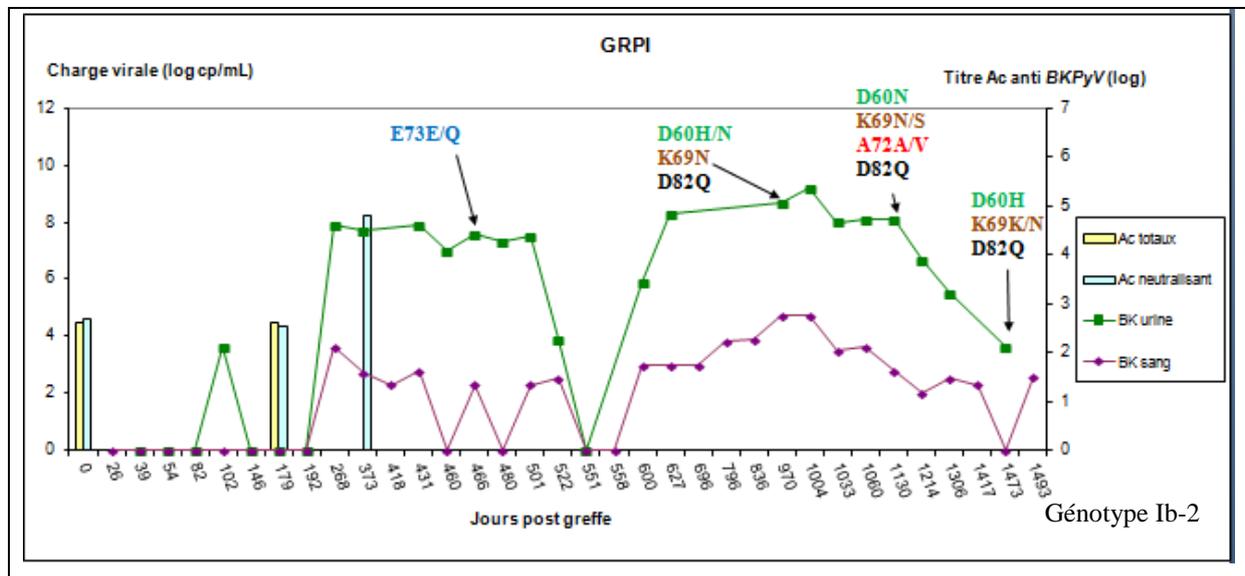


Figure 37 - Suivi immunovirologique du patient GRPI.

Patient n°8 PEAN

Patient présentant une virurie dès le 2^{ème} mois, associée à une virémie à partir du 6^{ème} mois post greffe. La virurie et la virémie persistaient dans le temps. La charge virale dans le sang se négativait à partir du 27^{ème} mois après la greffe mais la virurie était toujours positive en fin de suivi. Chez ce patient le virus a acquis des mutations au niveau des positions 68, 72 et 73. Les dosages des Ac neutralisants n'avaient pas été réalisés (Figure 38).

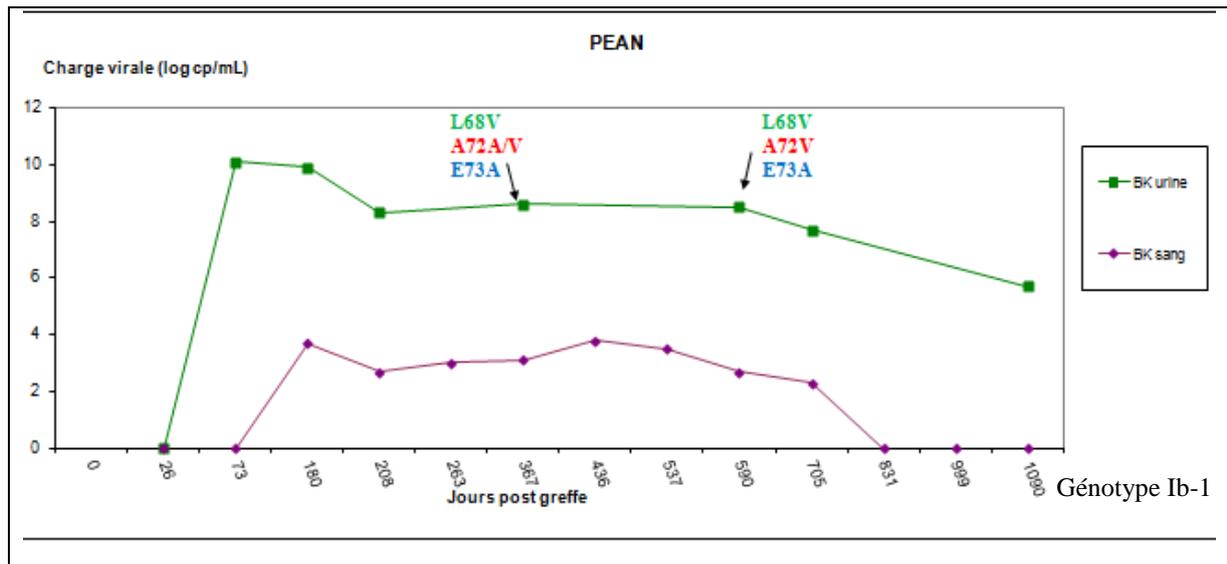


Figure 38 - Suivi immunovirologique du patient PEAN.

Patient n°9 SEMI

Patient de 61 ans. Infection précoce avec de fortes charges virales urinaires et sanguines dès 2 mois post greffe. Une ponction biopsie rénale effectuée à 3 mois montrait une histologie de PyVAN de stade B. Chez ce patient, une virurie stable et persistante au-dessus de 8 log cp/mL ainsi qu'une virémie prolongée et des charges virales stables étaient observés tout au long du suivi. Malgré l'augmentation du titre d'Ac neutralisant, la virémie et la virurie persistaient avec des charges virales maintenues (Figure 39). Lors des différents séquençages, de nombreuses mutations apparaissaient. La mutation N61S est présente dès le 1^{er} séquençage lors du 1^{er} mois post greffe et persistait au cours du temps. D'autres mutations se surajoutaient à partir de un an de suivi. Les mutations concernaient les positions 60, 69, 73 et 77.

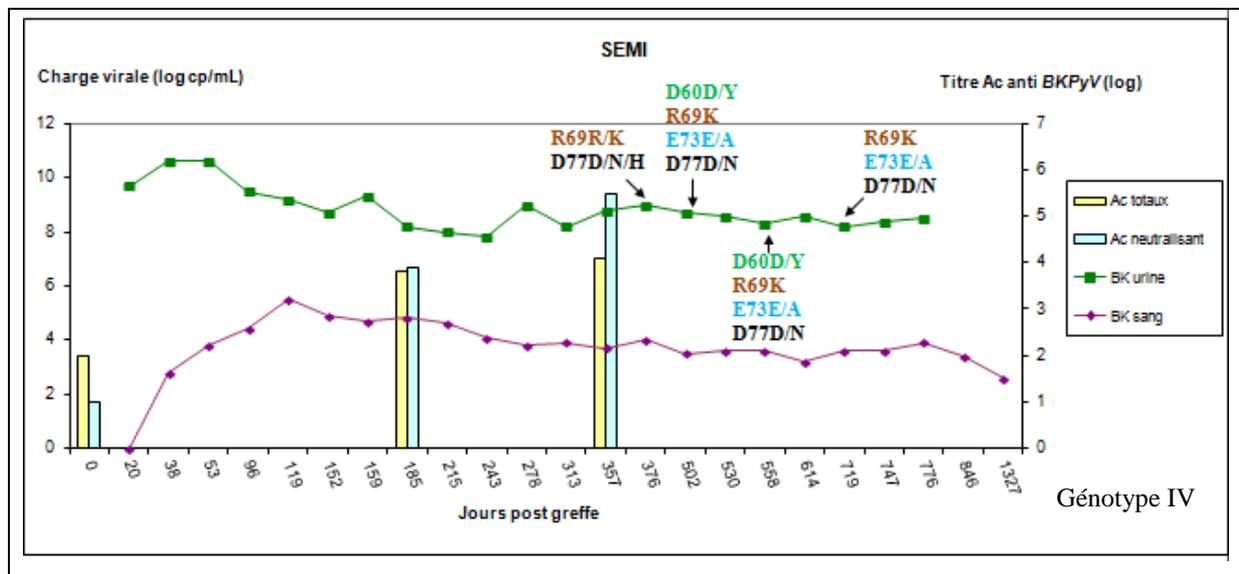


Figure 39 - Suivi immunovirologique du patient SEMI en post greffe.

