



HAL
open science

Effet antiviral des interférons sur le virus BK

Élodie Martin

► **To cite this version:**

Élodie Martin. Effet antiviral des interférons sur le virus BK. Sciences pharmaceutiques. 2016.
dumas-01484552

HAL Id: dumas-01484552

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01484552>

Submitted on 7 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES D'INNOVATION
PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE TENANT LIEU DE

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 20 octobre 2016
Par

Elodie MARTIN

**EFFET ANTIVIRAL DES INTERFÉRONES SUR
LE VIRUS BK**

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Gilles DUVERLIE, Virologie, CHU Amiens

Membres :

Monsieur le Professeur Christophe CARNOY, Immunologie, Faculté de Pharmacie de Lille

Madame le Docteur Claire PRESNE, Néphrologie, CHU Amiens

Madame le Docteur Anne-Sophie HURTEL-LEMAIRE, Pharmacologie, CHU Amiens

Madame le Docteur Catherine FRANÇOIS, Virologie, CHU Amiens

Remerciements

Aux *membres du jury*,

Monsieur le Professeur Gilles DUVERLIE

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Chef du Service de Virologie du CHU d'Amiens
Doyen de la Faculté de Pharmacie
Directeur de l'Unité de Virologie UVCF EA4294*

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, de m'avoir ouvert les portes de la recherche et de m'accorder votre confiance quant à la réalisation de mes travaux au sein de votre unité de recherche.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Christophe CARNOY,

*Professeur des Universités – Faculté de Pharmacie de Lille
CIIIL – Center for Infection and Immunity of Lille
Lung Infection and Innate Immunity (LI3)
INSERM U1019 – CNRS UMR 8204*

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger cette thèse.

Veillez trouver l'expression de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Anne-Sophie HURTEL-LEMAIRE

*Praticien Hospitalier
Responsable du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU d'Amiens*

Vous avez accepté de participer au jury de cette thèse.

Je vous remercie de me faire l'honneur de votre présence.

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Claire PRESNE

*Praticien Hospitalier
Service de Néphrologie du CHU d'Amiens*

Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Catherine FRANÇOIS

*Maître de conférence des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire de virologie du CHU d'Amiens
Unité de Virologie UVCF EA4294*

Je te remercie énormément pour la confiance que tu m'accordes, ton soutien, tes conseils et ton aide tout au long de mon travail.

Je te remercie également de m'avoir permis de valoriser mes travaux à Lisbonne. Ce fut un très bon moment. L'aventure se poursuit avec ma thèse de sciences.

À toute l'équipe du laboratoire de virologie,

François HELLE, Etienne BROCHOT, Sandrine CASTELAIN et Abderrahmane BENGRINE

Je vous remercie pour vos conseils avisés, votre disponibilité et votre sympathie.

Véronique DESCAMPS, Virgine MOREL et Carole FOURNIER

Je vous remercie chaleureusement pour m'avoir transmis votre expérience.

Je vous remercie également pour votre patience dans mon apprentissage des différentes techniques que vous maîtrisez parfaitement.

Barbara DUCLERCQ

Je te remercie pour ta gentillesse.

Catherine MORISET

Je te remercie chaleureusement pour la bonne humeur que tu répands dans tout le labo.

Catarina OLIVEIRA

Je te remercie pour tous ces moments de complicité et de rires. À notre amitié, même à 2000 km de distance !

Lynda HANDALA

Je te remercie pour les bons moments passés ensemble et ceux à venir !

Je remercie tous les membres du laboratoire de virologie pour leur accueil chaleureux et leur convivialité.

À l'équipe du laboratoire de biochimie, notamment Coco et Christophe, je vous remercie pour vos conseils précieux dans la réalisation des western-blot.

À mes ami(e)s,

Hacibou, Cat' le problème, Minouche, Villa, Nao, Josie, Justine, MJ, Marion, la bande de Bourgneuf et leur folie, Yann & Déborah, Catarina le p'tit chef, Lynda ...

Merci pour tous les bons moments passés à Paris, à Lille, à Amiens, à la Rochelle ou ailleurs ! Vous êtes formidables ! Je vous aime !

À Adelin, qui a transformé ma vie. Un immense merci pour ton optimisme, ta façon de voir la vie, ta sociabilité et toutes tes innombrables qualités que notre entourage remarque.

À mes parents, je ne saurais suffisamment vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci de m'entourer de votre amour. Merci pour votre soutien au cours de ces longues années d'études.

À toute ma famille, je vous remercie de vos encouragements, de votre compréhension et de votre soutien tout au long de mes études.

Sommaire

I. INTRODUCTION	6
A. Le virus BK.....	7
1. Découverte et classification.....	7
2. Epidémiologie.....	7
a) Séroprévalence	7
b) Distribution mondiale des sous-types.....	8
c) Modes de transmission	9
3. Histoire naturelle de l'infection par le virus BK	10
a) Néphropathie associée au polyomavirus BK.....	10
b) Cystite hémorragique	11
c) Sténose urétérale	11
d) Autres pathologies liées à l'infection par le virus BK.....	12
e) Oncogénicité	12
4. Diagnostic.....	12
a) Diagnostic direct	12
b) Diagnostic indirect	13
5. Traitements	13
6. Principales caractéristiques virales.....	14
a) Structure de la particule virale	14
b) Cycle viral	16
B. L'interféron : acteur majeur du système immunitaire.....	19
1. Les interférons (IFN).....	19
a) Description et classification	19
b) Caractéristiques générales.....	19
c) Utilisation thérapeutique	20
2. La réponse interféron au sein du système immunitaire	21
3. Les interférons dans la lutte antivirale.....	22
4. Gènes de réponse à l'interféron et activités antivirales	24
5. Place de l'interféron dans la réponse immune à l'infection par le virus BK.....	26
II. OBJECTIFS.....	27
III. MATERIELS ET METHODES.....	29
1. Culture cellulaire	29
a) Lignées cellulaires.....	29
b) Stimulation cellulaire par les IFN	29
2. Virus	29
a) Production du virus BK en culture cellulaire	29
b) Détermination du titre infectieux viral (TCID ₅₀ /ml)	34
c) Infections cellulaires avec le virus BK produit	34
3. Analyse en PCR quantitative en temps réel (qPCR)	34
a) Détection et quantification des ARNm viraux par qPCR.....	34
4. Western-blotting.....	36
a) Anticorps utilisés.....	36
b) Etapes	36
5. Analyse transcriptionnelle par qPCR	36
6. Test de l'indoleamine 2,3-dioxygénase	37

a) Blocage de l'activité enzymatique de IDO.....	37
b) Mesure de la viabilité cellulaire	37
7. Test de la pyridone	37
8. Analyses statistiques.....	37
IV. RESULTATS	38
1. Effet antiviral des IFN sur le virus BK.....	38
a) Effet antiviral des IFN sur l'expression des ARNm viraux précoces (Ag-T) et tardifs (VP1) 38	
b) Effet antiviral des IFN sur l'expression de la protéine virale VP1.....	39
2. Implication de la voie de signalisation cellulaire Jak-STAT.....	42
a) Détection de la protéine P-STAT1	42
b) Détection de la protéine STAT-1	43
c) Inhibition de la voie Jak-STAT	44
3. Etude transcriptionnelle des ISG induits	46
4. Etude d'un candidat : IDO.....	49
a) Expression de VP1 en présence de L-Trp	50
b) Inhibition pharmacologique de l'activité enzymatique d'IDO.....	51
V. DISCUSSION	53
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	58
VII. BIBLIOGRAPHIE.....	60
VIII. ANNEXES	68

Index des figures et des tableaux

Figure 1 : Séroprévalence du virus BK en fonction de l'âge [10].....	8
Figure 2 : Distribution des sous-types du virus BK dans le monde [15]	9
Figure 3 : Evolution de l'infection à virus BK après transplantation rénale [29]	11
Figure 4 : Structure de la particule virale de la famille des Polyomaviridae.	14
Figure 5 : Génome du virus BK [50].....	15
Figure 6 : Le cycle de multiplication du virus BK [9]	17
Figure 7 : Voie de signalisation Jak-STAT des interférons de type I, II et III[79].....	23
Figure 8 : Cibles de quelques protéines antivirales induites par les IFN au cours du cycle viral.	25
Figure 9 : Production du virus BK en culture cellulaire	31
Figure 10 : Particules de virus BK dans les cellules Véro 3 mois après la transfection.	32
Figure 11 : Détection de l'Ag-T dans les cellules Véro au microscope à fluorescence.....	33
Figure 12 : Détection de VP1 dans les noyaux des cellules Véro au microscope à fluorescence.....	34
Figure 13 : Expression relative des ARNm viraux précoces (Ag-T) et tardifs (VP1) en présence des différents types d'IFN dans les cellules Véro infectées.....	39
Figure 14 : Expression de la protéine virale VP1 en présence d'IFN.....	41
Figure 15 : Expression de la protéine P-STAT1 (Y 701) en présence d'IFN.....	43
Figure 16 : Expression de la protéine STAT1 en présence d'IFN	44
Figure 17 : Expression de la protéine VP1 en présence d'IFN-gamma +/- pyridone.	45
Figure 18 : Expression relative des ARNm de différents ISG en présence des différents types d'IFN dans les cellules 293FT	47
Figure 19 : Expression relative des ARNm des 5 ISG fortement induit par l'IFN-gamma, un peu par l'IFN-alpha, et pas par l'IFN-lambda. (Extrait de la Figure 18)	48
Figure 20 : Schématisation des activités antimicrobienne et immunomodulatrice de IDO. (d'après Greco <i>et al.</i> [110])	49
Figure 21 : Expression de la protéine VP1 en présence d'IFN-gamma +/- L-Trp.....	50
Figure 22 : Expression de la protéine VP1 en présence d'IFN-gamma +/- 1-DL-MT	51
Tableau 1 : Exemples de quelques PRR et PAMP viraux associés [75].....	21
Tableau 2 : Exemple de quelques protéines antivirales dont l'expression est induite par les interférons.....	24
Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées en PCR.....	35

Abréviations

Ag-T : Antigène grand T

Ag-t : Antigène petit t

BKV : BK virus

cDNA : ADN complémentaire

CSK : 10 Mm PIPES pH 6,8 ; 100 mM NaCl; 300 mM sucrose; 3 mM de MgCl₂ ; 1mM d'EDTA

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DOC : acide désoxycholique

EDTA : Ethylène diamine tétra acétique acide

EiF2 α : *Eukaryotic initiation factor 2 alpha*

FITC : isothiocyanate de fluoréscéine

GAS : *interferon Gamma Activated Sequence* = Séquence d'activation de l'interféron gamma

HRPTEC : cellules épithéliales tubulaires proximales rénales humaines

IDO : indoleamine 2,3 dioxygénase

IFN : Interféron

IFNAR / IFNLR / IFNGR: *Interferon Alpha/Lambda/Gamma Receptor*

IFITM : *Interferon Induced Transmembrane*

Il : Interleukine

IRF : *Interferon Regulatory Factor* = facteur de régulation de l'interféron

ISG : *Interferon Stimulated Genes* = gene de réponse à l'interféron

ISRE : *Interferon-Stimulated Response Element*

Jak-STAT : *Janus kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription*

LyT : lymphocyte T

LyTh17 : lymphocyte T *helper* = auxiliaire, caractérisé par la production d'interleukine-17

LyT_{rég} : lymphocyte T régulateur

OAS : *Oligoadenylate Synthetase*

MOI : Multiplicity Of Infection = multiplicité d'infection

p53 : protéine 53

pRb : protéine du Rétinoblastome

PAMP : *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PBS : *Phosphate buffered saline* : tampon phosphate salin

PCR : *Polymerase Chain Reaction* = Réaction de polymérisation en chaîne

PFA : paraformaldéhyde

PKR : Protéine Kinase R

PRR : *Pathogen Recognition Receptor*

P-STAT1 : forme phosphorylée de la protéine STAT1

RE : réticulum endoplasmique

RIPA : Radio ImmunoPrecipitation Assay

SDS-Page : *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

STAT 1/2 : *Signal Transducer and Activator of Transcription 1/2*

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TCID₅₀ : *Tissue culture infectious dose 50* = dose infectant 50% des cultures en cellules

TLDA : *TaqMan Low Density Array*

TLR : *Toll-Like Receptor*

Trp : Tryptophane

VP1/2/3 : *Viral Protein 1/2/3* = protéine virales 1/2/3

I. INTRODUCTION

Le virus BK est un pathogène ubiquiste. Il établit une infection persistante asymptomatique dans les voies rénales de 80% de la population humaine. Son pouvoir pathogène se manifeste essentiellement chez les transplantés rénaux, pour lesquels l'immunosuppression induite par les traitements immunosuppresseurs favorise la réplication virale. Il est responsable de néphropathies chez environ 10% des transplantés rénaux [1]. Il s'agit d'une complication sévère car évoluant vers une dégradation progressive de la fonction du greffon jusqu'à sa perte chez 30 à 80% des patients présentant une infection active [2-4]. Du fait de l'absence de traitements antiviraux spécifiques, la prise en charge repose sur la réduction des traitements immunosuppresseurs mais le risque de survenue de rejet immunologique du greffon est alors augmenté. Devant cette problématique et dans le contexte d'un nombre croissant de transplantations rénales, les recherches menées sur le virus BK se sont multipliées ces dernières années.

L'augmentation des pathologies associées au virus BK en même temps que l'utilisation de traitements immunosuppresseurs de plus en plus puissants souligne un lien étroit entre la réponse immunitaire de l'hôte et la réactivation virale. Cependant la réponse immune à l'infection par le virus BK est peu documentée.

Les interférons (IFN), connus pour leurs propriétés antivirales sont des acteurs majeurs du système immunitaire. Ils interviennent en première ligne de défense en réponse à une infection virale et ils sont essentiels à la mise en place de la réponse immune adaptative. Dans ce travail, nous étudions l'effet antiviral des IFN sur l'infection par le virus BK en culture cellulaire.

Dans une première partie je détaillerai les caractéristiques du virus BK et les pathologies associées puis dans une deuxième partie je présenterai les différents types d'IFN et leur action antivirale en terminant par leur place dans la réponse immune à l'infection par le virus BK.

A. Le virus BK

1. Découverte et classification

Le virus BK, ou *polyomavirus hominis 1*, a été identifié et décrit pour la première fois en 1971 par Sylvia Gardner[5]. Les particules virales ont été isolées en culture cellulaire à partir d'un échantillon d'urine chez un patient soudanais ayant les initiales BK. Ce patient avait reçu une greffe rénale et avait présenté une sténose urétérale trois mois et demi après la transplantation. Le nouvel agent infectieux découvert a été décrit comme étant un membre des polyomavirus.

Avant le septième rapport du comité international de taxonomie des virus en 2000, polyomavirus et papillomavirus étaient deux genres classés dans la famille des *Papovaviridae*. Le genre polyomavirus a été retiré de cette famille et a été élevé à un statut indépendant : la famille des *Polyomaviridae*. Les différences de taille de capsid et de génome entre les polyomavirus et les papillomavirus ont incité ce changement.

En 1953, le premier polyomavirus, le polyomavirus murin (mPy) a été isolé par Ludwig Gross [6]. Etant responsable de différentes tumeurs chez la souris, il a été nommé « polyoma » à partir du grec, le préfixe poly signifiant plusieurs et le suffixe oma signifiant tumeurs. En 1960 le virus vacuolisant simien 40 (Simian Vacuolating Virus 40 ou SV40) a ensuite été découvert [7]. Ainsi dénommé car il produit un effet cytopathogène de type vacuolisant lorsqu'il est cultivé sur des cellules de rein de singe vert (cellules Véro). Les premiers polyomavirus à tropisme humain ont été découverts une dizaine d'années après le SV40 avec le virus JC et le virus BK en 1971 [8]. Depuis 2007, 11 nouveaux polyomavirus ont été isolés chez l'homme [9]. Les hôtes naturels pour ces virus sont les humains, les primates, les rongeurs, les lapins et les oiseaux.

2. Epidémiologie

a) Séroprévalence

Le virus BK est ubiquiste avec une séroprévalence élevée, estimée supérieure à 80% dans la population générale à l'âge adulte. Le seul réservoir connu pour ce virus est l'homme.

Les études de séroprévalence indiquent que les primo-infections dues au virus BK surviennent indépendamment de l'infection par le virus JC pendant l'enfance. Kean *et al.* ont montré que la séroprévalence chez les enfants âgés de moins de 21 ans pour tous les

polyomavirus est similaire à celle retrouvée dans la population adulte suggérant une primo-exposition au virus pendant l'enfance (Figure 1) [10].

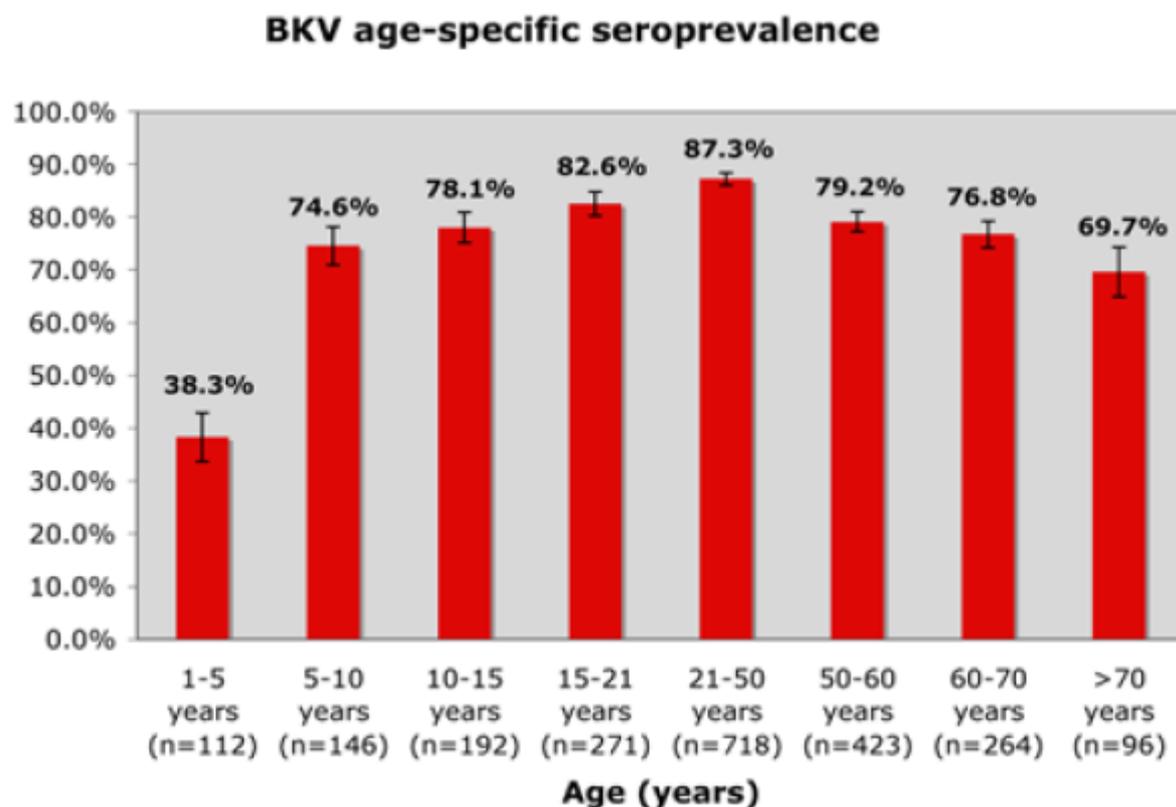


Figure 1 : Séroprévalence du virus BK en fonction de l'âge [10]

La séroprévalence est la plus basse dans les premiers mois de la vie après la perte des anticorps maternels puis elle augmente à l'âge adulte [11]. Une diminution de la séroprévalence du virus BK après l'âge de 50 ans a été montrée par plusieurs équipes [10, 12-14]. En général aucune différence n'est observée entre les hommes et les femmes.

b) Distribution mondiale des sous-types

Sur la base du génotypage et du typage sérologique, l'analyse des souches isolées dans différentes régions du monde a permis de définir 4 sous-types du virus BK numérotés de I à IV [11]. Le sous-type I est le plus répandu dans le monde (80%) suivi du sous-type IV (15%) situé dans le sud-est de l'Asie et en Europe, les sous-types II et III sont rarement retrouvés (Figure 2).