II. Comparaison des mutations présentes dans les urines avec celles du sang

Les mutations ont été retrouvées dans les isolats cliniques provenant d'urines de patients infectés. Une étude des virus retrouvés dans le sang a été réalisée pour répondre à plusieurs questions : Est-ce le même virus qui est retrouvé dans le sang et les urines ? Ce qui permettrait de montrer que le virus dissémine. Existe-t-il une chronologie dans l'apparition des mutations : d'abord dans le sang puis dans les urines ou l'inverse?

Pour répondre à cette question, trois patients avec une virurie et une virémie positives, présentant des mutations persistantes dans les urines ont été sélectionnés. Chez ces patients, le BKPyV présent dans le sang a été séquencé et les séquences étaient comparées avec celles de l'urine aux mêmes temps post greffe.

Deux patients ne présentant pas de mutations au niveau du virus excrété dans les urines ont aussi été étudiés : BARO et JARO. Le séquençage réalisé sur les échantillons sanguins de ses deux patients n'a pas montré de mutations sur le virus.

Chez le patient BAGA, les mutations commençaient à apparaître dans les urines au 17^{ème} mois post greffe avec présence d'une double population en position 73 (E73E/Q). A ce moment le séquençage du virus dans le sang ne retrouvait pas de mutation. Cette mutation E73E/Q était observée lors du séquençage suivant dans le sang. Ainsi, la majeure partie des mutations était présente de façon parallèle dans le sang et les urines mais parfois avec un décalage au niveau chronologique. Au 24^{ème} mois, les mutations étaient identiques dans les urines et le sang (A72A/V; E73E/Q; D82E/Q). Le mois suivant, une position mutée de plus (75) était apparue dans les urines mais pas dans le sang, cette position dans le sang n'était mutée que lors du séquençage suivant. Le Tableau 10 présente les séquençages réalisés en parallèles sur les urines et le sang en fonction du délai post greffe et des mutations retrouvées lors de ces séquençages. Ici, les mutations étaient d'abord retrouvées chez le virus excrété dans les urines puis au niveau du virus sanguin lors du prélèvement suivant.

Tableau 10 - Chronologie d'apparition des mutations chez BAGA (BKPyV de génotype Ib-2) et comparaison des mutations présentes dans l'urine et le sang.

Délai post greffe Mois (jour)	Charge virale urinaire (log cp/mL)	Charge virale sanguine (log cp/mL)	Mutation urine	Mutation sang
9 (298)	8,9	5,2	Pas de mutations	Pas de mutations
13 (390)	9,4	4,8	Pas de mutations	Pas de mutations
15 (459)	9	4	Pas de mutations	Pas de mutations
17 (520)	9	3,9	E73E/Q;	Pas d'amplification
21 (632)	8,2	4,2	E73E/Q; D82E/Q	E73E/Q;
24 (747)	7,6	3,9	A72A/V; E73E/Q; D82E/Q	A72A/V; E73Q; D82E/Q
28 (859)	9,7	3,8	K69K/M; A72A/V; E73E/Q; D75D/N; D82E/Q	K69K/M; A72A/V; E73E/Q; D82E/Q
31 (957)	8,8	4,1	A72V; E73E/Q; D75D/N; D82Q	K69M; A72V; E73E/Q; D75D/N; D82Q

Chez le patient GRPI à 32 mois post greffe, les positions mutées (60, 69 et 82) dans les urines étaient également mutées lors du séquençage dans le sang. Le Tableau 11 ci-dessous reprend les différents séquençages réalisés en parallèles entre les urines et le sang chez GRPI. Cependant, le défaut d'amplification du virus dans le sang a empêché de voir une chronologie dans l'apparition des mutations.

Tableau 11 - Chronologie d'apparition des mutations chez GRPI (BKPyV de génotype Ib-2) et comparaison des mutations présentes dans l'urine et le sang.

Délai post greffe Mois (jour)	Charge virale urinaire (log cp/mL)	Charge virale sanguine (log cp/mL)	Mutation urine	Mutation sang
8 (268)	7,9	3,6	Pas de mutations	Pas de mutations
12 (373)	7,7	2,7	Pas de mutations	Pas d'amplification
15 (466)	7,6	2,3	E73E/Q;	Pas d'amplification
20 (600)	5,9	3	Pas de mutations	Pas d'amplification
32 (970)	8,7	4,7	D60H/N; K69N; D82Q	D60D/H; K69N; D82Q
37 (1130)	8,1	2,8	D60N; K69N/S; A72A/V; D82Q	Pas d'amplification
49 (1473)	3,6	0	D60H; K69K/N; D82Q	Pas de virémie

Chez SEMI, la position 61 était trouvée mutée dès le 1^{er} mois, cette position était également retrouvée modifiée dans le sang dès le 1er séquençage. Par la suite d'autres positions étaient mutées avec accumulation de doubles populations que ce soit dans les urines ou dans le sang. Seules les positions présentant une mutation persistante étaient mutées de façon parallèle dans les urines et le sang. Lors du dernier séquençage, il existait de nombreuses mutations chez le virus présent dans le sang tandis que dans les urines seules les positions 61, 69, 73 et 77 étaient mutées. Chez ce virus de génotype IV, les mutations semblaient apparaître d'abord au niveau du virus présent dans le sang puis après au niveau de l'urine. Le résumé des mutations est présenté dans le Tableau 12.

Tableau 12 - Chronologie d'apparition des mutations chez SEMI (BKPyV de génotype IV) et comparaison des mutations présentes dans l'urine et le sang.

Délai post greffe Mois (jour)	Charge virale urinaire (log cp/mL)	Charge virale sanguine (log cp/mL)	Mutation urine	Mutation sang
1 (38)	10,6	2,8	N61S	Pas d'amplification
3 (96)	9,5	4,4	N61S	N61S
6 (185)	8,2	4,8	N61S	N61S
12 (376)	9	4	N61S; R69R/K; D77D/N/H	N61S; D77N/D
16 (502)	8,7	3,5	D60D/Y; N61S; R69K; E73E/A; D77D/N	Pas d'amplification
18 (558)	8,3	3,6	D60D/Y; N61S; R69K; E73E/A; D77D/N	N61S; D62D/N; D77D/N
23 (719)	8,2	3,6	N61S; R69K; E73E/A; D77D/N	D60D/Y; N61S/C; S67S/N; R69K; T71T/S; E73A; D77N; D82D/Y

DISCUSSION

Le BKPyV est un virus infectant la majeure partie de la population avec une séroprévalence de 82%. Le virus persiste dans plusieurs types de cellules dont les cellules rénales. Il reste par la suite à l'état latent chez les immunocompétents mais peut se réactiver chez les immunodéprimés. Il est à l'origine d'une pathologie grave chez 1-10% des patients greffés de rein : la néphropathie à BKPyV. Elle correspond à la réplication du virus dans les cellules tubulaires rénales avec destruction de la cellule lors de la libération des virus néoformés. Cette pathologie a vraiment émergé depuis l'utilisation des nouveaux médicaments immunosuppresseurs comme le tacrolimus ou le mycophénolate mofétil. Cependant, il n'existe pas actuellement de traitement antiviral spécifique car le virus utilise la machinerie cellulaire de la cellule hôte pour se répliquer. Une réponse humorale est observée chez les patients avec la formation d'Ac ayant une action neutralisante vis à vis du BKPyV. Chez la plupart des patients, la baisse de l'immunosuppression entraîne une reconstitution du système immunitaire suffisante pour contrôler l'infection.

Les Ac neutralisants sont dirigés contre la surface du BKPyV. Cette surface est constituée de protéines de capsid VP1 plus spécifiquement des boucles BC, DE et HI qui sont impliquées dans l'interaction avec le récepteur cellulaire. La région hypervariable de la boucle BC (TR) est directement impliquée dans cette interaction. Cette région est aussi utilisée pour classer le BKPyV en géotypes correspondants aux différents sérotypes.

Chez un virus voisin, le JCPyV, il a été décrit des mutations de la protéine VP1 probablement responsables de la progression de la LEMP. De plus, l'utilisation d'Ac neutralisants anti VP1 du JCPyV isolés de patients présentant une LEMP semble être une thérapie possible. (Zheng *et al.*, 2005, Ray *et al.*, 2017, Jelcic *et al.*, 2017).

Lors de l'étude d'une cohorte de 160 patients greffés de rein au CHU de Nantes, le titre d'Ac neutralisant anti BKPyV a été étudié. Le titre d'Ac neutralisant augmentait fortement chez les patients présentant une virémie prolongée associée à une virurie, celui-ci augmentait plus modérément chez les patients présentant une virurie seule. Chez la majeure partie des patients, l'augmentation de la réponse humorale (Ac neutralisants) était associée à une clairance de la virémie. Cependant, chez certains patients malgré l'augmentation du titre d'Ac neutralisant, la virurie et/ou la virémie persistaient dans le temps.

Dans ce contexte, notre objectif était de rechercher l'apparition de mutations nucléotidiques sur le gène codant pour la protéine VP1 chez des patients présentant une réplication virale prolongée. L'étude de ces patients a été réalisée par PCR permettant d'amplifier la région TR de la protéine VP1 du BKPyV excrété dans les urines. Puis un séquençage de cet amplicon a été réalisé. L'alignement des séquences avec des séquences de références a permis de mettre en évidence la présence ou l'absence de mutations au niveau de la région amplifiée chez les patients.

Notre étude est la première qui étudie l'évolution du virus au cours du temps chez des patients greffés de reins présentant une infection par le BKPyV. La présence de mutations entre les positions 60 et 84 de la protéine VP1 du BKPyV et surtout leur apparition au cours du temps a été étudiée.

Dans notre étude, le séquençage longitudinal des patients présentant une activation du BKPyV a permis de montrer qu'il existe une variation du virus avec l'apparition et l'accumulation de mutations au cours du temps chez certains patients. Les patients qui possédaient un virus mutant sont des patients qui présentaient une réplication du BKPyV persistante dans le temps malgré une augmentation du titre d'Ac neutralisant. Les patients éliminant l'infection ne présentaient pas de virus mutés ou alors seulement des mutations transitoires ou des doubles populations comme BAFA, DAJE ou EGFL. Cela est cohérent avec le fait que les Ac neutralisants jouent un rôle protecteur vis-à-vis du BKPyV. De plus, les variants de VP1 semblaient sélectionnés lors d'infections prolongées chez des patients immunodéprimés.

Sur les quinze patients étudiés des mutations étaient retrouvées chez neuf patients parmi lesquels seuls six présentaient des mutations persistantes lors du suivi virologique.

Parmi les cinq patients avec une virurie positive, un seul patient présentait un virus muté. Ce patient présentait une virurie persistante malgré l'augmentation de son taux d'Ac neutralisant à 6 mois tandis que les autres patients négativaient leur virurie à la suite de l'augmentation du titre d'Ac. Les mutations étaient observées en positions 73 et 77.

Parmi les dix patients avec une virémie et une virurie positives persistantes, huit présentaient des mutations dont cinq étaient des patients avec des mutations persistantes qui n'éliminaient pas l'infection par le BKPyV malgré l'augmentation de leur titre d'Ac neutralisant. Les charges virales sanguines et urinaires étaient encore positives lors du dernier point de suivi disponible.

Les mutations apparaissaient à différents délais post greffe selon les patients. Pour BIMA, la 1^{ère} mutation était observée à 2 mois post greffe alors que ce patient présentait uniquement

une virurie. Cette virurie était positive pendant tout le suivi réalisé chez ce patient de 25 jours post greffe à 397 jours. A aucun moment la charge virale sanguine ne s'était positivée.

Pour les patients présentant une virémie persistante, l'apparition de mutations se faisait toujours après la 1^{ère} charge virale sanguine positive et jamais lors de la phase de virurie isolée.

Chez les patients qui ne présentaient que des mutations ponctuelles transitoires (BAFA, DAJE, EGFL), l'apparition de la 1^{ère} mutation se faisait dans les 6 mois post greffe (de 143 jours à 189 jours). De plus les mutations apparaissaient toujours dans les 3 mois après le début de la virémie (le plus précoce étant 35 et le plus tardif 81 jours).

Pour les patients présentant des mutations persistantes, les mutations apparaissaient plus tardivement le plus souvent après 1 an post greffe (entre 367 jours et 520 jours). Leur apparition se faisait dans un temps relativement éloigné de la 1^{ère} charge virale sanguine positive, plus de 6 mois après (187 jours étant le plus précoce et 338 le plus tardif).

Parmi les patients, le cas de BROYV est intéressant puisqu'il a été greffé deux fois. La 1^{ère} mutation a été observée après la transplantectomie mais l'absence d'amplification de l'échantillon d'urine précédant ne nous permettait pas de dire exactement à quel moment cette mutation était apparue, elle pouvait être présente au moment du diagnostic de la PyVAN. Après la 2^{ème} transplantation de rein, soit 203 jours post greffe, de nouvelles mutations apparaissaient. Elles étaient observées alors que la virémie était négative mais les charges virales urinaires étaient toujours positives et persistantes à plus de 6 log cp/mL.

Il est habituellement admis que le virus qui se réactive en post greffe provient du donneur (Bohl *et al.*, 2005, Wunderink *et al.*, 2017). Chez BROYV, la mutation en position 73 était détectée après la transplantectomie, avant la 2^{ème} greffe puis précocement lors de la réactivation suivant cette 2^{ème} greffe. Ces données suggèrent que le virus ait été archivé chez le receveur entre les deux greffes, et ait pu continuer à se répliquer dans d'autres compartiments cellulaires (urothélium ?).

Globalement, les mutations détectées dans VP1 pouvaient être persistantes au cours du suivi et donc retrouvées à plusieurs temps post greffe, témoins d'une mutation du virus. D'autres étaient transitoires et non retrouvées par la suite. Le virus n'avait donc pas gardé ces mutations qui n'étaient à priori pas bénéfiques pour lui.

Afin d'investiguer les conséquences potentielles de ces mutations sur la protéine, une modélisation de la protéine VP1 a été réalisée par D.McIlroy. Cette modélisation, préparée

avec PyMol en utilisant la structure 4MJ0 (Neu *et al.*, 2013) permettait de localiser la position des mutations chez les trois patients dont le BKPyV dans le sang et les urines a été séquencé. La Figure 40 représente la modélisation de VP1 chez le patient BAGA à 28 mois dans les urines ou 31 mois dans le sang. Les mutations étaient bien situées au niveau du site de fixation du récepteur cellulaire.

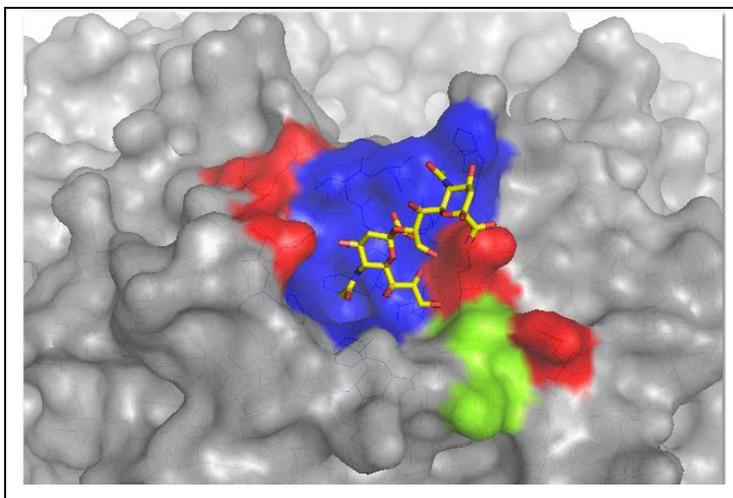


Figure 40- Modélisation de la protéine VP1 du BKPyV du patient BAGA.

Les acides aminés interagissant avec l'acide α -(2,8) di-sialique (jaune) du ganglioside GD1b sont représentés en bleu et les acides aminés interagissant avec les branches Gal-GalNAc de GD1b sont en vert. Les positions mutées sont représentées en rouge. Ce sont les positions 69, 72, 73, 75 et 82 mutées au 28^{ème} mois post greffe. (McIlroy ECV 2016).

La Figure 41 représente les mutations du patient GRPI au 37ème mois post greffe dans les urines. De nouveau les mutations étaient situées au niveau du site de fixation.