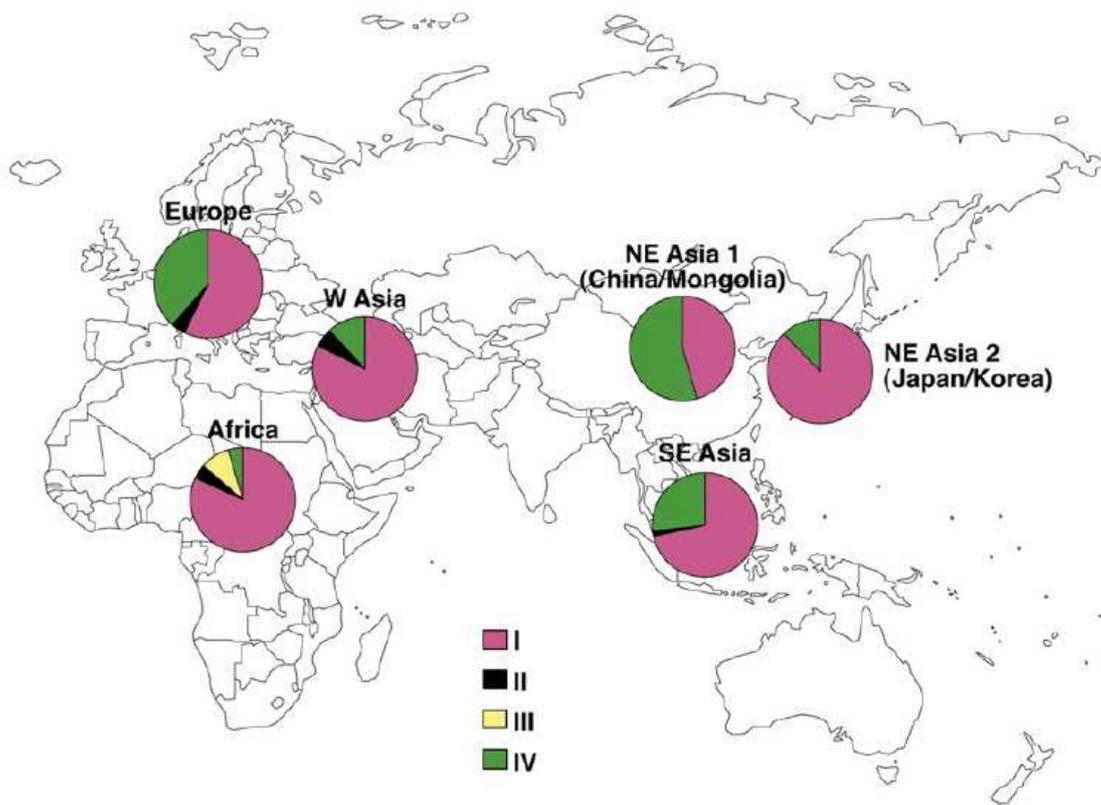


Figure 2 : Distribution des sous-types du virus BK dans le monde [15]

A partir d'analyses phylogénétiques des séquences du génome complet, le sous-type I a été divisé en 4 sous-groupes (Ia, Ib-1, Ib-2 et Ic) [15-17] et le sous-type IV en 6 sous-groupes (IVa-1, IVa-2, IVb-1, IVb-2, IVc-1, IVc-2) [18]. Chaque sous-groupe a un profil de distribution géographique unique.

c) Modes de transmission

La voie naturelle de la transmission du virus BK n'a pas été établie. Le profil de prévalence en fonction de l'âge suggère fortement que les humains sont infectés après la naissance à partir d'autres individus infectés par le virus BK (transmission horizontale inter-humaine). La transmission du virus par voie orale respiratoire est l'hypothèse la plus commune. L'ADN viral a été détecté dans la salive et les tissus amygdaliens [19, 20]. D'autres voies de transmission ont été évoquées : la transmission par de l'eau ou des aliments contaminés avec des sécrétions infectieuses humaines [21], la transmission par transfusion de produits sanguins [22], la transmission par transplantation d'organe, en particulier les allogreffes rénales [23] ainsi que la possibilité d'une transmission verticale par voie transplacentaire [24].

3. Histoire naturelle de l'infection par le virus BK

L'infection primaire par le virus BK est asymptomatique ou pourrait être à l'origine de signes d'infection respiratoire non spécifiques. Suite à cette primo-infection, le virus BK dissémine dans l'organisme probablement par voie sanguine et atteint les organes cibles, particulièrement l'urothélium et les cellules épithéliales tubulaires rénales, où il persiste dans un état latent.

La réactivation virale à partir des sites de latence est observée le plus souvent chez l'immunodéprimé mais également chez l'immunocompétent (4-7%) avec une détection asymptomatique du virus BK dans les urines [25, 26].

Le pouvoir pathogène du virus BK se manifeste uniquement chez les personnes immunodéprimées, en particulier les transplantés rénaux et les transplantés de moelle osseuse. Chez ces personnes, l'immunosuppression thérapeutique favorise la réactivation virale et peut conduire à la survenue de graves pathologies rénales décrites ci-après.

a) Néphropathie associée au polyomavirus BK

En transplantation rénale, la réactivation du virus BK commence par une multiplication virale intense et prolongée dans les cellules épithéliales rénales et le tractus urinaire. Le virus BK est excrété dans les urines par la lyse des cellules urothéliales infectées (virurie). Cette « virurie BK » est détectée chez 30 à 50% des patients et est habituellement asymptomatique. La lyse des cellules épithéliales conduit au passage du virus dans le sang par lésion de la membrane basale (virémie). Chez les transplantés rénaux, la prévalence de la « virémie BK » est estimée entre 10,5 et 13% [3]. A ce stade, le risque est l'évolution vers une néphropathie tubulo-interstitielle. La maladie débute par une infiltration tissulaire puis évolue vers l'atrophie tubulaire et la fibrose interstitielle [27]. Cette néphropathie va conduire à une perte progressive de la fonction du greffon chez les transplantés rénaux (Figure 3) [28].

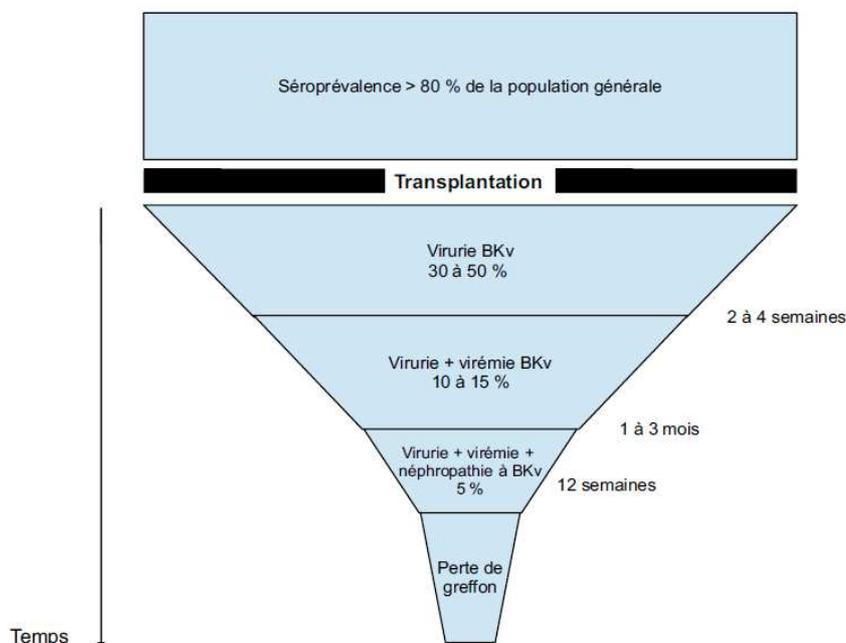


Figure 3 : Evolution de l'infection à virus BK après transplantation rénale [29]

La « virurie BK » survient dans les premières semaines post-transplantation, suivie par la « virémie BK » environ 1 à 3 mois après. De rares cas de néphropathie sans virémie ou de virémie sans virurie peuvent survenir. La néphropathie survient dans les trois quarts des cas dans la première année post-transplantation quand l'immunosuppression est la plus forte liée notamment aux stratégies d'induction.

Le principal facteur favorisant la pathogénèse virale est l'immunosuppression thérapeutique conduisant à un déséquilibre entre la multiplication virale et la réponse immune qui n'est plus en mesure de contrôler l'infection virale. Le développement de la néphropathie ne résulte pas seulement de l'immunosuppression thérapeutique mais aussi de l'association de plusieurs facteurs incluant les caractéristiques du donneur, du receveur, du virus (mutations), le degré d'immunosuppression et le type de traitement [1, 30, 31].

b) Cystite hémorragique

Le virus BK est associé à la survenue de cystite hémorragique chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques [32]. La cystite hémorragique associé au virus BK est observée chez 5% à 15% des greffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH) [33].

c) Sténose urétérale

Historiquement, le virus BK a été isolé chez un patient transplanté rénal qui présentait une sténose urétérale. L'infection par le virus BK peut entraîner une obstruction urétérale due une ulcération et une sténose de l'anastomose urétéro-vésicale. La sténose urétérale associée

au virus BK a été décrite chez les transplantés rénaux ainsi que chez les transplantés de CSH [34].

d) Autres pathologies liées à l'infection par le virus BK

Chez des patients fortement immunodéprimés, des cas de pneumopathie, méningo-encéphalite ou d'infection disséminée avec atteinte vasculaire ont été décrits. Récemment, le virus BK a aussi été impliqué dans une pathologie des glandes salivaires chez les sujets séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [35-39].

e) Oncogénicité

La capacité d'interaction de l'antigène grand T (Ag-T), protéine virale, avec des gènes suppresseurs de tumeurs pRb et p53 peut laisser penser que ce virus pourrait être impliqué dans l'induction de tumeurs malignes. De plus, le génome viral du virus BK a été retrouvé dans plusieurs tumeurs. Cependant, à ce jour, aucun argument formel ne permet de conclure sur la responsabilité directe du virus BK dans ces processus tumoraux [40, 41]. En effet, sa présence à l'état latent dans les tissus humains normaux ainsi que sa grande prévalence dans la population humaine rendent difficile l'évaluation de son implication dans la pathogénie des tumeurs malignes.

4. Diagnostic

Le diagnostic de l'infection à virus BK est le plus souvent réalisé lors d'examens de routine. Il est de plus en plus fréquent en raison de l'incidence croissante des réactivations à virus BK en transplantation rénale. Les options de traitement de la néphropathie à virus BK étant limitées, l'objectif du dépistage du virus BK est de faciliter le diagnostic précoce des patients viruriques ou virémiques afin d'intervenir avant la manifestation de la maladie. Le diagnostic d'infection active à virus BK est direct. Il repose principalement sur la détection et la quantification de l'ADN viral dans les urines et/ou le sang.

a) Diagnostic direct

Biologie moléculaire

Le génome viral peut être détecté et quantifié par amplification génique (PCR) dans les urines, le sang ou le plasma. Les charges virales BK peuvent être mesurées par PCR en temps réel. La PCR BK dans les urines a une excellente valeur prédictive négative pour la néphropathie (100%). En revanche, ce test réalisé isolément présente une mauvaise valeur prédictive positive car la proportion de patients excréteurs asymptomatiques de virus BK dans

les urines est forte. La PCR BK dans le plasma a une meilleure valeur prédictive positive (50%) [42]. L'*American Society of transplantation (Infectious Disease Community of Practice Guidelines)* et *KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes guidelines)* recommandent un dépistage de l'infection à virus BK pour tous les patients transplantés rénaux par PCR BK plasmatique [33, 43].

Cytologie urinaire

Les *Decoy cells* (ou « cellules pièges » en français, car elles peuvent être confondues avec des cellules urothéliales malignes) sont des cellules infectées. Elles peuvent être mises en évidence dans les urines par coloration de Papanicolaou. Il s'agit de cellules épithéliales tubulaires ou urothéliales volumineuses, hyperbasophiles avec des inclusions virales intranucléaires et un aspect en verre dépoli. Leur présence est un marqueur d'activation et de réplication virale. Ce test est moins sensible que la biologie moléculaire pour la détection et le diagnostic de la néphropathie liée au virus BK.

Anatomo-pathologie

Le diagnostic de certitude d'une néphropathie à virus BK est histologique sur biopsie rénale. Il repose sur l'identification d'un effet cytopathogène viral associé à des lésions tubulo-interstitielles et à la détection des antigènes viraux (le plus souvent l'Ag-T) par immunohistochimie.

b) Diagnostic indirect

Sérologique

La recherche d'anticorps spécifiques n'est pas réalisée en raison de la forte prévalence des anticorps dans la population générale et de l'immunodépression des patients concernés.

5. Traitements

Il n'existe aucun traitement antiviral spécifique de l'infection à virus BK. La prise en charge des infections à virus BK repose sur l'amélioration du contrôle immunitaire, quel que soit le stade de la maladie, en diminuant l'immunosuppression pharmacologique ou en modifiant le type d'immunosuppresseurs tout en essayant d'éviter le rejet du greffon [33, 42]. A ce jour, il est difficile de retenir un protocole standard de baisse de l'immunosuppression chez les patients qui répliquent le virus BK de façon active.

Une activité antivirale a été montrée pour plusieurs molécules *in vitro* : Cidofovir et Brincidofovir, Leflunomide, Fluoroquinolones. Cependant, l'efficacité de ces molécules *in vivo* reste encore à prouver [44-48].

6. Principales caractéristiques virales

a) Structure de la particule virale

Le virus BK est un virus nu. Les particules virales sont constituées d'une capsidie icosaédrique à symétrie cubique de 40,5 à 44 nm de diamètre renfermant le génome viral. Elles sont composées de 88% de protéines et de 12% d'ADN [49]. Les polyomavirus, étant non enveloppés, sont résistants aux solvants, aux acides et à l'éther et relativement stables à la chaleur (50°C, 1h) favorisant leur survie dans le milieu extérieur.

La capsidie virale est composée de 360 copies d'une protéine structurale majeure VP1, et de 30 à 60 copies de deux protéines structurales mineures VP2 et VP3. Leur assemblage forme un icosaèdre constitué de 72 capsomères pentamériques. Chaque pentamère se compose de cinq protéines VP1 et d'une protéine centrale VP2 ou VP3 insérée dans la cavité interne formée par l'association de cinq molécules de VP1. Les extrémités C-terminales des molécules VP1 s'accrochent entre elles et avec les capsomères voisins. Les molécules VP2 et VP3 sont présentes à l'intérieur du virion et ne sont pas liées de façon covalente (Figure 4).

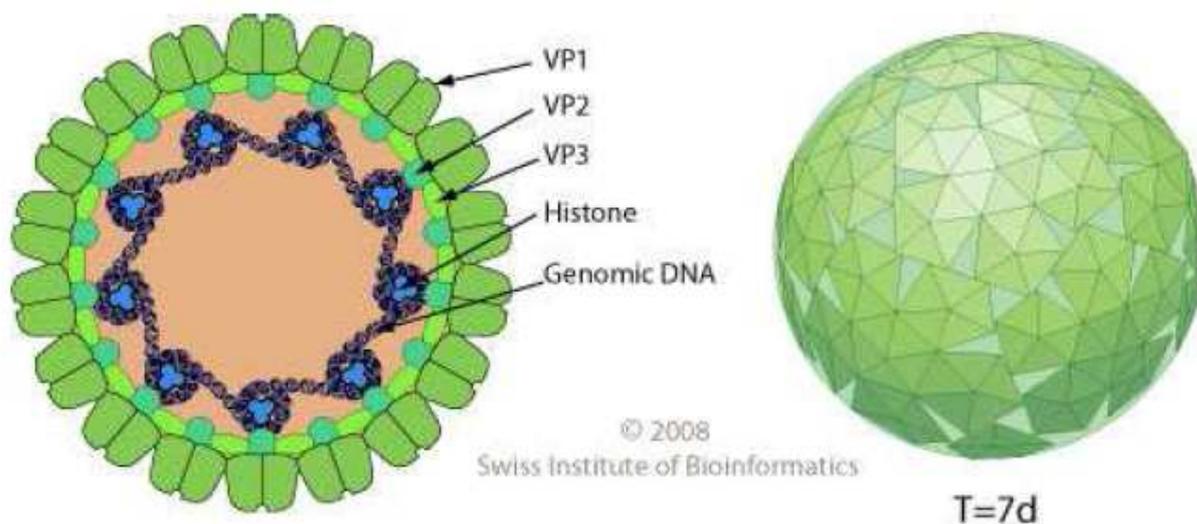


Figure 4 : Structure de la particule virale de la famille des Polyomaviridae.

(http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/148.html)

Le génome viral est une molécule d'ADN double brin, circulaire, super-enroulée d'environ 5300 paires de base associées aux histones cellulaires H2A, H2B, H3 et H4 ;

l'ensemble formant un mini chromosome circulaire viral. Il est organisé en trois régions fonctionnelles : une région codante précoce et une région codante tardive génétiquement conservée, non chevauchantes, de tailles grossièrement équivalentes, séparées par une région régulatrice non codante hypervariable (Figure 5).

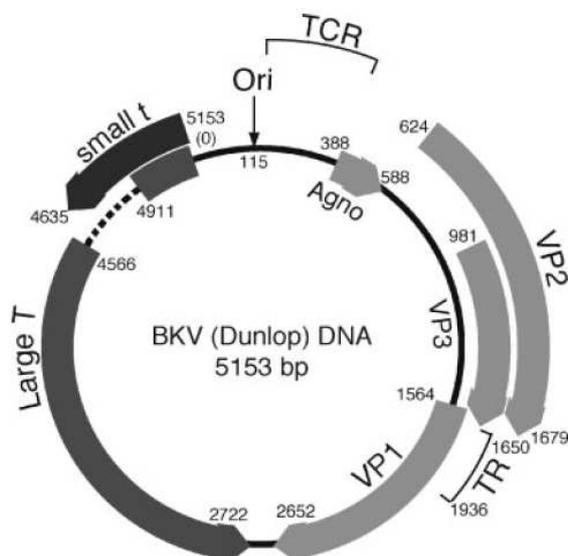


Figure 5 : Génome du virus BK [50]

ADN double brin de la souche Dunlop. TR est la région type de 287 pb souvent utilisée pour classer les isolats du virus BK en sous-types et sous-groupes.

La région régulatrice non codante NCCR (Non Coding Regulatory Region) ou NCCR (Non Coding Control Region) a une taille variant de 300 à 500 pb selon les isolats. Elle est comprise entre le codon d'initiation ATG pour l'Ag-T de la région précoce et le site d'initiation pour l'agnoprotéine du côté de la région tardive. Elle comprend l'ensemble des éléments cis-régulateurs nécessaires à la réplication et à la transcription du génome viral. Elle contient l'origine de la réplication de l'ADN (Ori), le promoteur bidirectionnel, les sites de liaison aux facteurs de transcription cellulaires, et les sites de liaison à l'Ag-T. La région NCCR est sujette à des variations génotypiques. Elle est susceptible de subir des modifications telles que des insertions, des délétions ou des réarrangements permettant de distinguer les souches natives dites « archétypes » des souches réarrangées dites « variantes ».

La région codante précoce, comme son nom l'indique, est la première partie du génome à être transcrite et traduite au cours du cycle viral. Elle couvre 2,4 kb et sa transcription débute peu de temps après l'infection. Elle comprend un cadre de lecture correspondant aux protéines virales non structurales : Antigène grand T (Ag-T) et antigène petit t (Ag-t). Ces protéines sont produites par épissage alternatif d'un précurseur commun

d'ARN pré-messager et sont distinguées en antigène grand T et petit t selon leur taille. Des protéines supplémentaires de taille intermédiaire sont produites. Elles correspondent à des formes tronquées de l'antigène grand T (Ag-TruncT) [51].

L'Ag-T et l'Ag-t sont responsables de la transformation cellulaire dans le cas des Polyomavirus à caractère oncogène [52]. Leurs expressions persistent pendant toute la durée du cycle.

L'Ag-T est certainement la protéine virale la plus importante car elle réalise plusieurs fonctions critiques pour le cycle viral [53]. En effet, elle assiste et régule la machinerie cellulaire de l'hôte dans la transcription, la traduction et la réplication en interagissant directement avec le génome viral. Elle agit aussi au niveau de la croissance cellulaire en se liant à pRb et p53, deux protéines régulant l'apparition de tumeurs.

La région codante tardive couvre 2,3 kb et contient l'information génétique de la protéine structurale majeure VP1 et des deux protéines structurales mineures VP2 et VP3 ainsi qu'une protéine non structurale appelée agnoprotéine dont la fonction est inconnue à ce jour.

b) Cycle viral

Le cycle infectieux du polyomavirus est arbitrairement divisé en phase précoce et tardive. La phase précoce commence par l'interaction initiale du virus avec la surface des cellules cibles et se termine au début de la réplication virale de l'ADN. La phase tardive inclut tous les événements subséquents qui mènent à l'assemblage et à la libération des virions néoformés. La libération des nouveaux virions marque l'achèvement du cycle de réplication virale (Figure 6).

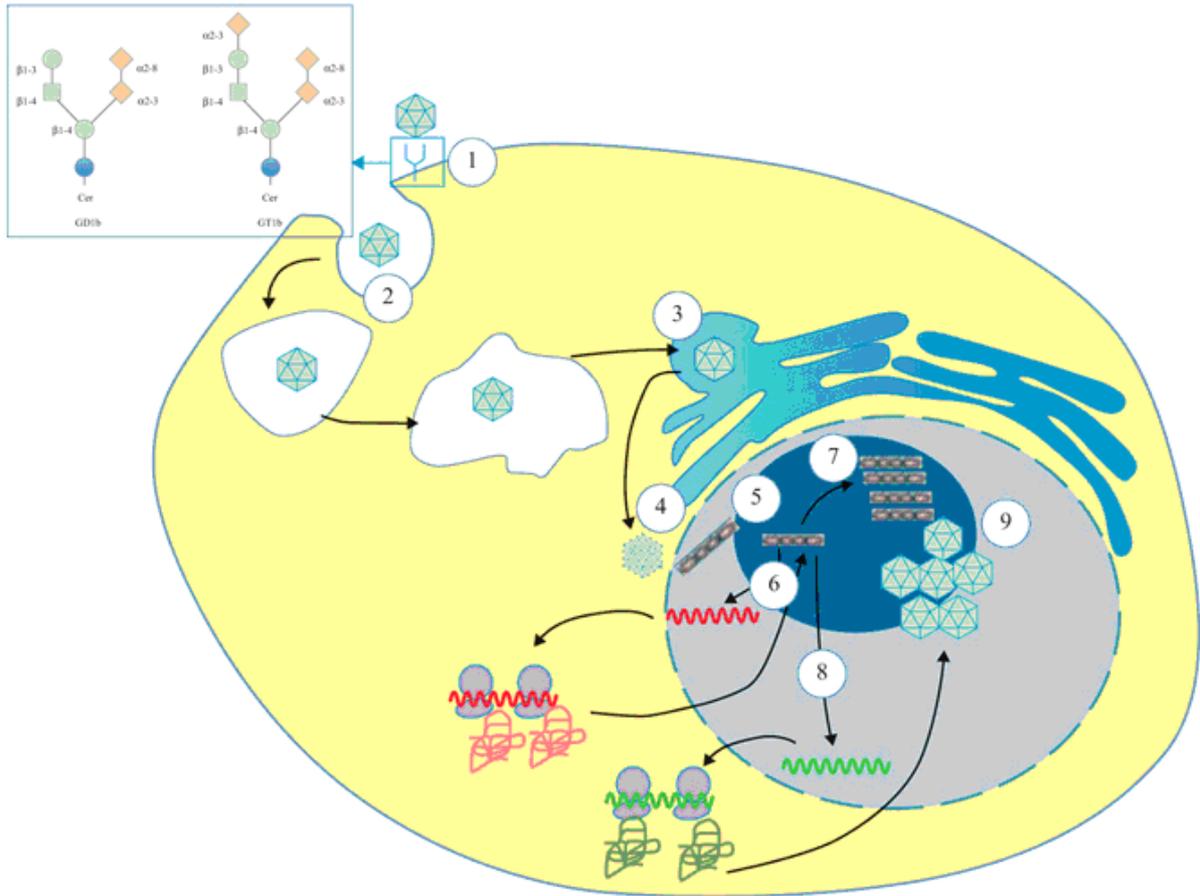


Figure 6 : Le cycle de multiplication du virus BK [9]

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

Le tropisme du virus BK est essentiellement rénal. Les particules virales s'adsorbent à la surface des cellules cibles en interagissant avec des récepteurs cellulaires qui sont des glycoprotéines portant des gangliosides à leur extrémité N-terminale. L'entrée virale du virus BK serait dépendante de sa capacité à interagir avec les gangliosides GD1b et GT1b présentant un motif acide di-sialique alpha 2,8 [54]. La protéine VP1 est responsable de cette interaction [55]. Le virus pénètre dans la cellule par endocytose en utilisant la voie des cavéolines [56, 57].

Une fois à l'intérieur des cavéoles, les particules virales sont transportées par le réseau de microtubules jusqu'au réticulum endoplasmique (RE) [58]. La décapsidation virale

commencerait au niveau du RE et l'exposition des signaux de localisation nucléaires présents sur VP2/VP3 permettrait de guider la particule vers le noyau. Le génome viral est libéré dans le noyau. Ainsi démarre la transcription des gènes précoces qui codent l'Ag-T et l'Ag-t. La réplication est initiée par l'Ag-T qui se lie à l'origine de réplication. Le virus BK ne codant pas sa propre polymérase virale, l'Ag-T recrute les protéines cellulaires nécessaires à la réplication de l'ADN viral. L'Ag-T active aussi la transcription des gènes tardifs codant les protéines VP1, VP2, VP3 et l'agnoprotéine. Après leur traduction dans le cytoplasme, les protéines de capsidie grâce aux signaux d'adressage nucléaire sont transportées dans le noyau où a lieu l'assemblage.

Les virions néo-formés seraient libérés par lyse des cellules infectées. Le virus est capable de s'installer dans l'urothélium et les cellules épithéliales tubulaires rénales, sous une forme non répliquative ou avec une réplication minimale (forme latente).

B. L'interféron : acteur majeur du système immunitaire

Les IFN sont des cytokines clés de l'induction d'un état antiviral cellulaire. Ils interviennent en première ligne de défense face aux infections virales. Après avoir présenté les différents types d'IFN et décrit brièvement leur mécanisme d'induction en réponse à une infection virale, je détaillerai leur mécanisme d'action, en particulier la principale voie de signalisation cellulaire impliquée dans la défense antivirale, puis je terminerai par un état des données actuelles sur l'interféron dans la réponse immune à l'infection par le virus BK.

1. Les interférons (IFN)

a) Description et classification

Les interférons sont des polypeptides, appartenant à la famille des cytokines de classe II. Ils ont été décrits pour la première fois en 1957 par Isaacs et Lindenman. Leur nom provient de leur capacité à « interférer » avec la réplication virale [59]. Ils ont été classés en trois grands groupes d'après leurs caractéristiques structurales, leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques et leurs activités biologiques. Ainsi on distingue :

- les IFN de type I comprenant les IFN-alpha (classés en 13 sous-types), beta, ϵ , κ et ω ,
- les IFN de type II représentés uniquement par l'IFN-gamma,
- les IFN de type III comprenant les IFN-lambda 1, lambda 2 et lambda 3 (anciennement intitulés interleukine-29 (IL-29), IL-28A, et IL-28B) et lambda 4 [60-62].

Les IFN, en plus de leurs propriétés antivirales, ont des propriétés antiprolifératives et immunomodulatrices.

b) Caractéristiques générales

L'IFN de type I

La production d'IFN de type I est induite rapidement, dans les heures suivant l'infection virale. La plupart des cellules ont la capacité de produire de l'IFN de type I quand elles sont infectées par un virus. Cependant, au cours d'une infection, des niveaux élevés d'IFN de type I sont produits par les cellules sentinelles du système immunitaire telles que les cellules dendritiques plasmacytoïdes [63, 64]. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes agissent de façon paracrine pour induire un état antiviral et activer d'autres types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire innée et adaptative [65]. L'interféron de type I possède

une forte activité antivirale et est capable d'induire un fort état antiviral dans une large variété de cellules [66, 67].

L'IFN de type III

Les IFN de type I et III sont souvent considérés comme les classes antivirales et sont souvent co-exprimés ensemble par les cellules infectées par des virus. La différence la plus importante entre les IFN de type I et de type III concerne la distribution des récepteurs. En effet, alors que les récepteurs à l'IFN de type I sont présents sur la grande majorité des cellules, la distribution des récepteurs à l'IFN de type III semble limitée principalement aux cellules épithéliales [68].

L'IFN de type II

La production de l'IFN-gamma est restreinte aux cellules du système immunitaire. En effet l'IFN-gamma est sécrété par les cellules NK et les lymphocytes T en réponse aux antigènes ou aux mitogènes [69, 70]. Presque tous les types cellulaires sont capables de répondre à l'IFN-gamma car les récepteurs à l'IFN-gamma sont largement exprimés [71]. L'interféron de type II possède une activité antivirale mais celle-ci n'est pas sa fonction biologique primaire. Sa fonction est principalement immuno-régulatrice. Il joue un rôle central dans le développement des réponses immunes anti-tumorales et il peut amplifier l'induction des activités antivirales des IFN-alpha et beta. Ainsi type I et II travaillent souvent ensemble pour activer une variété de réponses immunes innées et adaptatives conduisant à une immunité antitumorale et à une élimination des cellules infectées [69, 72].

c) Utilisation thérapeutique

Les IFN sont utilisés dans la prise en charge de plusieurs maladies.

Actuellement, l'IFN de type I est le seul type d'IFN commercialisé dans le traitement d'infections virales. En effet, l'IFN-alpha2 est indiqué dans le traitement des hépatites B et C.

Par ailleurs, les IFN-alpha2a et 2b sont aussi indiqués dans certaines leucémies et lymphomes ainsi que certaines tumeurs solides. L'IFN-beta est indiqué dans le traitement de la sclérose en plaques. L'IFN-gamma est commercialisé dans le traitement d'infections graves en cas de granulomatose septique chronique ou en cas d'ostéoporose maligne sévère. Seuls les IFN de type III, découverts en 2003 n'ont pas encore d'application en clinique.

2. La réponse interféron au sein du système immunitaire

L'invasion virale de la cellule hôte engendre une réponse immunitaire avec ses deux composantes innée et adaptative. La première étape est l'identification de l'agent pathogène. Les cellules de l'immunité innée (monocytes / macrophages, cellules dendritiques, polynucléaires, cellules NK, mastocytes) reconnaissent les pathogènes grâce à des « détecteurs » nommés PRR (*Pathogen Recognition Receptors*).

Les PRR détectent des profils moléculaires particuliers des pathogènes appelés PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Ces PRR sont situés dans différents compartiments cellulaires : au niveau de la membrane plasmique, de la membrane des endosomes, ou dans le cytosol. Ceci leur permet la détection virale à de multiples emplacements. De nombreux PRR différents ont été décrits. Ces PRR variés permettent la reconnaissance de PAMP viraux différents (Tableau 1) [73, 74].

PRR	Localisation	PAMP viraux
RLR (<i>Retinoic acid-inductible gene 1-like receptors</i>)	cytosol	ARN viraux
ALR (<i>AIM2-like receptors</i>)	cytosol	ADN viraux
TLR 1, 2 et 4	membrane plasmique	glycoprotéines virales
TLR 3, 7 et 9	membrane des endosomes	acides nucléiques viraux
2'5'OAS (<i>Oligoadenylate synthetase</i>) RNaseL	cytosol	ARN viraux
cGAS (<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i>)	cytosol	ADN viraux et autres ?

Tableau 1 : Exemples de quelques PRR et PAMP viraux associés [75]

Initialement découverts chez la drosophile, les TLR (*Toll-Like Receptors*) sont les premiers et les mieux caractérisés des PRR impliqués dans la reconnaissance des virus [76-78]. A ce jour, les PRR impliqués dans la reconnaissance des polyomavirus n'ont pas été identifiés.

La reconnaissance PAMP - PRR déclenche différentes voies de signalisation cellulaire, selon la nature et la localisation du récepteur PRR, aboutissant à l'expression de diverses molécules :

- des prostaglandines, des chimiokines (IL-8, MCP-1, RANTES), et des cytokines inflammatoires (TNF, IL-1, IL-12) qui permettent le recrutement et l'activation des phagocytes (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques) sur le lieu de l'infection,
- des molécules endothéliales d'adhérence (sélectine E),
- des molécules de co-stimulation (CD80, CD86) nécessaires à l'activation des médiateurs de la réponse immunitaire adaptative parmi lesquels on trouve les lymphocytes B et les lymphocytes T (CD8+ et CD4+),
- des cytokines antivirales telles que les IFN.

3. Les interférons dans la lutte antivirale

Malgré les différences parfois importantes constatées entre les différents types d'interféron, ils partagent néanmoins des voies de signalisation communes comme la voie Jak-STAT (*Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription*) impliquée dans la défense antivirale. Cette voie de signalisation est rapidement induite après la reconnaissance des interférons de type I, II et III par leurs récepteurs spécifiques sur la membrane cellulaire (Figure 7).

Les interférons de type I se lient sur un récepteur transmembranaire constitué de deux sous-unités, IFNAR1 et IFNAR2 (*Interferon Associated Receptor 1/2*). Les interférons de type III utilisent un complexe composé d'une chaîne spécifique IFNLR1 (*Interferon Lambda Receptor 1*) et d'une chaîne du récepteur pour l'IL-10 : IL-10R2 (*Interleukine-10 Receptor 2*). L'engagement de IFNAR1 et IFNAR2 pour les interférons de type I ou de IFNLR1 et IL-10R2 pour les interférons de type III induit la phosphorylation de deux kinases associées à ces récepteurs Jak1 (*Janus Activated Kinase 1*) et Tyk2 (*Tyrosine Kinase 2*). Les interférons de type II se fixent sur un récepteur composé de deux hétérodimères constitués des sous-unités IFNGR1 et IFNGR2 (*Interferon Gamma Receptor 1/2*). De la même façon que les interférons de type I et III, la fixation de l'interféron de type II sur son récepteur entraîne la phosphorylation des deux kinases associées Jak1 et Jak2 (*Janus Activated Kinase 1/2*). Ces kinases activées, Jak1, Jak2 et Tyk2, phosphorylent à leur tour les facteurs de transcription STAT1 et STAT2 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1 et 2*).

Pour les interférons de type I et III, STAT1 et STAT2 phosphorylés migrent dans le noyau et s'associent au facteur IRF9 (*Interferon Regulatory Factor 9*). Le complexe ISGF3 (*Interferon Stimulated Genes Factor 3*) ainsi formé se lie à l'élément ISRE (*Interferon Stimulated Response Element*) et induit la transcription de plusieurs centaines de gènes de réponse à l'interféron appelés ISG (*Interferon Stimulated Genes*) [60].

Pour les interférons de type II, les molécules STAT1 phosphorylées s'homodimérisent. Le complexe GAF (*interferon Gamma Activated Factor*) ainsi formé migre dans le noyau et se fixe sur l'élément GAS (*interferon Gamma Activated Sequence*). La séquence génétique GAS activée induit aussi la transcription d'ISG (Figure 7). Au contraire des IFN de type I et III, l'IFN de type II n'induit pas la formation de complexes ISGF3. En conséquence, il ne peut pas induire la transcription des gènes qui ont seulement l'élément ISRE dans leur promoteur.

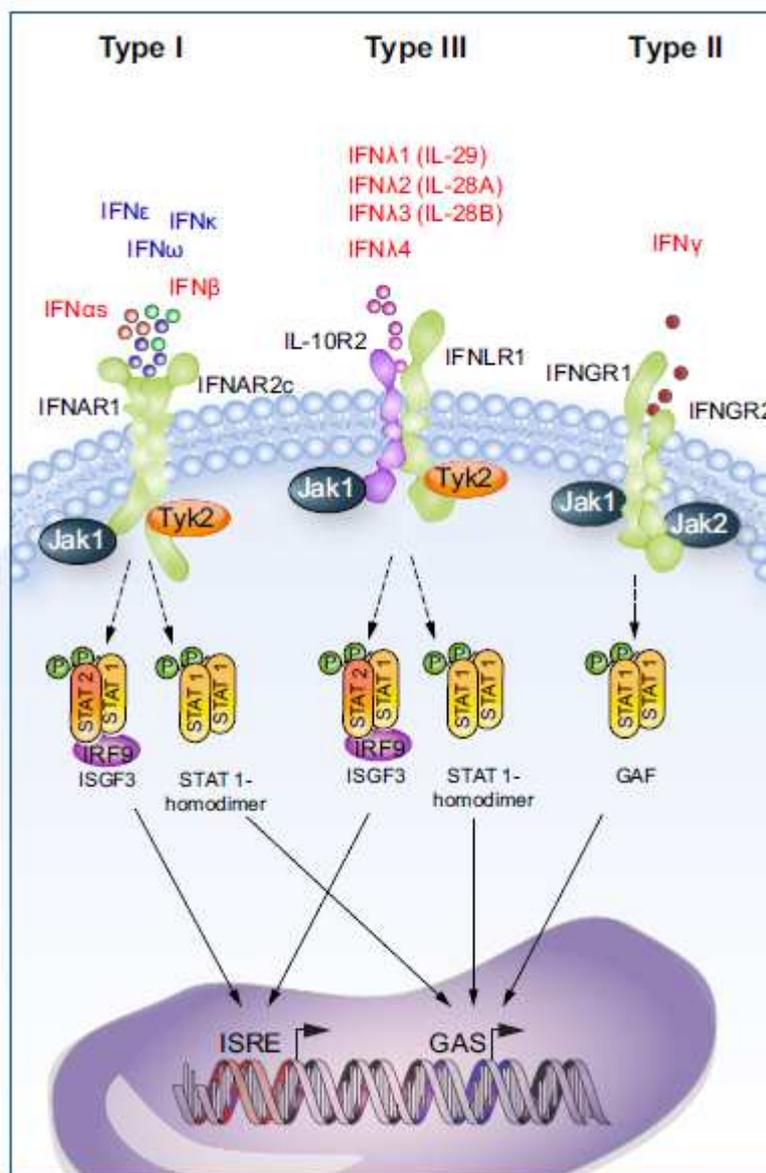


Figure 7 : Voie de signalisation Jak-STAT des interférons de type I, II et III [79].