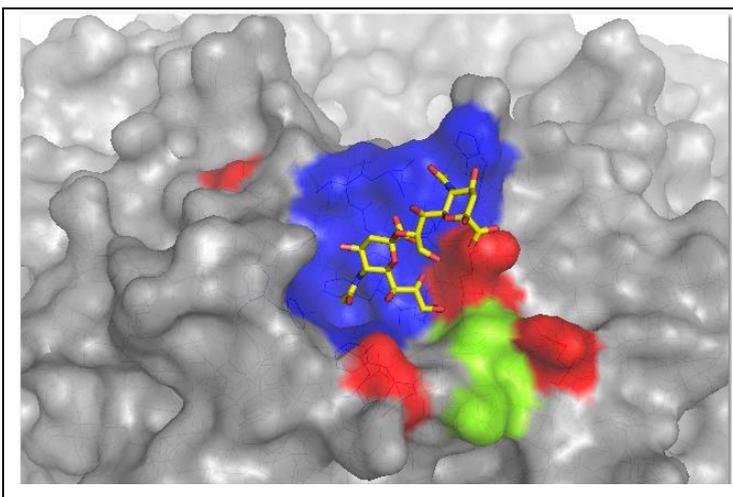


Figure 41 - Modélisation de la protéine VP1 du BKPyV du patient GRPI.

Les acides aminés interagissant avec l'acide α -(2,8) di-sialique (jaune) du ganglioside GD1b sont représentés en bleu et les acides aminés interagissant avec les branches Gal-GalNAc de GD1b sont en vert. Les positions mutées sont représentées en rouge. Ce sont les positions 60, 69, 72 et 82 mutées au 37ème mois post greffe (McIlroy ECV 2016).

Enfin, la Figure 42 montre la localisation des mutations sur VP1 du patient SEMI au niveau du BKPyV séquencé dans les urines du 23^{ème} mois post greffe.

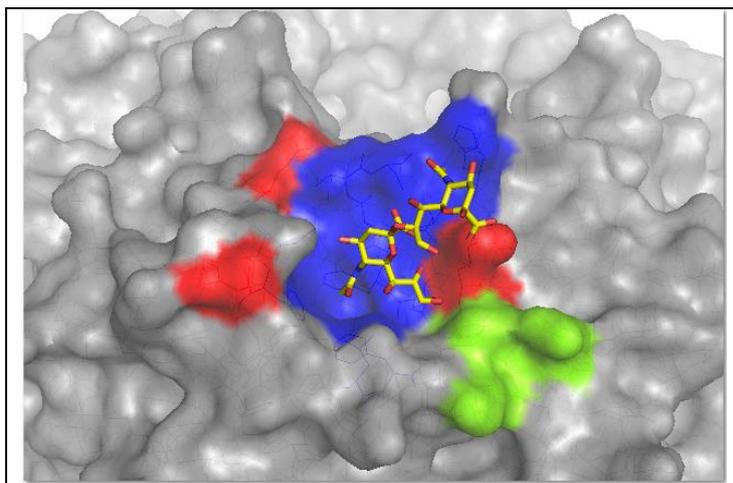


Figure 42 - Modélisation de la protéine VP1 du BKPyV du patient SEMI.

Les acides aminés interagissant avec l'acide α -(2,8) di-sialique (jaune) du ganglioside GD1b sont représentés en bleu et les acides aminés interagissant avec les branches Gal-GalNAc de GD1b sont en vert. Les positions mutées sont représentées en rouge. Ce sont les positions 69, 73 et 77 mutées au 23^{ème} mois post greffe (McIlroy ECV 2016).

Les mutations étaient présentes au niveau du site de fixation du virus sur le récepteur cellulaire. Ces mutations ne semblaient pas être délétères pour le virus puisque ce virus était toujours retrouvé chez les patients et que l'infection était toujours active, la charge virale sanguine étant positive. Par contre, il était possible qu'une modification d'acides aminés sur ces positions clés entraînait un échappement à la réponse humorale, l'Ac ne pouvant plus se fixer de façon efficace sur le virus. Lorsque le virus évoluait et acquérait des mutations au niveau de ces positions, il aurait pu échapper aux Ac neutralisants ce qui expliquerait, que malgré l'augmentation du titre d'Ac neutralisant, les charges virales sanguines et urinaires chez ces patients restaient élevées et stables. Les Ac seraient moins capables de se fixer efficacement au niveau du virus. Ils ne pouvaient donc inhiber le virus et sa réplication active. Il échappait alors à la réponse immunitaire de l'hôte.

Les changements d'acides aminés peuvent entraîner des changements de charges et des modifications conformationnelles. Ainsi, plusieurs mutations retrouvées montraient un changement de charge au niveau de l'acide aminé substitué. Ces modifications pourraient être à l'origine d'une plus faible liaison de l'Ac.

Parmi les mutations observées, plusieurs ont déjà été mentionnées dans des publications. Ainsi la mutation E73A a été étudiée par Dugan, le virus mutant au niveau de cette position avait une croissance normale et était protégé contre la DNase signifiant que la capsid était

formée. Ce virus muté était donc un virus viable. Par contre, aucune mutation entraînant un virus défectueux décrit par Dugan n'a été observée ici. (Dugan *et al.*, 2007)

Les mutations A72V et E73Q trouvées chez les patients ont été décrites par Krautkrämer. Ces mutations étaient isolées à partir d'isolats cliniques (Krautkrämer *et al.*, 2009)

L'étude de Krautkrämer ne montre pas de lien entre la présence de mutations et la charge virale urinaire. Cette étude présente des limites car elle ne fournit pas les données de suivi virologique avec la durée de la virurie ni les délais post transplantations auxquels sont réalisés les séquençages. Notre étude semble montrer un lien entre l'apparition de mutations persistantes et le défaut d'action des Ac neutralisants avec des charges virales persistantes que ce soit dans le sang ou les urines.

La deuxième partie de l'étude portait sur la comparaison du virus présent dans les urines et celui présent dans le sang. Le séquençage en parallèle de la région TR de VP1 chez 3 patients avec une virémie montrait que c'était le même virus qui était présent au niveau sanguin et urinaire. Il semblerait que ce soit une seule souche qui disséminait. Les mutations trouvées étaient les mêmes dans le sang et les urines. Cependant, ces mutations apparaîtraient d'abord à une 1^{ère} localisation avant d'être retrouvées sur l'autre localisation du virus. Chez BAGA qui possédait un virus de génotype Ib-2, les mutations étaient d'abord observées chez le virus excrété dans les urines avant d'être observées dans le sang. Tandis que chez SEMI qui possédait un BKPyV de génotype IV, le virus sanguin présentait des mutations en plus de celui présent au niveau urinaire. Peut-être que le virus présent dans le sang acquière d'abord les mutations puis qu'il soit ensuite excrété dans les urines. Ainsi, peut être que l'apparition des mutations se fait différemment selon le génotype du BKPyV, mais cela reste à confirmer.

Notre étude présente cependant des limites. Le faible nombre de sujets séquencés de façon longitudinale permet de montrer une tendance mais pas de conclure de façon significative. De plus, le taux d'Ac totaux ou neutralisant n'était pas disponible pour chaque temps de suivi ni pour chaque patient. Et enfin, on ne peut pas conclure sur le lieu d'apparition des mutations.

Afin de pousser les investigations, plusieurs axes de recherche semblent intéressants.

Tout d'abord il convient de confirmer sur un plus large nombre de patients que l'apparition des mutations se fait lors d'une infection prolongée chez les patients immunodéprimés. Les patients avec une virémie persistante plus de 6 mois malgré une réponse humorale avec des Ac neutralisants sont à étudier. De plus une étude parallèle des virus présents au niveau sanguin et urinaire permettrait de confirmer que c'est le même virus qui dissémine et savoir

s'il y a une différence d'apparition des mutations en fonction du génotype du BKPyV infectant.

Puis les mutations trouvées doivent être étudiées pour savoir si leur présence modifie les interactions du virus avec les récepteurs cellulaires, avec la fixation des Ac neutralisants et aussi si les virus mutés conservent leur infectivité. Pour cela, il faudra créer des pseudo virus ou virus like particule (VLP) exprimant la protéine VP1 mutée. Le gène VP1 devra être amplifié en entier par PCR. Un clonage plasmidique du gène puis une amplification dans des bactéries seront réalisés. Par la suite, des cellules HEK293 seront transfectées. Ces cellules sont issues d'une lignée de cellules rénales embryonnaires humaines, elles possèdent la capacité de proliférer en suspension en absence de sérum. Elles sont utilisées pour produire des protéines recombinantes. Ainsi, elles vont permettre la synthèse de protéines VP1 mutées et leur assemblage en VLP. Enfin, un test de neutralisation de ces VLP produites en présence des Ac neutralisants du patient sera à réaliser. Ainsi, la fixation de l'Ac neutralisant sera étudiée.