Les trois types d'IFN via la voie de signalisation cellulaire Jak-STAT induisent la transcription d'ISG. L'IFN-gamma (seul IFN de type II), via STAT-1 phosphorylé (P-STAT1), indépendamment de ISGF3, induit la transcription d'ISG communs aux deux autres types d'IFN ainsi que des ISG différents.

La phosphorylation des résidus tyrosine en position 701 des STAT par les protéines de la famille des Janus kinase (Jak1, Jak2 et Tyk2) est une étape cruciale de la signalisation induite par l'IFN. En effet, cette phosphorylation est requise pour la formation de complexes STAT variés ainsi que pour leur translocation dans le noyau. Cependant pour une transcription optimale des ISG, d'autres événements tels que des modifications biochimiques des STAT ou l'interaction des STAT avec des co-activateurs transcriptionnels (p300, CBP, MCM5 ...) sont aussi nécessaires. Le recrutement de ces protéines co-activatrices dépend de la phosphorylation des résidus sérine en position 727 des STAT. Cette phosphorylation est essentielle pour une activation transcriptionnelle complète [80-82].

Les IFN induisent d'autres cascades de signalisation que la voie Jak-STAT, telles que les voies MAPK-p38 (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*). Ces différentes cascades moléculaires s'entrecroisent aboutissant à des réponses variées permettant d'expliquer les effets biologiques pléiotropes des IFN dans les cellules cibles. Certaines de ces voies de signalisation fonctionnent indépendamment de la voie Jak-STAT alors que d'autres coopèrent avec les STAT pour optimiser la régulation transcriptionnelle des gènes cibles.

4. Gènes de réponse à l'interféron et activités antivirales

La voie Jak-STAT est impliquée dans la défense antivirale en induisant la transcription d'ISG. En effet les ISG codent certaines protéines connues pour leurs propriétés antivirales (Tableau 2) [83].

Protéines codées par les ISG	Fonctions décrites
PKR (Protéine Kinase R)	Inhibition de la traduction via la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 α
2'5' OAS (<i>Oligoadenylate synthetase</i>) - RNaseL	Dégradation des ARN viraux
IRF (<i>Interferon Regulatory Factor</i>)	Régulation positive ou négative de la production d'interféron
GTPase Mx (Myxovirus resistance)	Inhibition de la transcription
IFTIM 1,2,3	Inhibition de l'entrée virale

Tableau 2 : Exemple de quelques protéines antivirales dont l'expression est induite par les interférons.

Ces protéines sont capables d'inhiber la réplication des virus en ciblant directement les voies de signalisation et les fonctions requises durant le cycle viral (Figure 8) [75].

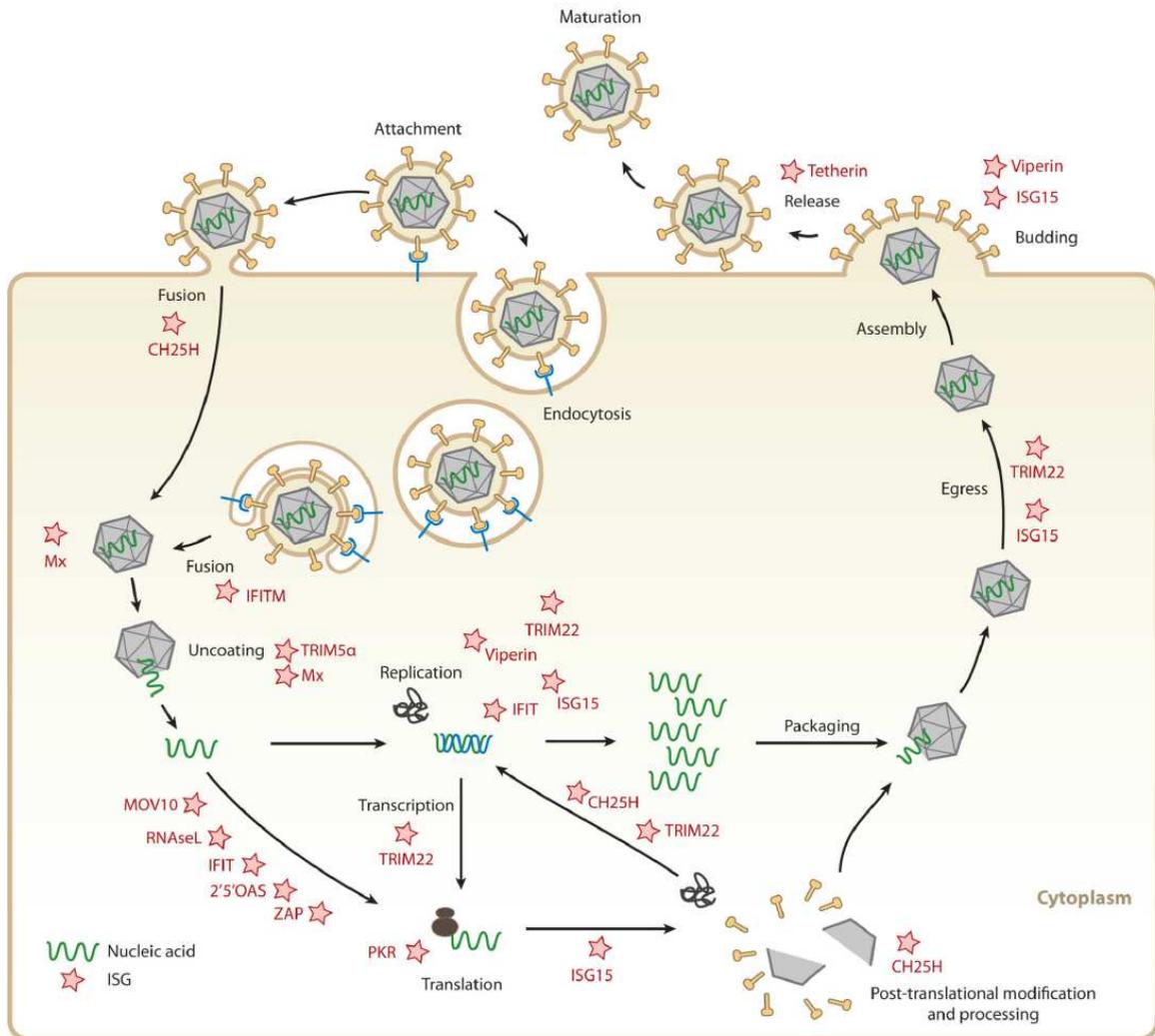


Figure 8 : Cibles de quelques protéines antivirales induites par les IFN au cours du cycle viral.

Les protéines codées par les ISG (représentées par des étoiles) interfèrent avec les différentes étapes nécessaires au cycle viral : attachement à la cellule cible (attachment), entrée (endocytosis, fusion), décapsidation (uncoating), transcription, réplication, traduction (translation), les modifications post-traductionnelles (post-translational modification and processing), assemblage (packaging, egress, assembly) et libération (release) [75].

Les réactions croisées entre les voies de signalisation des différents types d'interféron ne permettent pas de définir de façon claire les gènes spécifiquement régulés pour chaque type d'interféron. Certains ISG sont régulés à la fois par les IFN de type I, II et III mais d'autres sont sélectivement régulés par un ou deux type(s) d'IFN. Par exemple, MxA et PKR sont induits quasi-exclusivement par l'IFN-alpha. L'expression de IFITM1 (*IFN Inductible Transmembrane*) est induite par tous les IFN, alors que l'expression du gène codant la 2'-5' oligoadénylate synthétase 1 est sélectivement induite par l'IFN-alpha et bêta mais pas

par l'IFN-gamma [84]. Quelques ISG s'avèrent être plus spécifiques d'une réponse engagée par l'IFN-gamma.

Il existe des ISG à activité antivirale mais aussi des ISG à activité pro-virale. L'inhibition de la réplication des virus par les interférons repose sur une combinaison d'expressions de plusieurs ISG à activité antivirale et pro-virale.

La régulation de l'expression des ISG est complexe. Il existe une boucle autocrine d'amplification, avec les éléments de base de la voie JAK-STAT : JAK-2, STAT1/2, IRF9 qui sont aussi des ISG ce qui renforce la réponse à l'IFN. Et il existe une boucle de régulation négative faisant intervenir les protéines SOCS (*Suppressor of cytokine signaling*), notamment SOCS1 et SOCS3, elles-mêmes induites par la voie Jak-STAT [75, 85] et USP18 (*Ubiquitin-specific peptidase 18*) [86].

5. Place de l'interféron dans la réponse immune à l'infection par le virus BK

Le rôle des interférons au cours d'une infection par le virus BK est très peu documenté.

Il existe très peu de données sur la réponse interféron de type I au virus BK, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Des travaux suggèrent l'activation des récepteurs TLR3 (*Toll-Like Receptor 3*) et RIG-1 (*Retinoic acid-Inductible Gene-1*) dans l'inflammation observée dans les lésions de néphropathie associée au virus BK [87]. Cependant ces récepteurs sont plutôt impliqués dans la reconnaissance des ARN viraux. En conséquence, dans les infections à virus BK, les mécanismes d'activation de ces récepteurs restent à préciser.

Concernant l'interféron de type II, une équipe a montré l'effet inhibiteur de l'IFN-gamma sur l'expression des gènes et la réplication du virus BK. Cette équipe a étudié le rôle de l'IFN-gamma dans l'infection lytique par le virus BK. Ils montrent qu'un traitement par IFN-gamma inhibe la réplication et l'expression des protéines virales de façon dose-dépendante [88].

A ce jour, aucune donnée n'a été publiée sur la réponse interféron de type III au virus BK.

II. OBJECTIFS

La réponse immunitaire est le principal inhibiteur de la réactivation du virus BK, pourtant celle-ci est très peu documentée. En particulier le rôle des cytokines antivirales dans le contrôle de l'infection est peu renseigné. Bien que les IFN soient des acteurs majeurs du système immunitaire aux propriétés antivirales, seulement un article a montré un effet antiviral de l'IFN-gamma sur le virus BK et le mécanisme est inconnu [88]. Ainsi, toute amélioration de nos connaissances sur les principaux acteurs du système immunitaire qui luttent contre le virus BK permettra une meilleure compréhension de l'histoire naturelle de l'infection par le virus BK et aidera au développement de stratégies thérapeutiques.

Nous avons choisi de nous intéresser aux interférons parce qu'ils sont des acteurs majeurs du système immunitaire et qu'ils possèdent des propriétés antivirales. Nous avons voulu savoir si les différents types d'IFN avaient une action antivirale contre le virus BK et par quel(s) mécanisme(s).

Dans cette optique, nous avons testé les trois types d'IFN pour leurs propriétés antivirales sur l'infection par le virus BK *in vitro*. Nous avons utilisé les cellules Véro permissives au virus BK [89]. Nous avons exploré la voie de signalisation Jak-STAT induite par les IFN puis nous avons cherché à identifier les ISG pouvant être impliqués dans l'activité antivirale observée sur le virus BK. Les ISG identifiés pourraient permettre le développement de stratégies thérapeutiques.

Au cours de ma thèse d'université, à partir du mois de février 2015, j'ai participé à l'initiation de la nouvelle thématique de recherche du laboratoire de virologie clinique et fondamentale EA4294 du CHU d'Amiens. Les objectifs de mon travail au laboratoire ont d'abord été de mettre en place les outils nécessaires à l'étude du virus BK. J'ai ainsi participé à l'expertise de différents tests de détection et de quantification du génome viral par PCR avant de mettre au point notre propre technique PCR au laboratoire. Cette étude a abouti à une publication dont je suis co-auteur [90]. J'ai mis en place un modèle de culture cellulaire du virus BK dans les cellules rénales VERO en transfectant le plasmide pBKv(34-2) (ATCC) contenant le génome complet de la souche Dunlop du virus BK dans les cellules VERO. Le génome du virus BK est détectable et quantifiable par PCR dans les surnageants de culture et les protéines virales sont détectables en immunofluorescence, confirmant la réplication du virus dans les cellules (décrits dans la section III. MATERIELS ET METHODES). Aussi, les virions contenus dans les surnageants de culture des cellules VERO infectées nous permettent d'infecter des cellules naïves. Plusieurs mois ont été nécessaires à la mise en place de ces

outils avec une croissance lente du virus en culture cellulaire. Un effet cytopathique a été observé à partir d'un mois de culture. Ce n'est seulement qu'en janvier 2016 que j'ai pu commencer à tester les différents types d'IFN sur le virus BK.

III. MATERIELS ET METHODES

1. Culture cellulaire

a) Lignées cellulaires

Les cellules Véro sont des cellules épithéliales rénales d'origine simienne. Elles sont permissives au virus BK[89]. Les cellules Véro ont été cultivées dans un milieu *Dulbecco's modified Minimal Essential Medium* (Glutamax I-DMEM) (Gibco, Life Technologies™) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

Les cellules 293FT (ThermoFisher Scientific™) sont des cellules rénales embryonnaires d'origine humaine. Elles ont été transformées avec l'Ag-T du SV40. Elles ont été cultivées dans un milieu *Dulbecco's modified Minimal Essential Medium* (Glutamax I-DMEM) (Gibco, Life Technologies™) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

Les cellules sont entretenues deux fois par semaine lorsque la confluence atteint 100% grâce à l'action de la trypsine (Gibco, Life Technologies™).

b) Stimulation cellulaire par les IFN

Les interférons alpha-2a, gamma et lambda-1 humains recombinants utilisés pour stimuler les cellules Véro et 293FT ont été obtenus auprès de PBL Assay Science™. Les concentrations utilisées et les durées d'exposition des cellules aux interférons sont précisées pour chaque expérience dans la section IV. RESULTATS.

2. Virus

a) Production du virus BK en culture cellulaire

Souche virale et plasmide

Le plasmide pUC19pBKv(34-2) a été fourni gracieusement par le Professeur Walter Atwood (Brown University, USA). Il a été obtenu par clonage du plasmide pBKv(34-2) (ATCC) au niveau du site BamHI dans le vecteur plasmidique pUC19 afin d'amplifier l'ADN. Le site de restriction BamHI du génome du virus BK se situe au sein de la séquence codant la protéine virale VP1. Le plasmide pBKv(34-2) contient le génome complet du virus BK.

Amplification du plasmide

L'amplification du plasmide pUC19pBKv(34-2) a été réalisée après transformation dans les bactéries chimiquement compétentes *Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen™). La transformation a été réalisée par choc thermique. Les bactéries ayant intégré le plasmide ont été sélectionnées grâce au gène de résistance à l'ampicilline présent sur le plasmide vecteur pUC19, après la mise en culture des bactéries en présence d'ampicilline. Le plasmide a ensuite été extrait avec le kit *Nucleobond® Xtra Maxi kit* (Macherey-Nagel™) en suivant le protocole « High-copy plasmid DNA » selon les recommandations du fabricant. La concentration d'ADN ainsi extrait a été évaluée au Nanodrop ND-100 v3.7.1 par mesure de la densité optique à 260 nm, et la pureté par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm.

Transfection du plasmide

Le plasmide pUC19pBKv(34-2) a été digéré avec 2U d'enzyme BamHI (New England Biolabs) pour 1µg d'ADN pendant 4 heures à 37°C afin de séparer le génome du virus BK du plasmide vecteur pUC19. La digestion complète du plasmide a été vérifiée après migration sur un gel d'agarose 1%. L'ADN a ensuite été purifié par un volume de chloroforme/alcool isoamylique et précipité avec 1/10^{ème} volume d'acétate de sodium + 1,5 volume d'éthanol à 95% à froid. L'ADN précipité a été repris dans l'eau à une concentration finale d'1µg/µl. La transfection de cet ADN dans les cellules Véro a été réalisée à l'aide du réactif de transfection Lipofectamine® 2000 (Invitrogen™) selon le protocole du fabricant.

Production virale

Le génome du virus BK a été transfecté dans les cellules Véro. Au bout d'un mois les cellules ont commencé à montrer un effet cytopathique. A partir de ce moment-là, les surnageants et les cellules ont été récupérés et soumis à trois cycles de congélation / décongélation pour casser les cellules et libérer le virus BK intracellulaire. Le « stock viral » ainsi produit a été conservé à -80°C (Figure 9).

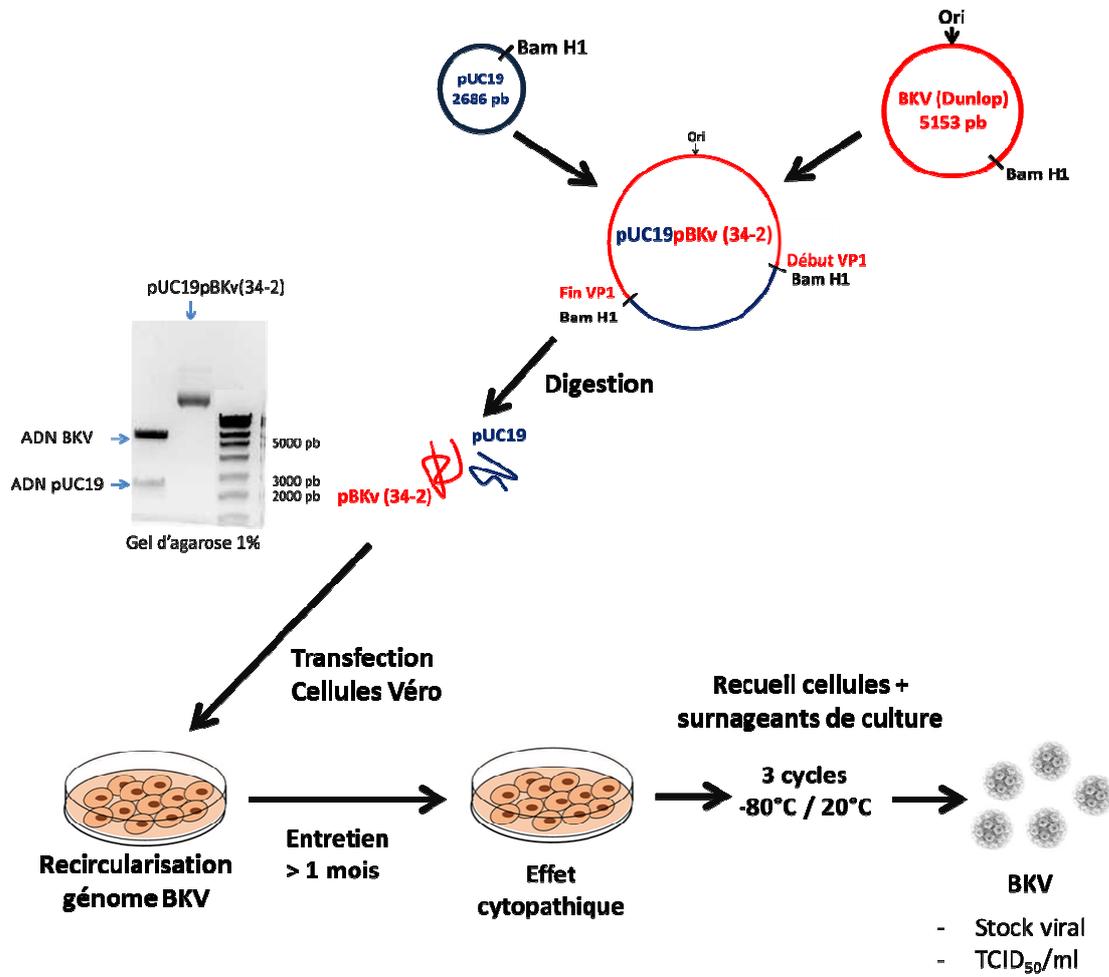


Figure 9 : Production du virus BK en culture cellulaire

Détection du virus BK en microscopie électronique

Afin de vérifier la présence du virus BK en culture cellulaire, 3 mois après la transfection, un échantillon de cellules Véro transfectées a été transmis à l'Université François Rabelais à Tours pour une analyse en microscopie électronique.

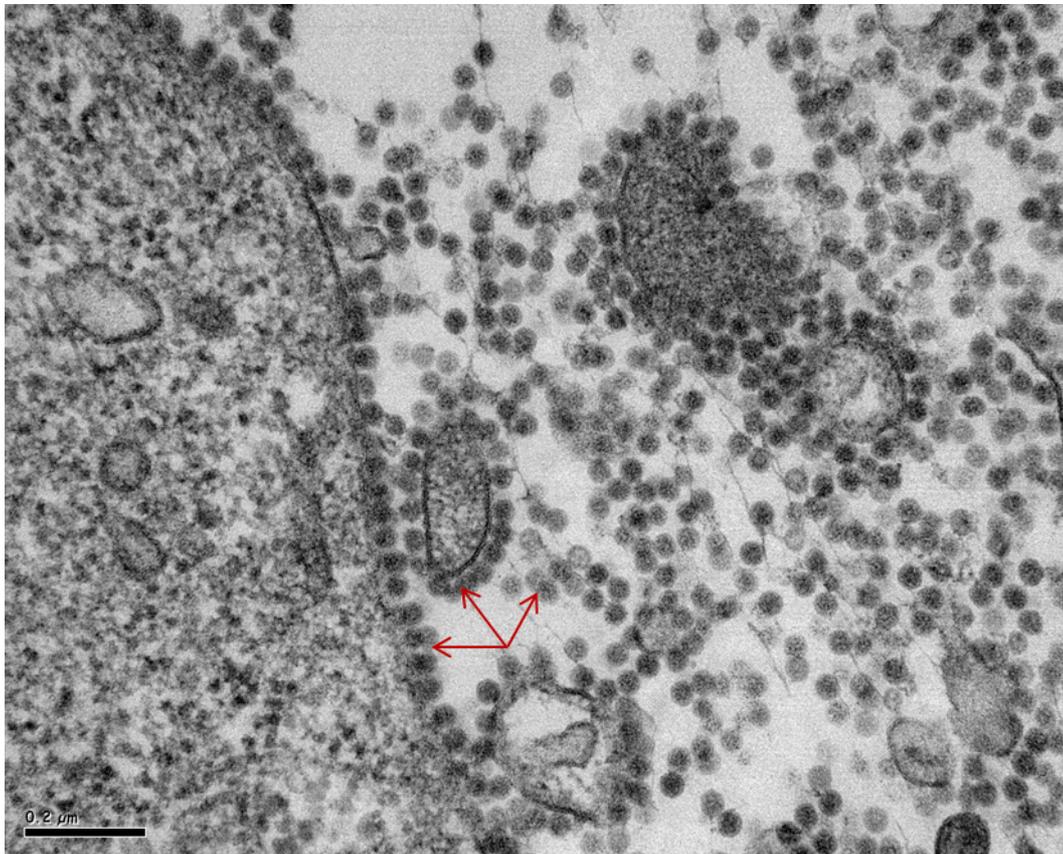


Figure 10 : Particules de virus BK dans les cellules Véro 3 mois après la transfection.

(Photo réalisée en microscopie électronique par Emmanuelle Blanchart-Laumonnier à l'Université François Rabelais à Tours à partir de nos cellules transfectées).

Détection du génome viral par PCR

L'ADN total a été extrait à partir des surnageants et des cellules infectées, 72 heures après l'infection à l'aide du kit *QIAmp DNA Blood Mini Kit*[®] (Qiagen[™]) sur l'extracteur QIAcube (Qiagen[™]). L'amplification d'une séquence d'ADN spécifique du virus BK a été initiée par une étape de 2 minutes à 50°C, prolongée par une étape de dénaturation de 10 minutes à 95°C, suivie d'une étape d'hybridation et d'élongation de 15 secondes à 95°C et 60 secondes à 60°C. 45 cycles de PCR ont été réalisés. Le nombre d'amplicons produits est comparé à une courbe standard générée grâce à une série de dilutions d'une concentration connue d'ADN du virus BK. La PCR quantitative en temps réel a été réalisée sur l'*ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems[™]) selon les recommandations du fabricant. Le volume de 25µl de réaction de PCR a été préparé à partir

de 10µM des amorces sens, anti-sens et de la sonde, et du réactif *TaqMan universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems™). Les amorces et la sonde utilisées sont complémentaires d'une région conservée du gène VP1 et spécifique du virus BK. Les séquences des amorces et de la sonde utilisées sont :

- Amorce sens : 5'-AGAG-TGTCCAGGGGCAGCT-3' (aa 1587-1605)
- Amorce anti-sens : 5'-AG-TTTTGGCACTTGCACGG-3' (aa 1607-1622)
- Sonde : FAM-CCAAAAGCCAAAGGA-MGB (aa 1625-1643)

Détection des protéines virales en immunofluorescence et immunoperoxydase

Les cellules ont été fixées avec une solution de PFA 7,4%-PBS2X (1 :1) pendant 10 minutes à température ambiante puis perméabilisées avec une solution de CSK-0,5% TritonX-100-0,5% pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont été rincées au PBS avant d'être incubées avec les anticorps primaires, anti-VP1 (PAb597) ou anti-Ag-T (PAb416) (Abcam™), dilué dans du PBS-Tween 0,5%, 1 heure à température ambiante. Après un nouveau rinçage, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (immunoperoxydase) ou à une molécule fluorescente FITC (immunofluorescence) pendant 1 heure à température ambiante. Après rinçage des cellules, l'Ag-T et VP1 ont été révélés grâce au substrat de la peroxydase : 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma) ou en lecture directe au microscope à fluorescence. Les protéines Ag-T et VP1 ont été observées dans les noyaux des cellules Véro infectées.

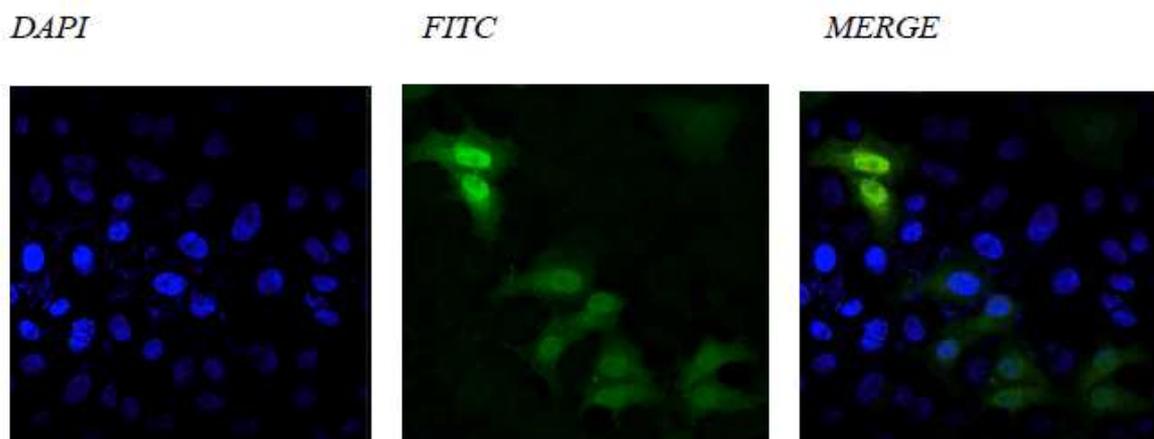


Figure 11 : Détection de l'Ag-T dans les cellules Véro au microscope à fluorescence.

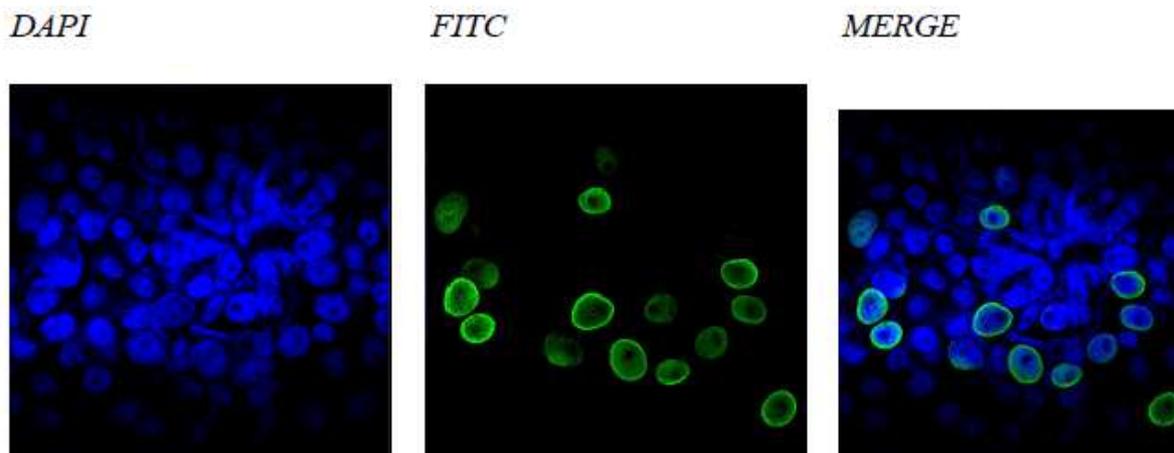


Figure 12 : Détection de VP1 dans les noyaux des cellules Véro au microscope à fluorescence.

b) Détermination du titre infectieux viral (TCID₅₀/ml)

Des cellules Véro ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits. Après 24 heures d'incubation à 37°C + 5% de CO₂, les cellules Véro ont été infectées avec le virus BK à différentes dilutions allant de 10⁻¹ à 10⁻⁸ dans du milieu de culture (DMEM + 10% SVF). Après 72 heures d'incubation à l'étuve à 37°C + 5% de CO₂, l'Ag-T des cellules infectées est visualisable au microscope par immunoperoxydase. Le titre infectieux a été déterminé par la méthode des TCID₅₀/ml [91].

c) Infections cellulaires avec le virus BK produit

Les cellules Véro ont été incubées avec le stock viral BK produit pendant 3 heures à 37°C et sous 5% de CO₂ pour permettre l'entrée des particules virales. Les multiplicités d'infection (MOI) sont précisées pour chaque expérience dans la section IV. RESULTATS. Les cellules ont ensuite été rincées 3 fois au PBS puis elles ont été cultivées dans leur milieu habituel. Après 72 heures, les protéines virales ont pu être détectées par immunofluorescence, immunoperoxydase et western-blot.

3. Analyse en PCR quantitative en temps réel (qPCR)

a) Détection et quantification des ARNm viraux par qPCR

Les ARN totaux intracellulaires ont été extraits à l'aide du kit *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen™) sur l'extracteur QIAcube (Qiagen™) à partir du protocole du fabricant en présence de DNase. La concentration des ARN extraits a été évaluée au Nanodrop ND 100 v3.7.1. Les cDNA ont été synthétisés à partir des ARN extraits par transcription inverse avec le *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™) selon les

recommandations du fabricant. Une centaine de nanogrammes de chaque échantillon d'ADNc ont été mélangés avec un tampon approprié *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems™). L'amplification PCR a été réalisée sur l'ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems™) selon les recommandations du fabricant.

La quantification a été réalisée par la méthode des $\Delta\Delta C_t$. Il s'agit d'une quantification relative par comparaison des C_t (*Cycle threshold*) obtenus. Le C_t représente le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour obtenir une valeur seuil déterminée et est inversement proportionnel à la quantité de cDNA amplifié. Le C_t , correspondant à l'amplification x , est d'abord normalisé par rapport à l'ARN ribosomal 18S comme gène constitutif par le calcul du ΔC_t ($\Delta C_t_x = C_t_x - C_{t_{18S}}$), puis rapporté à notre condition de référence par le calcul $\Delta\Delta C_t_x$ ($\Delta\Delta C_t_x = \Delta C_t_x - \Delta C_{t_{référence}}$) utilisé dans la formule $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t_x}$. Cette formule permet de normaliser l'expression génique d'une série à l'autre. La PCR quantitative en temps réel a été réalisée sur l'ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems™) selon les recommandations du fabricant.

Les milieux réactionnels pour la PCR sont réalisés de la façon suivante :

Composants	Volume (μ l) / tube
TaqMan® universal PCR Master Mix (2X)	12,50
Amorce Sens (10 μ M)	0,75
Amorce Anti-Sens (10 μ M)	0,75
Sonde FAM (10 μ M)	0,75
H2O RNase-free (QSP 20ul)	8,25
cDNA	2,00
Volume final	25,00

La liste des amorces utilisées se trouve en Tableau 3.

	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	Sonde
Ag-T	5'-ACT CCC ACT CTT CTG TTC CAT AGG-3'	5'-TCA TCA GCC TGA TTT TGG AAC CT-3'	5'-TTG GCA CCT CTG AGC TAC-3'
VP1	5'-GGC CTC TTT GTA AAG CTG ATA GC-3'	5'-CTG TTG TGT TCC AGA GCT GTT AGT A-3'	5'-CAG CTG CTG ATA TTT G-3'

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées en PCR

4. Western-blotting

a) Anticorps utilisés

L'anticorps polyclonal anti-VP1 (PAb597), et l'anticorps monoclonal anti-Ag-T (PAb416) ont été obtenus auprès de Abcam™. Les anticorps monoclonaux anti-STAT1 et anti-phospho-STAT1 (Tyr701) ont été obtenus auprès de Santa Cruz™. L'anticorps monoclonal anti- β -actine a été obtenu auprès de ThermoFisher Scientific™. Les anticorps secondaires polyclonaux anti-IgG de lapin et anti-IgG de souris couplés à la peroxydase ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich™.

b) Etapes

Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA (20mM Hepes KOH pH 7,4; 150mM NaCl; 5mM EDTA; 0,1% SDS; 1% DOC et 1% Triton X-100) (200 μ l/puits pour une plaque de 6 puits). Les lysats cellulaires ont été soniqués puis dosés à l'aide du kit *Pierce BCA Protein Assay* selon les recommandations du fabricant (ThermoFisher Scientific™).

Les protéines ont été précipitées au méthanol - chloroforme et ont ensuite été dénaturées dans du tampon Laemmli 4X en présence de 5% de β -mercaptoéthanol pendant 5 minutes à 95°C. Puis elles ont été déposées sur un gel de séparation SDS-Page 10% et transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à un appareil de transfert. Les membranes ont été saturées dans une solution de PBS-Tween 20 0,1%-Lait 4% pendant 1 heure à température ambiante puis incubées avec l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt. L'anticorps primaire est dilué dans une solution de PBS-Tween 20 0,1%-BSA 5% pendant 2 heures à température ambiante ou 1 nuit à 4°C. Après 3 lavages dans une solution de PBS-Tween 20 0,1% sous agitation, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. L'anticorps secondaire a été dilué dans une solution de PBS-Tween 20 0,1%-Lait 4% pendant 1 heure. Les complexes protéines-anticorps spécifiques ont été révélés par chimiluminescence grâce au kit *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (EMD Millipore™). La densité des bandes observées a été quantifiée grâce au logiciel Image I.

5. Analyse transcriptionnelle par qPCR

Des cellules Véro et 293FT ont été ensemencées dans une plaque 6 puits et traitées avec de l'IFN-alpha, lambda ou gamma (à 1000 UI/ml). Au bout de 24 heures, les ARN totaux ont été extraits des cellules et rétro-transcrits en ADNc (comme décrit précédemment). 384 réactions de PCR en temps réel ont été réalisées simultanément dans une carte

microfluidique de 384 puits par *TaqMan*[®] *Low Density Array* (TLDA). Chaque puits contient 2µL d'amorces et sondes spécifiques d'un seul gène. Ici, les cartes TLDA ont été configurées pour analyser 96 gènes sous 2 conditions différentes. Ces gènes (choisis sur la base de la littérature) sont présents en duplicat. Une centaine de ng de chaque échantillon d'ADNc ont été mélangés avec un tampon approprié *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems[™]) et ont été transférés sur la carte TLDA. La carte a ensuite été scellée et l'amplification PCR a été réalisée sur l'ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems[™]). La méthode des $\Delta\Delta C_t$ a été utilisée pour l'analyse après normalisation de l'expression de l'ARN ribosomal 18S.

6. Test de l'indoleamine 2,3-dioxygénase

a) Blocage de l'activité enzymatique de IDO

Le 1-méthyl-DL-tryptophane (1-DL-MT, Sigma-Aldrich[™]) est un mélange racémique des énantiomères dextrogyres et lévogyres de 1-méthyl-tryptophane.

b) Mesure de la viabilité cellulaire

Les cellules Véro ont été incubées pendant 72 heures en présence de différentes concentrations de 1-méthyl-DL-tryptophane ou d'IFN-gamma (1000 UI/ml) dans les mêmes conditions que nos expériences. La viabilité a été mesurée à l'aide du kit « CellTiter-glo[®] luminescent / Cell viability assay », selon les recommandations du fabricant (Promega[®]).

7. Test de la pyridone

La pyridone 6 (EMD Millipore[™]) est un inhibiteur des protéines Janus Kinase.

8. Analyses statistiques

Les données ont été exprimées en moyenne +/- 1 écart-type.