Enfin, comme cela a été montré pour le JCPyV, il faudrait tester la possibilité d'utiliser les Ac neutralisants anti BKPyV comme thérapeutique. Les Ac neutralisants seront isolés et des tests de l'action inhibitrice de ces Ac sur la réplication virale en culture cellulaire est à réaliser.

Pour conclure, notre objectif était d'étudier l'apparition éventuelle de mutations sur la région TR de la protéine de capsid VP1 du BKPyV située sur la boucle BC nécessaire à la reconnaissance et fixation des Ac neutralisants de l'hôte et de corréliser la présence de mutations avec l'échappement à la réponse humorale de l'hôte. Le séquençage longitudinal de la région TR de VP1 du BKPyV chez les patients sélectionnés a montré que le virus évolue au cours du temps chez les patients présentant une infection persistante. Chez ces patients, une augmentation de la réponse Ac neutralisante ne permettait pas d'éliminer la réplication virale. Ces virus mutés échappaient à la réponse humorale de l'hôte. Les mutations avaient lieu sur des positions impliquées dans la fixation au récepteur cellulaire et dans la fixation des Ac neutralisants. Les mutations touchaient plus fréquemment certaines positions (69, 72, 73 et 77). La comparaison des séquences des virus présents dans le sang et dans les urines montrait que c'est le même virus qui disséminait. Il semble que les mutations apparaissaient de façon

différée entre le sang et les urines mais une chronologie ne pouvait être affirmée dans notre étude.

La recherche de mutations pourrait avoir une place dans la démarche de suivi des patients greffés de reins infectés par le BKPyV. Elle permettrait de détecter plus précocement les patients à risque de PyVAN dont le virus échappe à la réponse humorale de l'hôte.

BIBLIOGRAPHIE

Ali SH, Chandraker A, DeCaprio JA. Inhibition of Simian virus 40 large T antigen helicase activity by fluoroquinolones. *Antivir Ther (Lond)*. 2007;12(1):1–6.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MAA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol*. 2007 Apr;81(8):4130–6.

Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Apr;30(2):503–28.

Andrews CA, Shah KV, Daniel RW, Hirsch MS, Rubin RH. A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J Infect Dis*. 1988 Jul;158(1):176–81.

Babé LM, Brew K, Matsuura SE, Scott WA. Epitopes on the major capsid protein of simian virus 40. *J Biol Chem*. 1989 Feb 15;264(5):2665–71.

Bastiani M, Parton RG. Caveolae at a glance. *J Cell Sci*. 2010 Nov 15;123(Pt 22):3831–6.

Bennett SM, Broekema NM, Imperiale MJ. BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes Infect*. 2012 Aug;14(9):672–83.

Bernhoff E, Tylden GD, Kjerpeseth LJ, Gutteberg TJ, Hirsch HH, Rinaldo CH. Leflunomide inhibition of BK virus replication in renal tubular epithelial cells. *J Virol*. 2010 Feb;84(4):2150–6.

Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Jan;66(1):238–45.

Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA. BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J Clin Virol*. 2008 Oct;43(2):184–9.

Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Schnitzler MA, Major EO, et al. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant*. 2005 Sep;5(9):2213–21.

Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Hedquist BG, Nennesmo I, Sundelin B, et al. BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis and nephritis in a patient with AIDS. *AIDS*. 1999 Jun 18;13(9):1071–5.

Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebillé V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005 Aug;5(8):1926–33.

Brown DW, Gardner SD, Gibson PE, Field AM. BK virus specific IgM responses in cord sera, young children and healthy adults detected by RIA. *Arch Virol*. 1984;82(3–4):149–60.

- Chen Y, Trofe J, Gordon J, Du Pasquier RA, Roy-Chaudhury P, Kuroda MJ, et al. Interplay of cellular and humoral immune responses against BK virus in kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy. *J Virol*. 2006 Apr;80(7):3495–505.
- Coleman DV, Mackenzie EF, Gardner SD, Poulding JM, Amer B, Russell WJ. Human polyomavirus (BK) infection and ureteric stenosis in renal allograft recipients. *J Clin Pathol*. 1978 Apr;31(4):338–47.
- Comoli P, Hirsch HH, Ginevri F. Cellular immune responses to BK virus. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008 Dec;13(6):569–74.
- Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology*. 2013 Mar 15;437(2):63–72.
- Dall A, Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Mar;3 Suppl 2:S68-75.
- DeCaprio JA, Garcea RL. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Apr;11(4):264–76.
- De Gascun CF, Carr MJ. Human polyomavirus reactivation: disease pathogenesis and treatment approaches. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:373579.
- de Silva LM, Bale P, de Courcy J, Brown D, Knowles W. Renal failure due to BK virus infection in an immunodeficient child. *J Med Virol*. 1995 Feb;45(2):192–6.
- Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, et al. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol*. 2000 Aug;81(Pt 8):1967–73.
- Drachenberg CB, Hirsch HH, Ramos E, Papadimitriou JC. Polyomavirus disease in renal transplantation: review of pathological findings and diagnostic methods. *Hum Pathol*. 2005 Dec;36(12):1245–55.
- Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, Wali R, Crowder C, Nogueira J, et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant*. 2004 Dec;4(12):2082–92.
- Dugan AS, Gasparovic ML, Tsomaia N, Mierke DF, O'Hara BA, Manley K, et al. Identification of amino acid residues in BK virus VP1 that are critical for viability and growth. *J Virol*. 2007 Nov;81(21):11798–808.
- Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transpl Infect Dis*. 2006 Jun;8(2):62–7.
- Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Apr;63(7–8):865–76.
- Eash S, Atwood WJ. Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol*. 2005 Sep;79(18):11734–41.

Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 2009 Mar 15;199(6):837–46.

Ellis LC, Norton E, Dang X, Koralnik IJ. Agnogene deletion in a novel pathogenic JC virus isolate impairs VP1 expression and virion production. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e80840.

Fahrenkrog B, Aebi U. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Oct;4(10):757–66.

Farasati NA, Shapiro R, Vats A, Randhawa P. Effect of leflunomide and cidofovir on replication of BK virus in an in vitro culture system. *Transplantation*. 2005 Jan 15;79(1):116–8.

Fauquet CM, Mayo MA. The 7th ICTV report. *Arch Virol*. 2001;146(1):189–94.

Felsani A, Mileo AM, Paggi MG. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene*. 2006 Aug 28;25(38):5277–85.

Feltkamp MCW, Kazem S, van der Meijden E, Lauber C, Gorbalenya AE. From Stockholm to Malawi: recent developments in studying human polyomaviruses. *J Gen Virol*. 2013 Mar;94(Pt 3):482–96.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 2008 Feb 22;319(5866):1096–100.

Freund R, Calderone A, Dawe CJ, Benjamin TL. Polyomavirus tumor induction in mice: effects of polymorphisms of VP1 and large T antigen. *J Virol*. 1991a Jan;65(1):335–41.

Freund R, Garcea RL, Sahli R, Benjamin TL. A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. *J Virol*. 1991b Jan;65(1):350–5.

Funk GA, Gosert R, Comoli P, Ginevri F, Hirsch HH. Polyomavirus BK replication dynamics in vivo and in silico to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants. *Am J Transplant*. 2008 Nov;8(11):2368–77.

Gabardi S, Waikar SS, Martin S, Roberts K, Chen J, Borgi L, et al. Evaluation of fluoroquinolones for the prevention of BK viremia after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Jul;5(7):1298–304.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1971 Jun 19;1(7712):1253–7.

Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*. 2007 May 4;3(5):e64.

Gee GV, Tsomaia N, Mierke DF, Atwood WJ. Modeling a sialic acid binding pocket in the external loops of JC virus VP1. *J Biol Chem*. 2004 Nov 19;279(47):49172–6.

Gharakhanian E, Muñoz L, Mayorca L. The simian virus 40 minor structural protein Vp3, but not Vp2, is essential for infectious virion formation. *J Gen Virol*. 2003 Aug;84(Pt 8):2111–6.

- Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, Basso S, Fontana I, Cioni M, et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant*. 2007 Dec;7(12):2727–35.
- Giraldi C, Noto A, Tenuta R, Greco F, Perugini D, Dodaro S, et al. Prospective study of BKV nephropathy in 117 renal transplant recipients. *New Microbiol*. 2007 Apr;30(2):127–30.
- Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol*. 1982;10(2):91–9.
- Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953 Jun;83(2):414–21.
- Hariharan S, Cohen EP, Vasudev B, Orentas R, Viscidi RP, Kakela J, et al. BK virus-specific antibodies and BKV DNA in renal transplant recipients with BKV nephritis. *Am J Transplant*. 2005 Nov;5(11):2719–24.
- Harris KF, Christensen JB, Imperiale MJ. BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *J Virol*. 1996 Apr;70(4):2378–86.
- Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2002 Aug 15;347(7):488–96.
- Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*. 2003 Oct;3(10):611–23.
- Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2002 Jan;2(1):25–30.
- Hirsch HH, Randhawa P, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013 Mar;13 Suppl 4:179–88.
- Ikegaya H, Saukko PJ, Terti R, Metsärinne KP, Carr MJ, Crowley B, et al. Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations. *J Gen Virol*. 2006 Nov;87(Pt 11):3201–8.
- Jelcic I, Combaluzier B, Jelcic I, Faigle W, Senn L, Reinhart BJ, et al. Broadly neutralizing human monoclonal JC polyomavirus VP1-specific antibodies as candidate therapeutics for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Sci Transl Med*. 2015 Sep 23;7(306):306ra150.
- Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol*. 2009 Feb;83(3):1350–8.
- Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewley JP. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *J Med Virol*. 1993 Jan;39(1):50–6.
- Johannessen M, Walquist M, Gerits N, Dragset M, Spang A, Moens U. BKV agnoprotein interacts with α -soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein, and negatively influences transport of VSVG-EGFP. *PLoS ONE*. 2011;6(9):e24489.

- Josephson MA, Gillen D, Javaid B, Kadambi P, Meehan S, Foster P, et al. Treatment of renal allograft polyoma BK virus infection with leflunomide. *Transplantation*. 2006 Mar 15;81(5):704–10.
- Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog*. 2009 Mar;5(3):e1000363.
- Khalili K, White MK, Sawa H, Nagashima K, Safak M. The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. *J Cell Physiol*. 2005 Jul;204(1):1–7.
- Knowles WA, Pillay D, Johnson MA, Hand JF, Brown DW. Prevalence of long-term BK and JC excretion in HIV-infected adults and lack of correlation with serological markers. *J Med Virol*. 1999 Dec;59(4):474–9.
- Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DWG, et al. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol*. 2003 Sep;71(1):115–23.
- Koh MJ, Lim BJ, Noh S, Kim YH, Jeong HJ. Urinary decoy cell grading and its clinical implications. *Korean J Pathol*. 2012 Jun;46(3):233–6.
- Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, Moens U, et al. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e58021.
- Krautkrämer E, Klein TM, Sommerer C, Schnitzler P, Zeier M. Mutations in the BC-loop of the BKV VP1 region do not influence viral load in renal transplant patients. *J Med Virol*. 2009 Jan;81(1):75–81.
- Leuenberger D, Andresen PA, Gosert R, Binggeli S, Ström EH, Bodaghi S, et al. Human polyomavirus type 1 (BK virus) agnoprotein is abundantly expressed but immunologically ignored. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Aug;14(8):959–68.
- Leung AYH, Chan MTL, Yuen K-Y, Cheng VCC, Chan K-H, Wong CLP, et al. Ciprofloxacin decreased polyoma BK virus load in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2005 Feb 15;40(4):528–37.
- Leung AYH, Yuen K-Y, Kwong Y-L. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Dec;36(11):929–37.
- Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*. 1991 Nov 28;354(6351):278–84.
- Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, et al. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*. 2013 Feb 20;436(2):295–303.
- Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol*. 2006 Feb;80(3):1361–6.

- Markowitz RB, Thompson HC, Mueller JF, Cohen JA, Dynan WS. Incidence of BK virus and JC virus viremia in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected subjects. *J Infect Dis.* 1993 Jan;167(1):13–20.
- Mazalrey S, McIlroy D, Bressollette-Bodin C. BK polyomavirus: virus-cell interactions, host immune response, and viral pathogenesis. *Virologie.* 2015 Sep 1;19(5):8–24.
- Mishra N, Pereira M, Rhodes RH, An P, Pipas JM, Jain K, et al. Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. *J Infect Dis.* 2014 Nov 15;210(10):1595–9.
- Murata H, Teferedegne B, Sheng L, Lewis AM, Peden K. Identification of a neutralization epitope in the VP1 capsid protein of SV40. *Virology.* 2008 Nov 10;381(1):116–22.
- Myhre MR, Olsen G-H, Gosert R, Hirsch HH, Rinaldo CH. Clinical polyomavirus BK variants with agnogene deletion are non-functional but rescued by trans-complementation. *Virology.* 2010 Mar 1;398(1):12–20.
- Myhre MR, Olsen G-H, Gosert R, Hirsch HH, Rinaldo CH. Clinical polyomavirus BK variants with agnogene deletion are non-functional but rescued by trans-complementation. *Virology.* 2010 Mar 1;398(1):12–20.
- Nakanishi A, Itoh N, Li PP, Handa H, Liddington RC, Kasamatsu H. Minor capsid proteins of simian virus 40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry but are required for nuclear entry of the viral genome. *J Virol.* 2007 Apr;81(8):3778–85.
- Neu U, Allen S-AA, Blaum BS, Liu Y, Frank M, Palma AS, et al. A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003688.
- Nickeleit V, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Transpl Int.* 2006 Dec;19(12):960–73.
- Nickeleit V, Singh HK. Polyomaviruses and disease: is there more to know than viremia and viremia? *Curr Opin Organ Transplant.* 2015 Jun;20(3):348–58.
- O'Hara SD, Stehle T, Garcea R. Glycan receptors of the Polyomaviridae: structure, function, and pathogenesis. *Curr Opin Virol.* 2014 Aug;7:73–8.
- Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* 1971 Jun 19;1(7712):1257–60.
- Panté N, Kann M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell.* 2002 Feb;13(2):425–34.
- Pastrana DV, Brennan DC, Cuburu N, Storch GA, Viscidi RP, Randhawa PS, et al. Neutralization serotyping of BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002650.
- Pastrana DV, Ray U, Magaldi TG, Schowalter RM, Çuburu N, Buck CB. BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. *J Virol.* 2013 Sep;87(18):10105–13.

- Pietro Paolo V, Di Taranto C, Degener AM, Jin L, Sinibaldi L, Baiocchini A, et al. Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol*. 1998 Dec;56(4):372–6.
- Portolani M, Pietrosemoli P, Cermelli C, Mannini-Palenzona A, Grossi MP, Paolini L, et al. Suppression of BK virus replication and cytopathic effect by inhibitors of prokaryotic DNA gyrase. *Antiviral Res*. 1988 Apr;9(3):205–18.
- Prosser S, Hariharan S. Pathogenesis of BK virus infection after renal transplantation. *Expert Rev Clin Immunol*. 2006 Nov;2(6):833–7.
- Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis*. 1995 Oct;26(4):671–3.
- Randhawa P, Pastrana DV, Zeng G, Huang Y, Shapiro R, Sood P, et al. Commercially available immunoglobulins contain virus neutralizing antibodies against all major genotypes of polyomavirus BK. *Am J Transplant*. 2015 Apr;15(4):1014–20.
- Randhawa P, Vats A, Shapiro R. Monitoring for polyomavirus BK And JC in urine: comparison of quantitative polymerase chain reaction with urine cytology. *Transplantation*. 2005 Apr 27;79(8):984–6.
- Randhawa PS, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Viscidi RP. Immunoglobulin G, A, and M responses to BK virus in renal transplantation. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Sep;13(9):1057–63.
- Randhawa PS, Schonder K, Shapiro R, Farasati N, Huang Y. Polyomavirus BK neutralizing activity in human immunoglobulin preparations. *Transplantation*. 2010 Jun 27;89(12):1462–5.
- Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, Shapiro R, Vivas C, Jordan M, et al. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation*. 1999 Jan 15;67(1):103–9.
- Ray U, Cinque P, Gerevini S, Longo V, Lazzarin A, Schippling S, et al. JC polyomavirus mutants escape antibody-mediated neutralization. *Sci Transl Med*. 2015 Sep 23;7(306):306ra151.
- Rinaldo CH, Gosert R, Bernhoff E, Finstad S, Hirsch HH. 1-O-hexadecyloxypropyl cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Nov;54(11):4714–22.
- Rosen S, Harmon W, Krensky AM, Edelson PJ, Padgett BL, Grinnell BW, et al. Tubulo-interstitial nephritis associated with polyomavirus (BK type) infection. *N Engl J Med*. 1983 May 19;308(20):1192–6.
- Safrin null, Cherrington null, Jaffe null. Clinical uses of cidofovir. *Rev Med Virol*. 1997 Sep;7(3):145–56.
- Savona MR, Newton D, Frame D, Levine JE, Mineishi S, Kaul DR. Low-dose cidofovir treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in recipients of hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Jun;39(12):783–7.

- Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, Steiger J, Mihatsch MJ, Hopfer H, et al. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant*. 2010 Dec;10(12):2615–23.
- Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe*. 2010 Jun 25;7(6):509–15.
- Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, et al. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol*. 2011 May;85(9):4586–90.
- Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, et al. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J Virol*. 2012 Oct;86(19):10321–6.
- Singh HK, Andreoni KA, Madden V, True K, Detwiler R, Weck K, et al. Presence of urinary Haufen accurately predicts polyomavirus nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Feb;20(2):416–27.
- Stewart SE, Eddy BE, Borgese N. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J Natl Cancer Inst*. 1958 Jun;20(6):1223–43.
- Sundsford A, Flaegstad T, Flø R, Spein AR, Pedersen M, Permin H, et al. BK and JC viruses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons: prevalence, excretion, viremia, and viral regulatory regions. *J Infect Dis*. 1994 Mar;169(3):485–90.
- Sundsford A, Spein AR, Lucht E, Flaegstad T, Seternes OM, Traavik T. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol*. 1994 May;32(5):1390–4.
- Suzuki T, Semba S, Sunden Y, Orba Y, Kobayashi S, Nagashima K, et al. Role of JC virus agnoprotein in virion formation. *Microbiol Immunol*. 2012 Sep;56(9):639–46.
- Swanson PA, Lukacher AE, Szomolanyi-Tsuda E. Immunity to polyomavirus infection: the polyomavirus-mouse model. *Semin Cancer Biol*. 2009 Aug;19(4):244–51.
- Sweet BH, Hilleman MR. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1960 Nov;105:420–7.
- Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, et al. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol*. 2004 Oct;85(Pt 10):2821–7.
- Takemoto KK, Mullarkey MF. Human papovavirus, BK strain: biological studies including antigenic relationship to simian virus 40. *J Virol*. 1973 Sep;12(3):625–31.
- Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene*. 2003 Aug 11;22(33):5192–200.

van der Meijden E, Janssens RWA, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MCW. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog.* 2010 Jul 29;6(7):e1001024.

van Regenmortel MH, Mayo MA, Fauquet CM, Maniloff J. Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch Virol.* 2000;145(10):2227–32.

Wadei HM, Rule AD, Lewin M, Mahale AS, Khamash HA, Schwab TR, et al. Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). *Am J Transplant.* 2006 May;6(5 Pt 1):1025–32.

Williams JW, Javaid B, Kadambi PV, Gillen D, Harland R, Thistlewaite JR, et al. Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. *N Engl J Med.* 2005 Mar 17;352(11):1157–8.

Wunderink HF, van der Meijden E, van der Blij-de Brouwer CS, Mallat MJK, Haasnoot GW, van Zwet EW, et al. Pretransplantation Donor-Recipient Pair Seroreactivity Against BK Polyomavirus Predicts Viremia and Nephropathy After Kidney Transplantation. *Am J Transplant.* 2017 Jan;17(1):161–72.

Yogo Y, Sugimoto C, Zhong S, Homma Y. Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications. *Rev Med Virol.* 2009 Jul;19(4):185–99.

Zambrano A, Kalantari M, Simoneau A, Jensen JL, Villarreal LP. Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *Prostate.* 2002 Dec 1;53(4):263–76.

Zheng H-Y, Ikegaya H, Takasaka T, Matsushima-Ohno T, Sakurai M, Kanazawa I, et al. Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Aug 5;333(3):996–1002.

Zheng H-Y, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, et al. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect.* 2007 Feb;9(2):204–13.

Annexes

R : date de la greffe de rein

NR : non réalisé

AA : absence d'amplification

Mpo : mycophénolate sodique

Mmf : mycophénolate mofetil

Tac: tacrolimus

Adv : advagraf

Patient BAFA	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 24/02/12	0	0	0				
	2	8,2	4,1		Non	NR	mpo 720*2
	3	6,2	4,1				↓ mpo 50%
	3	5,8	3,4				
	3	5,8	3,1				
	4	5,9	2,5	Ib-2	Oui	NR	
	5	3,6	0		Oui	NR	
	6	0	0				
	9	0	0				
	12	0	0				

Patient BAGA	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 29/04/12	1	0	0				
	2	Pas d'urine	0				
	3	0	0				
	5	0	0				mmf 2g/j
	9	8,9	5,2		Non	Non	↓ mmf 50%
	12	8,8	4,3				
	12	8,7	5,1				
	13	9,4	4,8		Non	Non	
	13	8,4	4,2				
	14	8,3	3,8				
	15	9	4		Non	Non	
	17	9	3,9	Ib-2	Oui	AA	mpo 2*360
	19	Pas d'urine	3,9				
	21	8,2	4,2		Oui	Oui	↓ mpo 50%
	23	8,4	3,9				
	24	7,6	3,9		Oui	Oui	
	28	9,7	3,8		Oui	Oui	
	31	8,8	4,1		Oui	Oui	

Patient BARO	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 04/08/11	3	9,1	5,1	Ib-2	Non	Non	mmf 2g/j
	3	Pas d'urine	5,1				stop mmf
	4	8	5,1				
	5	Pas d'urine	4				PyVAN stade B
	5	5,1	3,6				
	6	5,3	3,6		Non	Non	
	8	3,5	2,6				
	9	3,7	2,3		AA	NR	
	10	4,1	0				
	10	3,7	2,3				
	11	4	2,5				
	12	3,8	2,7		AA	NR	
	13	3,6	2				
	14	0	2,7				
	16	5,2	2,7	Ib-2	Non	AA	
	26	3,9	0		Non	NR	
	28	0	0				
	29	Pas d'urine	0				
	30	Pas d'urine	2			AA	
	30	4,1	Pas de sang		Non		
	31	3,6	0				
	31	Pas d'urine	2				

Patient BIMA	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 14/11/10	0	3,9	0				mmf 2g/j adv 6mg
	1	8,5	0		Oui	NR	↓ mmf 50%
	2	8,7	0				
	3	9,3	0,0		Oui	NR	↓ adv 3mg
	9	8,0	0,0		Oui	NR	
	11	9,5	0,0		Oui	NR	
	13	8,8	0,0	IV	Oui	NR	

Patient BLMA	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 27/01/11	0	0	0				
	1	0	0				
	1	0	0				
	3	0	0				
	6	3,6	0		AA		
	7	7,4	0	Ib-2	Non	NR	
	8	Pas d'urine	2,5				
	12	0	0				

Patient BROYV	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R1 29/10/07	9	4,2	0,0				
	22	0,0	0,0				
	33	9,7	6,3		Non	NR	Diagnostic PyVAN
	34	10,7	6,7				
	35	10	6,6		Non	NR	
	38	Pas d'urine	6				
	39	9,6	6,5				
	40	9,8	6,8		AA		
	44	Pas d'urine	6,2				transplantectomie
		Pas d'urine	5,6				
		10,6	5,1				
		10,8	3,8		Oui	NR	
		Pas d'urine	2,8				
		Pas d'urine	0				
	R2 18/06/12	0	4,3	0			
0,5		7	0				
1		10	0		Oui	NR	
1.5		8	2,8				
2.5		7,2	2,8				
3		6,2	2,3				
4		6,3	0				
5.5		8,3	0				
7		7,6	0		Oui	NR	
8		6,7	0				
10		7,9	0				
12		7,1	0		Oui	NR	
15		7	0				
18		6,2	0,0	Ib-2	Oui	NR	
24		4,3	0				
29	5,1	0					
41	8,2	2					

Patient DAJE	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 28/04/12	2	8	0		Non	NR	mmf 2g/j tacro 10
	4	8,6	3,5				
	4	Pas d'urine	4,3				
	5	8,8	4,5		Oui	NR	↓ mmf 50% tacro 8
	6	9,4	5,5				stop mmf tacro 6.5
	6	7,6	4,3				
	7	7,7	3,9				
	7	7,7	4,1		Oui	NR	
	8	7,2	3,8				tacro 5
	9	6,9	3,7				
	10	5,2	2,8				tacro 3.5 mpo 2*360
	10	6,3	3,3	Ib-2	Oui	NR	
	13	4,7	0				switch CsA mpo 2*360
	21	4,6	0				
	21	3,9	0				