IV. RESULTATS

Je présenterai les résultats de mon travail en distinguant trois grandes parties. Tout d'abord, l'effet antiviral des différents types d'IFN sur le virus BK ; puis l'analyse des ISG induits par ces IFN ; et pour terminer, l'étude d'un ISG intéressant qui pourrait être impliqué dans l'effet antiviral des IFN sur le virus BK.

1. Effet antiviral des IFN sur le virus BK

Bien que les IFN soient connus pour leurs propriétés antivirales, un seul article a montré un effet antiviral de l'IFN sur le virus BK [88]. Abend *et al.*, ont montré un effet inhibiteur de l'IFN-gamma sur l'expression des gènes et la réplication du virus BK dans les cellules épithéliales tubulaires proximales rénales humaines (HRPTEC). Nos recherches ont été réalisées dans les cellules rénales Véro. Ces cellules sont permissives au virus BK, et ne produisent pas d'IFN [92]. Elles constituent donc un modèle idéal pour caractériser l'effet des IFN.

Ainsi nous avons infecté les cellules Véro avec le virus BK en présence d'IFN-alpha, lambda ou gamma. Pour chaque type d'IFN, différentes concentrations ont été testées : 10, 100 ou 1000 UI/ml.

a) Effet antiviral des IFN sur l'expression des ARNm viraux précoces (Ag-T) et tardifs (VP1)

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des IFN sur l'expression des ARN messagers (ARNm) viraux intracellulaires. Les ARNm viraux précoces de l'Ag-T et tardifs de VP1 ont été détectés et quantifiés 72 heures après l'infection. Après extraction des ARN totaux et synthèse des cDNA correspondants, l'expression des ARNm viraux a été analysée par qPCR. Nous avons normalisé nos résultats par rapport à un gène constitutif, l'ARN 18S (Figure 13).

Pour des concentrations croissantes en IFN-alpha, nous observons une diminution de l'expression des ARNm viraux Ag-T et VP1. À partir de 100 UI/ml d'IFN-alpha, l'expression des ARNm est réduite d'environ 60% (RQ = 0,40+/-0,08 pour l'Ag-T et 0,39+/-0,08 pour VP1) par rapport aux cellules non traitées par l'IFN. Cette réduction est plus importante dans les cellules stimulées avec l'IFN-gamma comparées aux cellules stimulées avec l'IFN-alpha. À partir de 10 UI/ml d'IFN-gamma, l'expression des ARNm est réduite d'environ 80% (RQ = 0,22+/-0,15 pour l'Ag-T et 0,19+/-0,08 pour VP1) contre 40% (RQ = 0,61+/-0,03 pour

l'Ag-T et 0,65+/-0,07 pour VP1) dans les cellules stimulées avec l'IFN-alpha à la même concentration. Nous observons aussi une réduction des ARNm viraux dans les cellules traitées avec l'IFN-lambda par rapport aux cellules non traitées. Cependant cette réduction est la même quelle que soit la concentration d'IFN-lambda utilisée.

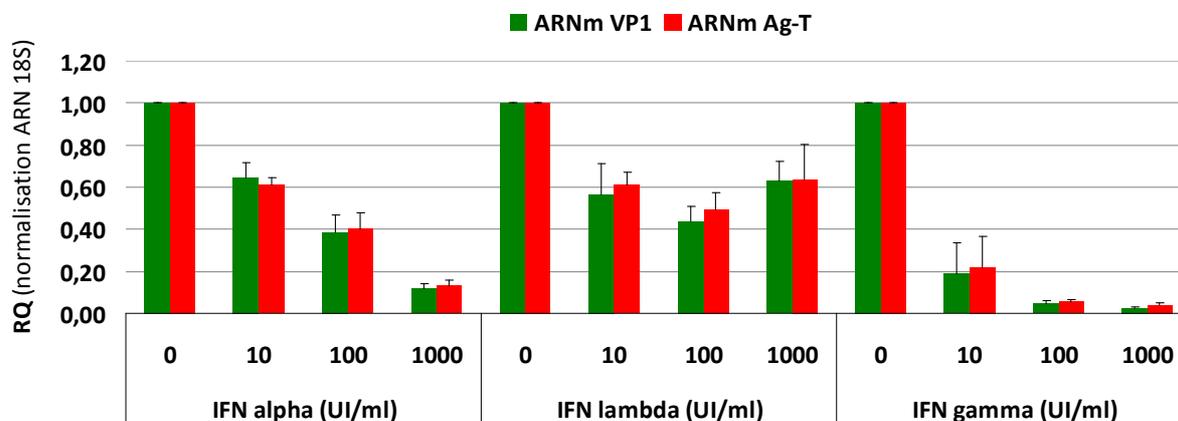


Figure 13 : Expression relative des ARNm viraux précoces (Ag-T) et tardifs (VP1) en présence des différents types d'IFN dans les cellules Véro infectées.

Les cellules Véro ont été traitées pendant 6 heures avec 10, 100 ou 1000 UI/ml d'IFN-alpha, lambda ou gamma puis infectées par le virus BK à une MOI = 0,5. Les concentrations d'interféron ont été maintenues pendant toute la durée de l'infection. L'expression cellulaire des ARNm de l'Ag-T, VP1 et l'ARN 18S a été déterminée par qPCR. L'expression de l'Ag-T et VP1 mentionnée correspond à la variation du ratio Ag-T/ARN 18S ou VP1/ARN 18S entre les cellules stimulées par l'IFN et les cellules non stimulées (0 UI/ml) (RQ). Les résultats représentent les moyennes +/- 1 écart-type des $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (RQ) mesurés au cours de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat.

Ainsi l'IFN-alpha et l'IFN-gamma inhibent de façon dose-dépendante la transcription virale de la région précoce et de la région tardive. Cet effet antiviral est plus important avec l'IFN-gamma.

b) Effet antiviral des IFN sur l'expression de la protéine virale VP1

Pour valider nos premiers résultats, nous avons vérifié si l'expression des protéines virales était diminuée en présence d'IFN. Ainsi, nous avons réalisé la même expérience que précédemment mais cette fois nous avons analysé l'expression de la protéine virale VP1 par Western-Blot 72 heures après l'infection.

Nous obtenons des résultats similaires au niveau de l'expression de la protéine virale VP1. L'expression de la protéine virale VP1 est réduite en présence d'une forte concentration d'interféron-alpha (1000UI/ml), par rapport à l'expression de VP1 dans les cellules non traitées par l'interféron (Figure 14A). Cette réduction est plus importante avec l'IFN-gamma où elle est observée à partir d'une concentration de 10 UI/ml d'IFN-gamma (Figure 14B). Nous n'observons pas de différence dans l'expression de la protéine virale VP1 en présence d'IFN-lambda quelque soit la concentration utilisée (Figure 14C). Si on compare les trois types d'IFN, pour une concentration de 1000 UI/ml, l'expression de VP1 est réduite en présence d'IFN-alpha, inhibée en présence d'IFN-gamma, et inchangée en présence d'IFN-lambda (Figure 14D).

Afin de s'assurer que l'effet antiviral observé est spécifique et n'est pas dû à un effet antiprolifératif ou pro-apoptotique de l'IFN, nous avons réalisé un test de viabilité cellulaire (Figure 14E). Nous n'avons pas observé de cytotoxicité liée à l'IFN-gamma aux concentrations utilisées.

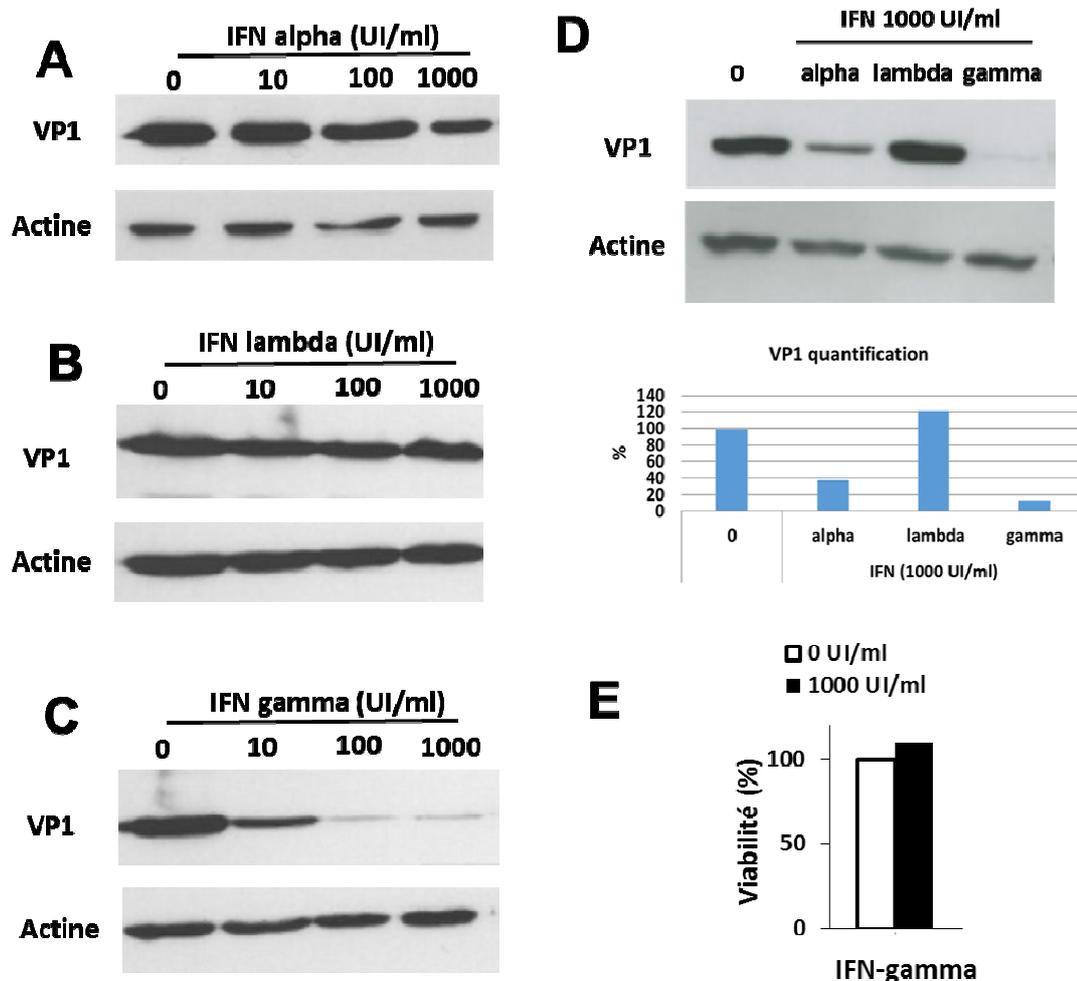


Figure 14 : Expression de la protéine virale VP1 en présence d'IFN.

Les cellules Véro ont été traitées pendant 6 heures avec différentes concentrations d'IFN-alpha, lambda ou gamma puis infectées par le virus BK à une MOI = 0,5. Les concentrations d'interféron ont été maintenues pendant toute la durée de l'infection. Les protéines cellulaires totales ont été récoltées 72 heures après l'infection. Les protéines VP1 et actine ont été détectées par western-blot grâce à des anticorps spécifiques (décrits dans la section III. MATERIELS ET METHODES). Des cellules Véro infectées non traitées par l'interféron (0 UI/ml) ont été utilisées en contrôle. L'actine a été utilisée comme témoin de charge de la quantité de protéine. (A) Les cellules Véro ont été traitées avec 10, 100 ou 1000 UI/ml d'IFN-alpha. (B) Les cellules Véro ont été traitées avec 10, 100 ou 1000 UI/ml d'IFN-lambda. (C) Les cellules Véro ont été traitées avec 10, 100 ou 1000 UI/ml d'IFN-gamma. (D) Les cellules Véro ont été traitées avec 1000 UI/ml d'IFN-alpha, lambda ou gamma. La densité des bandes observées a été quantifiée grâce au logiciel Image I. Les cellules Véro non traitées par l'IFN et infectées par le virus BK ont été considérées comme le 100%. (E) L'absence de cytotoxicité de l'IFN-gamma a été vérifiée par un test de viabilité cellulaire.

Nos résultats confirment l'effet antiviral de l'IFN-gamma sur le virus BK déjà montré par Abend *et al* [88]. De plus, nous montrons que l'effet antiviral de l'IFN-gamma sur le virus BK est plus important que les deux autres types d'IFN testés.

2. Implication de la voie de signalisation cellulaire Jak-STAT

a) Détection de la protéine P-STAT1

Pour s'assurer que la voie de signalisation Jak-STAT est induite lors de la stimulation des cellules Véro par les différents types d'IFN, nous avons observé l'expression de la forme phosphorylée de la protéine STAT1 (P-STAT1, Y701). La voie de signalisation cellulaire Jak-STAT est induite très rapidement après la stimulation. Ainsi, les protéines cellulaires totales ont été récoltées juste après la stimulation puis 1 heure, 3 heures, 6 heures et 24 heures après la stimulation.

Nous observons un pic de détection de la protéine P-STAT1 1 heure après stimulation par l'IFN-alpha. Alors qu'avec l'IFN-gamma, nous observons une phosphorylation prolongée de la protéine STAT1 jusqu'à 24 heures après la stimulation (Figure 15A). Cette phosphorylation prolongée de la protéine STAT1 pourrait expliquer l'effet antiviral plus important observé avec l'IFN-gamma comparé aux autres types d'IFN testés.

Concernant l'IFN-lambda, la protéine P-STAT1 n'a pas été détectée aux temps testés. Il serait judicieux de vérifier la présence du récepteur à l'IFN-lambda sur les cellules Véro.

Nous n'observons pas de différences concernant la phosphorylation de la protéine STAT1 entre les cellules non infectées et les cellules infectées. Donc l'infection par le virus BK n'induit pas en elle-même une phosphorylation de STAT1.

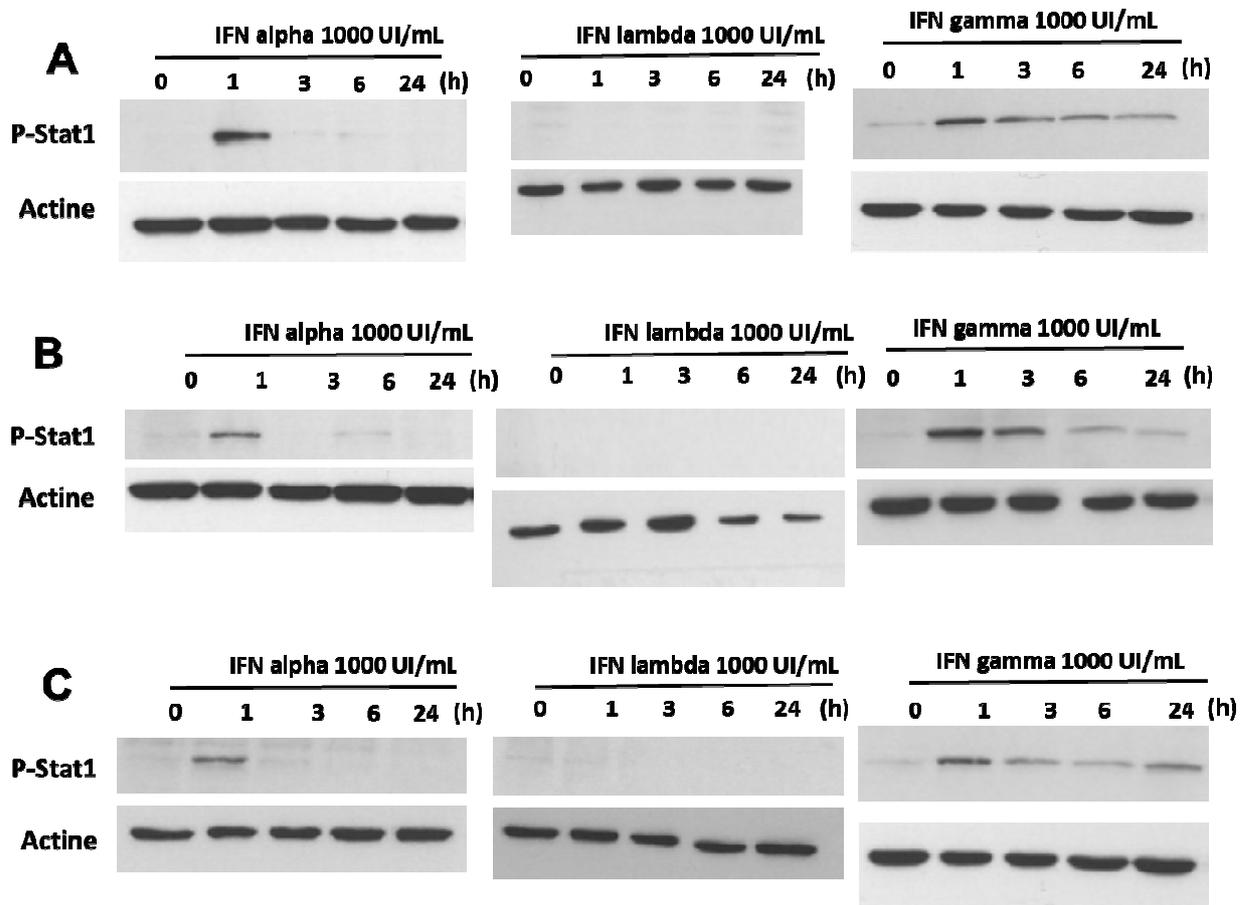


Figure 15 : Expression de la protéine P-STAT1 (Y 701) en présence d'IFN.

(A) Les cellules Véro ont été infectées par le virus BK à une MOI = 0,5. Le lendemain, les cellules Véro ont été stimulées avec 1000 UI/ml d'IFN-alpha, lambda ou gamma. Les protéines cellulaires totales ont été récoltées à 0, 1, 3, 6 et 24 heures après la stimulation par l'IFN. Les protéines P-STAT1 (Y 701) et actine ont été détectées par western-blot grâce à des anticorps spécifiques (décrits dans la section III. MATERIELS ET METHODES). L'actine a été utilisée comme témoin de charge de la quantité de protéine. (B) Mêmes conditions sur cellules non infectées. (C) Mêmes conditions sur cellules Véro infectées chroniquement par le virus BK.

La détection de P-STAT1 après stimulation par l'IFN-alpha ou gamma nous permet de confirmer l'induction de la voie de signalisation cellulaire Jak-STAT. Et l'effet antiviral de l'IFN-gamma plus important observé sur le virus BK est associé à une phosphorylation prolongée de STAT1.

b) Détection de la protéine STAT-1

Pour s'assurer que la voie Jak-STAT induite est fonctionnelle c'est-à-dire si cette voie aboutit à la production d'ISG, nous avons détecté la protéine STAT1 (ISG).

Pour des concentrations croissantes d'IFN alpha, lambda ou gamma, l'expression de la protéine STAT1 augmente. La protéine STAT1 est induite avec les trois types d'IFN (Figure 16).

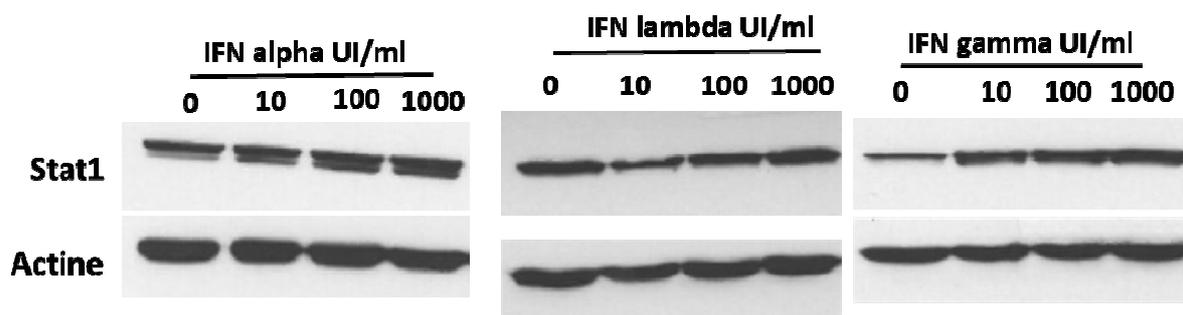


Figure 16 : Expression de la protéine STAT1 en présence d'IFN

(A) Les cellules Véro ont été traitées pendant 6h avec différentes concentrations d'IFN-alpha, lambda ou gamma puis infectées par le virus BK à une MOI = 0,5. Les concentrations d'interféron ont été maintenues pendant toute la durée de l'infection. Les protéines cellulaires totales ont été récoltées 72h après l'infection. Les protéines VP1 et actine ont été détectées par western-blot grâce à des anticorps spécifiques (décrits dans la section III. MATERIELS ET METHODES). Des cellules Véro infectées non traitées par l'interféron (0 UI/ml) ont été utilisées en contrôle. L'actine a été utilisée comme témoin de charge de la quantité de protéine.

Ces résultats suggèrent que la voie Jak-STAT est fonctionnelle après la stimulation par les différents types d'IFN.

c) Inhibition de la voie Jak-STAT

Pour savoir si l'effet antiviral de l'IFN-gamma observé sur la protéine VP1 est dépendant de la voie de signalisation Jak-STAT, nous avons bloqué cette voie en utilisant un inhibiteur des protéines Janus kinase : la pyridone.

Nous observons que la pyridone restaure l'expression de la protéine virale VP1 dans les cellules traitées avec de l'IFN-gamma (Figure 17).

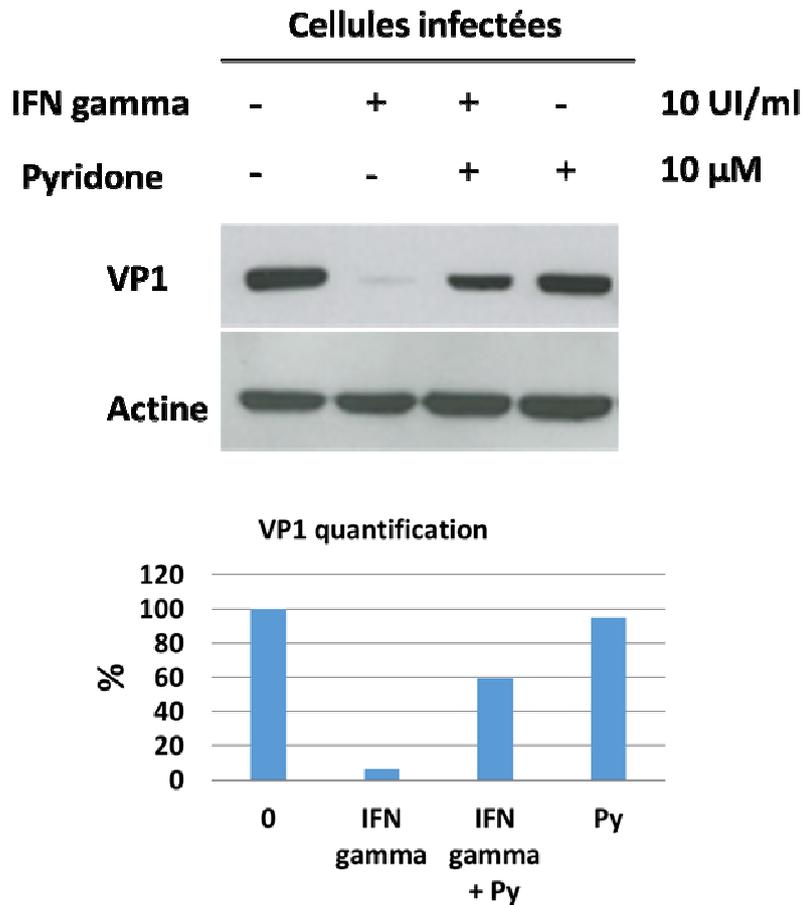


Figure 17 : Expression de la protéine VP1 en présence d'IFN-gamma +/- pyridone.

Les cellules Véro ont été traitées pendant 2h avec 10 μ M de pyridone puis 4h avec de l'IFN-gamma à 10 UI/ml toujours en présence de pyridone, puis infectées par le virus BK à une MOI = 0,2. Les concentrations d'interféron et de pyridone ont été maintenues pendant toute la durée de l'infection. La pyridone à 10 μ M a été rajoutée à J1 et J2 post-infection directement dans le milieu de culture. Les protéines cellulaires totales ont été récoltées 72h après l'infection. Les protéines VP1 et actine ont été détectées par western-blot grâce à des anticorps spécifiques (décrits dans la section III. MATERIELS ET METHODES). Des cellules Véro infectées non traitées par l'interféron (0 UI/ml) ont été utilisées en contrôle. L'actine a été utilisée comme témoin de charge de la quantité de protéine. La densité des bandes observées a été quantifiée grâce au logiciel Image I.

Ainsi nous pouvons confirmer que l'effet antiviral de l'IFN-gamma observé sur le virus BK est dépendant de la voie de signalisation Jak-STAT.

3. Etude transcriptionnelle des ISG induits

Dans le but de déterminer quelles protéines pourraient être impliquées dans l'effet antiviral observé, nous avons réalisé une étude transcriptionnelle. Nous avons ainsi détecté 64 ISG par qPCR (TLDA), 24 heures après la stimulation.

Nous avons observé les différents transcripts ISG qui montraient un profil d'induction similaire à l'effet antiviral observé, c'est-à-dire des transcripts fortement induits par l'IFN-gamma, un peu par l'IFN-alpha et pas par l'IFN-lambda (Figure 18). Les valeurs pour chaque ISG sont indiquées en section VIII. ANNEXES.

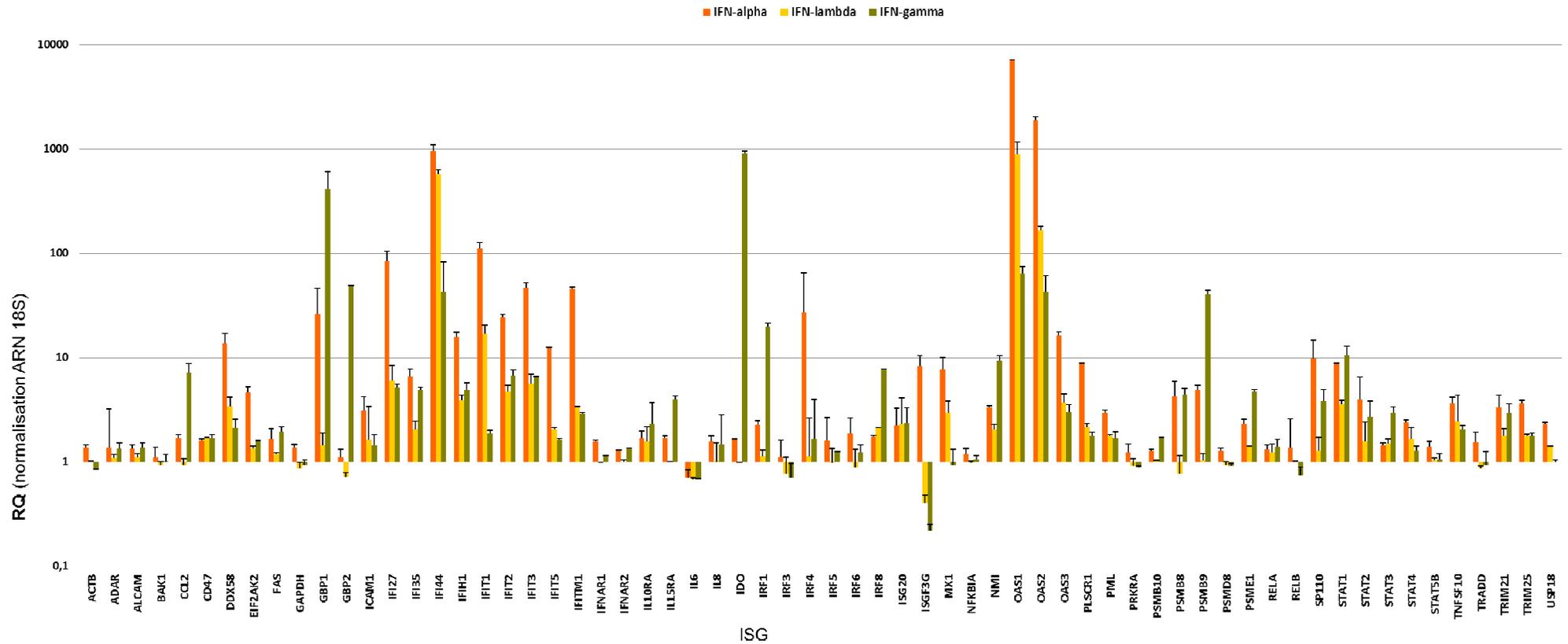


Figure 18 : Expression relative des ARNm de différents ISG en présence des différents types d'IFN dans les cellules 293FT

Les cellules 293FT ont été traitées pendant 6h avec 1000 UI/ml d'IFN-alpha, lambda ou gamma. L'expression cellulaire des ARNm des ISG et l'ARN 18S a été déterminée par qPCR. L'expression des ISG mentionnée correspond à la variation du ratio ISG/ARN 18S entre les cellules stimulées par l'IFN et les cellules non stimulées (0 UI/ml) (RQ). Les résultats représentent les moyennes +/- 1 écart-types des $2^{-\Delta C_t}$ (RQ) mesurés au cours d'une expérience réalisée en duplicat.

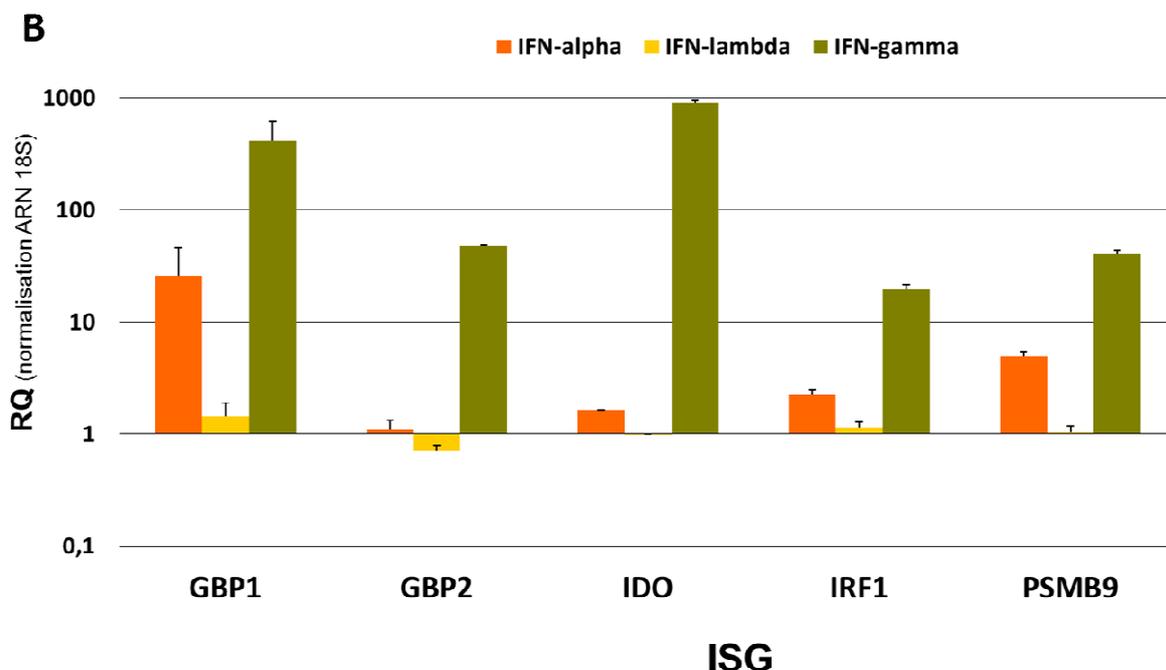


Figure 19 : Expression relative des ARNm des 5 ISG fortement induit par l'IFN-gamma, un peu par l'IFN-alpha, et pas par l'IFN-lambda. (Extrait de la Figure 18)

Nous avons ainsi isolé 5 transcrits d'ISG fortement induits par l'IFN-gamma, un peu par l'IFN-alpha, et pas par l'IFN-lambda. Ainsi cinq protéines pourraient expliquer l'effet antiviral observé (Figure 19).

Les protéines GBP1 et 2, *guanylate binding protein 1 / 2*, appartiennent à la famille des GTPases. Elles sont principalement induites par l'IFN-gamma mais aussi par l'IFN-alpha. Leur activité antivirale a été observée sur plusieurs virus : VSV, EMCV, VHC [93, 94], et leur activité antimicrobienne sur différents pathogènes intracellulaires (*Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*) [95]. Ces protéines possèdent d'autres activités, notamment la capacité d'être associées aux membranes. Il s'agit d'une propriété additionnelle que les GBP partagent avec les autres membres de la superfamille de la dynamine.

La protéine IDO ou indoleamine 2,3 dioxygénase est une enzyme intracellulaire responsable du catabolisme du tryptophane, un acide aminé essentiel, via la voie des kynurénines. Cette enzyme est principalement induite par l'IFN-gamma mais aussi par l'IFN-alpha. Son activité antivirale a été observée sur plusieurs virus [96-102]. Cette protéine possède également une activité immunorégulatrice.

La protéine IRF-1 ou *Interferon Regulatory Factor-1*, régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire antivirale ou anti-tumorale [75, 103, 104]. En particulier, IRF-1 a la capacité d'activer directement la transcription de nombreux

ISG. Notamment IRF-1 régule l'expression de IDO et de GBP 1 et GBP 2 en se fixant aux séquences ISRE présentes sur leurs promoteurs [103, 105, 106].

La protéine PSMB9 ou *proteasome subunit 9*, est une sous-unité du complexe constituant l'immunoprotéasome.

4. Etude d'un candidat : IDO

Parmi les cinq protéines que nous avons isolées et qui pourraient être impliquées dans l'effet antiviral observé des IFN sur le virus BK, la protéine IDO est particulièrement intéressante dans le contexte d'une infection à virus BK en transplantation rénale. En effet, IDO possède une double activité : antivirale et immunorégulatrice. L'expression de IDO inhibe la réplication de nombreux virus *in vitro* : CMV, HSV, VHB, Virus de la vaccine, Virus West Nile, Virus de l'encéphalite japonaise, Virus de la dengue [96-102]. L'activité antimicrobienne d'IDO est liée à la déplétion intracellulaire et locale en Trp et/ou à l'accumulation de kynurénines. De plus, les kynurénines diminuent la prolifération des lymphocytes T (LyT) activés *in vitro* et modifient l'équilibre des sous-populations lymphocytaires Treg et Th17 au profit des Treg (Figure 20). Aussi, plusieurs études suggèrent que IDO joue un rôle important dans l'immunotolérance vis-à-vis de l'organe transplanté [107-109].

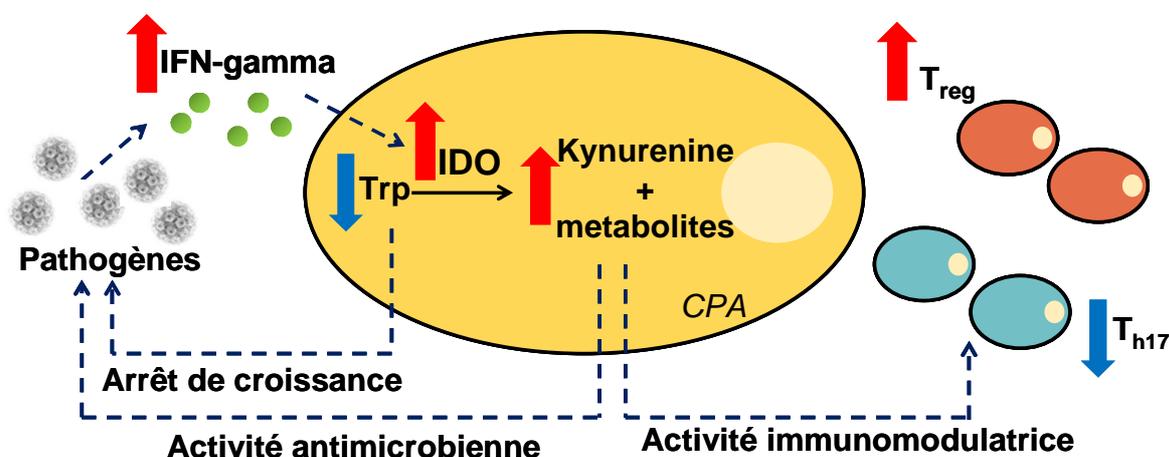


Figure 20 : Schématisation des activités antimicrobienne et immunomodulatrice de IDO. (d'après Greco *et al.*[110])

Afin d'évaluer si IDO pouvait être impliqué dans l'effet antiviral observé, nous avons réalisé deux expériences préliminaires.

a) Expression de VP1 en présence de L-Trp

Sachant qu'IDO peut exercer son activité antivirale via la déplétion en Trp, nous avons infecté les cellules Véro en présence d'IFN-gamma à faible concentration (10 UI/ml) et de L-Trp (100 µg/ml). Le L-Trp a été ajouté à J1 et J2 post-infection pour atteindre une concentration en excès. Notre hypothèse était que, si IDO est impliqué dans l'effet antiviral observé via la déplétion en Trp, alors l'ajout de L-Trp dans le milieu restaurerait l'expression de VP1 en présence d'IFN-gamma.

Nous constatons que la réduction de l'expression de VP1 par l'IFN-gamma est identique en présence ou non de L-Trp (Figure 21).