Patient DIMO	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS	
R1 28/12/10	0	0	0					
	1	0	0					
	1	0	0					
	2	0	0					
	3	0	0					
	5	0	0					
	6	0	0					
	7	0	0					
	7	0	0					
	9	10	0			Non	NR	
	10	8,5	2,6					
	11	7	0			Non	NR	
	12	4,4	0			Non	NR	
	13	6,3	0		Ib-2	Non	NR	
	15	3,6	0					
	21	0	0					
	24	0	0					
30	0	0						
R2 26/10/14	1	0	0					
	3	0	0					
	5	0	0					
	6	0	0					
	7	0	0					
	9	0	0					
	12	3,6	0					
14	0	0						

Patient EGFL	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 02/05/13	1	9,7	0		Non	NR	mmf 500*2 tacro 2*7
	4	9,3	3,9		Non	NR	
	6	8,1	4,0	Ib-2	Oui	NR	mmf 500*2 ↓ tacro 50% (5)
	14	0	0				
	25	0	0				

Patient GRMI	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 02/12/12	1	Pas d'urine	0				
	2	4,2	0				
	3	3,9	0		AA		
	3	6,5	2,5		Non	NR	
	4	6,4	0				
	6	5,8	0	Ib-2	Non	NR	
	8	4,4	0		Non	NR	
	9	0	0				
	12	0	0				
	24	0	0				

Patient GRPI	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 10/12/11	0	NR	0				
	1	0	0				
	1	0	0				
	2	0	0				
	3	3,6	0				
	4	0	0				
	5	0	0				
	6	0	0				
	8	7,9	3,6		Non	Non	
	12	7,7	2,7		Non	AA	
	13	NR	2,3				
	14	7,9	2,8				
	15	7	0				
	15	7,6	2,3	Ib-2	Oui	AA	
	16	7,3	0				
	16	7,5	2,3				
	17	3,9	2,5				
	18	0	0				
	18	NR	0				Ttt rejet/bolus CS Switch certican> tacro
	20	5,9	3		Non	AA	
	20	8,3	3				
	23	NR	3				
	26	NR	3,8				
	27	NR	3,9				
	32	8,7	4,7		Oui	Oui	
	33	9,2	4,7				
	34	8	3,5				
	35	8,1	3,6				
	37	8,1	2,8		Oui	AA	
	40	6,7	2				
	43	5,5	2,5				
	47	NR	2,3				
	49	3,6	0		Oui	NR	Transplantectomie PyVAN stade C
	49	NR	2,6				

Patient JARO	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 11/02/12	0	3,6	0		Non		
	2	8	3,7			Non	mmf 1g/j tacro 7
	2	Pas d'urine	3,9				
	3	7,3	4		Non	Non	↓ mmf 50% Tacro 6
	3	7	4,2				
	4	Pas d'urine	3,5				stop mmf tacro 4
	5	5	2,6				
	5	4,2	2		Non	AA	
	6	3,6	0				Reprise mmf 2*250
	7	0	0				
	9	0	2,8				Mmf 2*500
	11	4,8	2				
	12	4,8	0	Ib-2	Non	NR	
	13	0	0				
	14	4,1	0				Stop mmf
	14	4,6	2,3				Stop tacrolimus Switch certican
	15	4,7	2,5		Non	AA	
	16		0				
	25	4,8	0		Non	NR	
	31	4,9	0				
	31	5,2	0		Non	NR	

Patient LEGPH	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 08/11/10	0	0	0				
	2	0	0				
	3	0	0				
	3	8,2	0				
	6	6	0		Non	NR	
	7	6,3	0				
	8	7,1	0		Non	NR	
	11	6,3	0		Non	NR	
	12	5,2	0		Non	NR	
	13	5,2	0				
	17	4,2	0				
	20	8,6	0	Ib-2	Non	NR	
	38	5,8	0				

Patient PEAN	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 29/09/12	0	0	0				
	2	10,1	0		Non	NR	
	6	9,9	3,7				Baisse advagraf
	6	8,3	2,7		Non	NR	
	8	NR	3				
	12	8,6	3,1		Oui	NR	
	14	NR	3,8				
	17	NR	3,5				Stop tacro Switch CsA
	19	8,5	2,7	Ib-1	Oui	NR	
	23	7,7	2,3				
	27	NR	0				
	33	NR	0				
	36	5,7	0				

Patient SEMI	Mois post greffe	CV urine (logcop/ml)	CV sang (logcop/ml)	Typage	mutation VP1 urine	mutation VP1 sang	Modulation ttt IS
R 14/10/11	0	9,7	0				
	1	10,6	2,8		N61S	AA	Mmf 2g/j Tacro 11
	1	10,6	3,8				↓ mmf 50% (2*500) Tacro 8
	3	9,5	4,4		N61S	N61S	PyVAN stade B
	3	9,2	5,5				
	5	8,7	4,9				↓ mmf 50% (2*250) Tacro 6
	5	9,3	4,7				
	6	8,2	4,8		N61S	N61S	stop mmf Tacro monott 7
	7	8	4,6				
	8	7,8	4,1				
	9	9	3,8				
	10	8,2	3,9				
	11	8,8	3,7				
	12	9	4		Oui	Oui	
	16	8,7	3,5	IV	Oui	AA	
	17	8,6	3,6				
	18	8,3	3,6		Oui	Oui	
	20	8,6	3,2				
	23	8,2	3,6		Oui	Oui	
	24	8,4	3,6				
	25	8,5	3,9				
	28	Pas d'urine	3,4				
	44	Pas d'urine	2,6				

Vu, le Président du jury,

Berthe Marie IMBERT MARCILLE

Vu, le Directeur de thèse,

Céline BRESSOLLETTE-BODIN

Vu, le Directeur de l'UFR,

Virginie FERRE

Nom – Prénoms : PRZYROWSKI - Emilie, Clarisse

Titre de la thèse :

Variabilité du gène codant pour la protéine VP1 du polyomavirus BK. Implication dans l'échappement à la réponse humorale.

Résumé de la thèse :

Le polyomavirus BK est un virus ubiquitaire. Il reste à l'état latent chez les immunocompétents mais peut se réactiver chez les immunodéprimés. Il est à l'origine d'une pathologie grave chez les patients greffés de rein : la néphropathie à BKPyV. Il n'existe pas actuellement de traitement antiviral spécifique. Une réponse humorale est observée chez les patients avec la formation d'anticorps ayant une action neutralisante vis à vis du BKPyV. La région hypervariable de la boucle BC (TR) de la protéine de capsid VP1 est directement impliquée dans l'interaction du virus avec le récepteur cellulaire. C'est à ce niveau que se fait la reconnaissance par les anticorps neutralisants. Certains virus échappent à la réponse neutralisante. L'étude de la région TR par séquençage chez 15 patients a permis de mettre en évidence l'apparition de mutations chez ceux ayant des charges virales élevées et persistantes. L'étude de façon longitudinale du virus chez les patients présentant une virurie et/ou une virémie soutenue a montré l'apparition et l'accumulation de mutations au cours du temps malgré une hausse de la réponse anticorps. Les mutations ne sont présentes que chez les 9 patients avec des charges virales soutenues et ce malgré l'augmentation du titre d'anticorps neutralisant. Les 6 patients dont les charges virales baissent après la hausse de la réponse humorale ne présentent pas de mutations. Ainsi, une accumulation de mutations sur VP1 au cours du temps semble se produire impliquant un défaut de reconnaissance par les anticorps.

MOTS CLÉS : *POLYOMAVIRUS BK, NEPHROPATHIE, SEQUENCAGE, REPONSE HUMORALE, PROTEINE VP1, MUTATIONS.*

JURY

PRÉSIDENT :

Mme le Pr Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE, PU-PH, chef de service du laboratoire de virologie, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques - Nantes

ASSESEURS :

Mme le Dr Céline BRESSOLLETTE-BODIN, Directrice de thèse, MCU-PH, Laboratoire de virologie, UFR de Médecine - Nantes

Mme le Dr Marianne COSTE-BUREL, PH, Laboratoire de virologie - Nantes

Mme le Pr Maryvonne HOURMANT, PU-PH, Chef du service de néphrologie et immunologie clinique - Nantes

Mr le Dr Dorian MCILROY, MC, UFR de Médecine et UFR des Sciences et Techniques - Nantes

Adresse de l'auteur :

2 rue Jean-Pierre Pigot, 17139 DOMPIERRE SUR MER