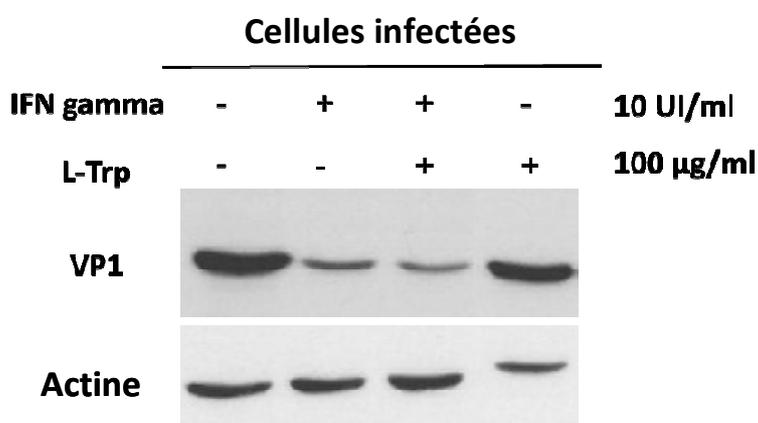


Figure 21 : Expression de la protéine VP1 en présence d'IFN-gamma +/- L-Trp

Les cellules Véro ont été traitées pendant 2h avec 100µg/ml de L-Trp puis 4h avec de l'IFN-gamma à 10 UI/ml toujours en présence de L-Trp, puis infectées par le virus BK à une MOI = 0,2. Les concentrations d'interféron et de L-Trp ont été maintenues pendant toute la durée de l'infection. Le L-Trp à 100µg/ml a été rajouté à J1 et J2 post-infection directement dans le milieu de culture. Les protéines cellulaires totales ont été récoltées 72h après l'infection. Les protéines VP1 et actine ont été détectées par western-blot grâce à des anticorps spécifiques (décrits dans la section III. MATERIELS ET METHODES). Des cellules Véro infectées non traitées par l'interféron (0 UI/ml) ont été utilisées en contrôle. L'actine a été utilisée comme témoin de charge de la quantité de protéine.

Ce résultat suggère que la déplétion en Trp induite par IDO n'a pas d'activité antivirale directe sur le virus BK.

b) Inhibition pharmacologique de l'activité enzymatique d'IDO

IDO peut aussi exercer une activité antivirale via l'accumulation de kynurénines liée à son activité enzymatique. Nous avons ainsi bloqué l'activité enzymatique de IDO avec le 1-DL-méthyl-tryptophane (1-DL-MT). Le 1-DL-MT est un inhibiteur compétitif de IDO. Il entre en compétition avec le tryptophane au niveau du site actif de l'enzyme.

Nous avons ainsi réalisé la même expérience que précédemment en présence du 1-DL-MT (100µM) dans le milieu réactionnel à la place du L-Trp. Le 1-DL-MT a été rajouté à la même concentration à J1 et J2 post-infection.

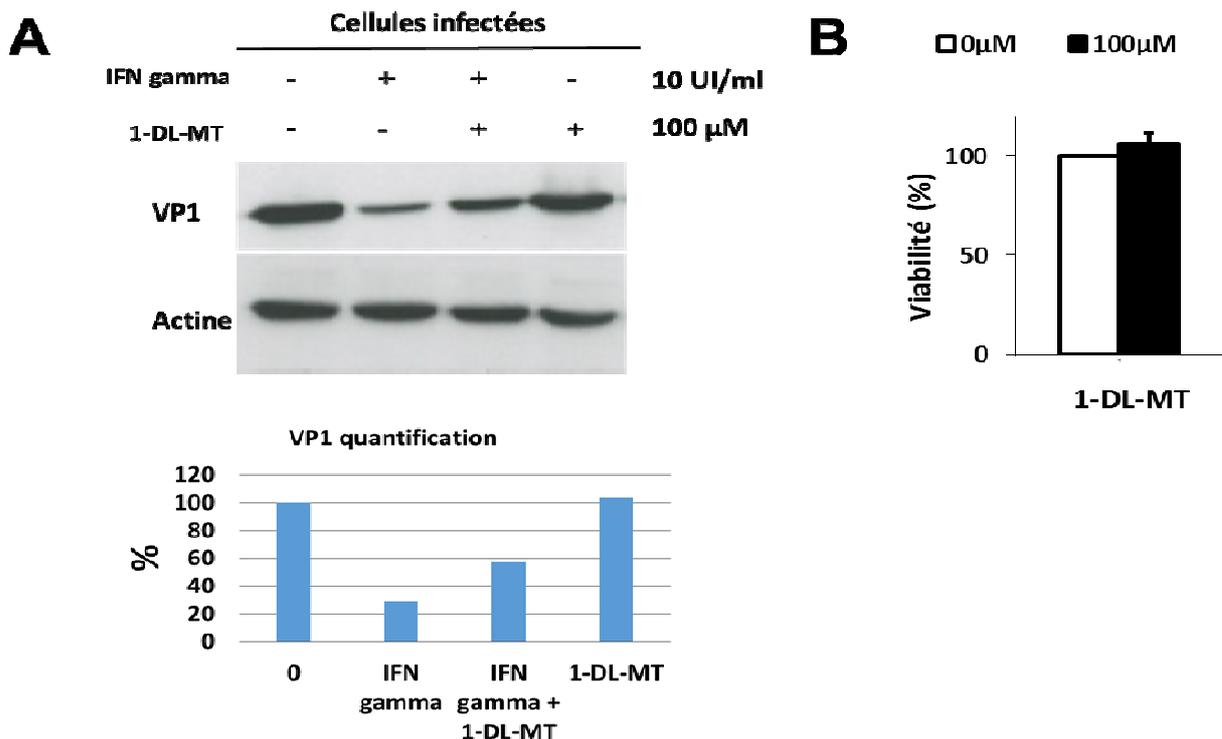


Figure 22 : Expression de la protéine VP1 en présence d'IFN-gamma +/- 1-DL-MT

(A) Les cellules Véro ont été traitées pendant 2h avec 100µM de 1-DL-MT puis 4h avec de l'IFN-gamma à 10 UI/ml toujours en présence de 1-DL-MT, puis infectées par le virus BK à une MOI = 0,2. Les concentrations d'interféron et de 1-DL-MT ont été maintenues pendant toute la durée de l'infection. Le 1-DL-MT à 100µM a été rajouté à J1 et J2 post-infection directement dans le milieu de culture. Les protéines cellulaires totales ont été récoltées 72h après l'infection. Les protéines VP1 et actine ont été détectées par western-blot grâce à des anticorps spécifiques (décrits dans la section III. MATÉRIELS ET MÉTHODES). Des cellules Véro infectées non traitées par l'interféron (0 UI/ml) ont été utilisées en contrôle. L'actine a été utilisée comme témoin de charge de la quantité de protéine. La densité des bandes observées a été quantifiée grâce au logiciel Image I. (B) L'absence de cytotoxicité du 1-DL-MT à la concentration de 100µM a été vérifiée par un test de viabilité cellulaire.

La présence de 1-DL-MT dans le milieu réactionnel restaure partiellement l'expression de la protéine virale VP1.

Ce résultat suggère qu'IDO pourrait être impliqué dans l'effet antiviral des interférons observé sur le virus BK via son activité enzymatique, par l'accumulation de kynurénines.

V. DISCUSSION

Effet antiviral des IFN sur le virus BK

Au cours de ce travail, nous avons montré un effet antiviral de l'IFN-gamma sur le virus BK et à moindre degré de l'IFN-alpha. L'IFN-gamma et l'IFN-alpha inhibent de façon dose-dépendante la transcription virale de la région précoce et de la région tardive du génome du virus BK. Des résultats similaires ont été obtenus au niveau de l'expression de la protéine virale VP1. En présence d'une forte concentration d'IFN (1000 UI/ml), l'expression de VP1 est inhibée avec l'IFN-gamma et est réduite avec l'IFN-alpha. Ainsi nous montrons un effet antiviral plus important de l'IFN-gamma, comparé aux deux autres types d'IFN, sur le virus BK dans les cellules rénales Véro. Nos résultats confirment ceux d'Abend *et al.* qui avaient déjà montré un effet antiviral de l'IFN-gamma sur le virus BK dans une autre lignée cellulaire [88]. Abend *et al.*, avaient aussi observé un effet antiviral de l'IFN-alpha mais n'avaient pas exploré cet effet. Ils avaient centré leur étude uniquement sur l'IFN-gamma. L'effet antiviral de l'IFN-gamma a aussi été observé sur le polyomavirus murin [111].

Exploration de la voie Jak-STAT

Nous avons cherché à caractériser l'effet antiviral observé en explorant la voie de signalisation cellulaire Jak-STAT. Nous avons vérifié l'induction de la voie Jak-STAT en analysant l'expression et l'activation de STAT-1 dans les cellules Véro stimulées par l'IFN-gamma. Nous avons observé une phosphorylation prolongée de STAT-1 en présence d'IFN-gamma, non retrouvée en présence d'IFN-alpha. L'inhibition de la voie de signalisation Jak-STAT par un inhibiteur des protéines Jak, montre que l'effet antiviral de l'IFN-gamma dépend de la voie Jak-STAT. Ainsi, la phosphorylation prolongée de STAT-1 en présence d'IFN-gamma pourrait expliquer l'effet antiviral plus important de l'IFN-gamma comparé aux autres types d'IFN. Une phosphorylation prolongée de STAT-1 en présence d'IFN-gamma a été mise en évidence dans d'autres modèles d'infections virales *in vitro* tels que l'infection par le virus Sindbis [112] ou par le CMV murin [113]. La phosphorylation prolongée de STAT-1 retrouvée à la fois dans les cellules infectées et les cellules non infectées montre que le virus BK en lui-même n'est pas responsable de cet effet. Car en effet, certains virus tel que l'adénovirus induit une phosphorylation prolongée de STAT-1 en présence d'IFN-alpha en inhibant la déphosphorylation de STAT-1 via la protéine tyrosine phosphatase TC45 [114].

Nous avons évalué la fonctionnalité de la voie Jak-STAT en analysant l'expression de la protéine STAT-1 qui est un ISG. Nous aurions pu aussi vérifier la phosphorylation en position 727 de la protéine STAT-1 pour s'assurer de l'activation transcriptionnelle complète et contrôler l'activation des promoteurs. Mais l'analyse transcriptomique réalisée en deuxième partie confirme l'activation transcriptionnelle avec l'induction d'ISG suite à la stimulation par l'IFN comparée aux cellules non stimulées.

Nous n'avons pas observé d'effet antiviral de l'IFN-lambda sur le virus BK dans les cellules Véro ni la phosphorylation de la protéine STAT-1. Toutes les cellules ne possèdent pas un récepteur à l'IFN-lambda. Nous avons pensé à vérifier la présence du récepteur mais la protéine STAT-1 est induite en présence de concentrations croissantes d'IFN-lambda suggérant une voie Jak-STAT fonctionnelle. Une autre possibilité serait de tester une autre lignée cellulaire pour pouvoir conclure sur l'effet de l'IFN-lambda observé. Nous avons d'ailleurs renouvelé nos expériences dans les cellules 293FT d'origine humaine mais nos essais se sont révélés infructueux. Après une longue période de mise au point dans la détection de l'infection virale, il a été difficile de mettre en évidence un effet antiviral de l'IFN. En effet la protéine VP1 est détectable seulement à partir du sixième jour post-infection. Cette cinétique longue de l'infection est difficile à maîtriser lorsqu'on veut tester l'effet d'une drogue.

De plus, nous avons cherché à montrer un effet sur la réplication virale par qPCR mais les charges virales observées en PCR sont tellement élevées (de l'ordre de 10^{10} copies/ml) qu'il est difficile de mettre en évidence une diminution de la charge virale en présence d'un inhibiteur.

Les IFN dans l'infection par le virus BK

L'IFN-gamma semble jouer un rôle important dans le contrôle de l'infection par le virus BK. La réduction de la production de l'IFN-alpha et de l'IFN-gamma chez les personnes immunodéprimées pourrait être responsable en partie de la réactivation et du développement ultérieur des maladies associées au virus BK. Le système immunitaire est complexe du fait de l'implication de nombreux acteurs et de leurs interactions. La réponse innée seule n'est pas suffisante pour empêcher la réactivation du virus. Elle collabore avec l'immunité adaptative pour contrôler l'infection. Notre modèle d'étude cellulaire n'inclut pas les potentiels mécanismes d'inhibition spécifique de l'infection par l'induction de l'expression de cytokines inflammatoires et l'augmentation des molécules de CMH I et II.

Lorsque certains transplantés rénaux réactivent le virus et développent une néphropathie à virus BK, d'autres sous un même traitement immunosuppresseur, ne réactivent

pas le virus. De nombreux facteurs liés à l'hôte, à l'organe cible ou au virus peuvent expliquer ces différences. Les différences génétiques entre les hôtes constituent un facteur potentiel. Récemment, une étude clinique a montré une corrélation entre le polymorphisme du gène de l'IFN-gamma et la susceptibilité à l'infection par le virus BK dans une population hispanique (n=251) [115]. Il est possible que certains transplantés rénaux avec un certain polymorphisme des gènes de l'interféron produisent moins d'interféron et soient plus vulnérables à la réactivation du virus sous traitements immunosuppresseurs. Le dépistage de patients avec de tels polymorphismes pourrait permettre d'établir un niveau approprié d'immunosuppresseurs nécessaires à la prévention du rejet de greffe et maintenir la capacité du système immunitaire à réprimer la réactivation du virus BK.

Chez les transplantés, l'utilisation de l'IFN-gamma comme alternative à la réduction des traitements immunosuppresseurs lors d'une réactivation à virus BK semble limitée. En effet, l'IFN-gamma amplifie la réponse des lymphocytes T alors que les traitements immunosuppresseurs indiqués en transplantation visent précisément à réduire cette réponse lymphocytaire pour éviter un rejet du greffon. En revanche, trouver le mécanisme d'action antiviral de l'IFN-gamma sur le virus BK permettrait de découvrir des cibles thérapeutiques potentielles. Ainsi, dans le but d'identifier par quel mécanisme l'IFN-gamma exerce son effet antiviral sur le virus BK, nous avons recherché quels ISG pourraient être impliqués dans cet effet antiviral.

Analyse transcriptionnelle des ISG induits par les différents types d'IFN

L'étude transcriptionnelle des ISG induits pour les trois types d'IFN a conduit à une détection simultanée de 64 ISG. Cette étude avait d'abord été réalisée dans les cellules Véro, mais certains ISG n'ont pas pu être détectés probablement en raison de l'origine simienne de ces cellules. En effet, certaines amorces seraient spécifiques des gènes humains. Nous avons donc renouvelé l'expérience dans les cellules rénales 293FT d'origine humaine. Le répertoire des ISG testés n'est bien sûr pas exhaustif de l'ensemble des ISG décrits mais a quand même permis une détection d'un grand nombre d'ISG différents. Parmi les 64 ISG détectés, nous avons isolé ceux qui présentaient un profil d'induction similaire à l'effet antiviral observé c'est-à-dire ceux fortement induits par l'IFN-gamma, un peu par l'IFN-alpha et pas du tout par l'IFN-lambda. Ainsi, nous avons sélectionné 5 ISG : GBP1, GBP2,IDO, IRF-1 et PSMB9. Entre les 5 ISG sélectionnés, IDO apparaît être le candidat le plus attractif dans notre contexte compte-tenu de ses propriétés antivirales et immunorégulatrices.

IDO dans les transplantations d'organes

Plusieurs études ont suggéré un rôle d'IDO dans la tolérance immune vis-à-vis d'un organe transplanté. Lors de l'allogreffe de foie chez la souris, le blocage de IDO par le 1-MT induit le rejet du greffon [107]. De plus, il a été observé que la transplantation de cellules pancréatiques exprimant IDO chez la souris augmente la survie du greffon en inhibant la réponse des lymphocytes T [108]. Aussi, il a été montré que IDO contribuait à l'immunos tolérance vis-à-vis du greffon dans un modèle murin de transplantation cardiaque [109]. Ces résultats suggèrent qu'IDO pourrait trouver sa place dans l'arsenal thérapeutique chez le patient transplanté [116, 117].

IDO dans les infections virales

La réplication de nombreux virus appartenant à des familles virales très différentes est inhibée par IDO *in vitro* (Dengue, VHB, West Nile). Dans ces cas, la supplémentation en Trp restaurait la réplication virale suggérant pour ces virus que l'activité métabolique de IDO serait directement impliquée dans son activité antivirale. Mais les mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet antiviral de IDO ne sont pas bien connus.

D'autres études ont souligné un rôle de IDO dans la persistance et/ou la progression de certaines infections virales en raison de ses propriétés immunomodulatrices [118]. En participant à la tolérance immunitaire périphérique, l'expression de IDO altère l'efficacité des mécanismes de défense antimicrobienne et favorise la persistance de certaines infections virales. IDO est exprimé dans de nombreuses infections virales avec une élévation du ratio des concentrations sériques Kynurénine/Trp dans la dengue, les hépatites B et C ou l'infection par le VIH [102, 119, 120]. L'expression de IDO est souvent corrélée à la sévérité de l'infection virale et/ou à la mortalité accrue [121]. Sadeghi *et al*, ont étudié la relevance clinique du Trp plasmatique et de ses catabolites (Kynurénine et dérivés) chez les transplantés rénaux avec une infection à CMV ou à virus BK [122]. Chez les transplantés rénaux BKV+, il n'a pas été observé d'augmentation du ratio des concentrations sériques Kynurénine/Trp, contrairement aux transplantés rénaux CMV+ pour lesquels l'augmentation de ce ratio est associée à la sévérité de l'infection. L'effet « dominant » de IDO, antimicrobien ou immunorégulateur, serait variable en fonction de l'agent pathogène considéré [123]. Le niveau d'expression de IDO pourrait être plus élevé dans le cas du VIH, du VHC et du VHB que lors des autres infections virales, favorisant ainsi la persistance de ces virus.

IDO a donc un rôle ambivalent au cours des infections virales en favorisant la résolution ou au contraire la persistance de l'infection.

Contribution de IDO dans l'effet antiviral observé des IFN : tests préliminaires

L'expression de IDO induit à la fois une déplétion en Trp et une accumulation de kynurénines. La plupart des études sur l'activité antivirale de IDO ont montré l'impact de la déplétion en Trp en ajoutant du Trp d'origine exogène dans le milieu de culture pour compenser l'activité de IDO. Nous avons testé cette expérience sans obtenir le résultat espéré. Nous avons alors inhibé le site actif enzymatique de IDO avec le 1-DL-MT. Nos résultats montrent que le 1-DL-MT restaure partiellement l'expression de VP1 en présence d'IFN-gamma. Ce résultat suggère que l'activité enzymatique de IDO pourrait avoir un effet antiviral sur le virus BK. Et cet effet antiviral pourrait être dû à une accumulation de kynurénines plutôt qu'à une déplétion en Trp. En effet, les kynurénines possèdent des propriétés antimicrobiennes *in vitro* [124] mais leur impact sur la réplication virale a été peu étudié à ce jour. Nous pourrions réaliser une étude supplémentaire, en stimulant les cellules Véro infectées avec un cocktail de différentes kynurénines à des doses non toxiques, pour évaluer l'impact des kynurénines sur la réplication du virus BK.

IRF-1 active l'expression de IDO

Parmi les 5 protéines que nous avons isolées, IRF-1 est aussi une piste à explorer. Des études antérieures ont suggéré que le facteur de transcription STAT-1 coopère avec IRF-1 pour stimuler l'expression de IDO [125, 126]. Puisque STAT-1 est impliquée dans l'expression de IRF-1 [127], l'activation prolongée de STAT-1 pourrait soutenir à la fois l'expression de IRF-1 et celle de IDO.

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La réactivation du virus BK en transplantation rénale peut conduire à des complications graves telles que des néphropathies à virus BK, pouvant conduire à une perte du greffon. En l'absence de traitements spécifiques, ces néphropathies relèvent d'un véritable challenge en transplantation rénale. En effet, une immunosuppression thérapeutique trop importante est un facteur de risque de néphropathie, mais si elle est insuffisante, le risque de rejet du greffon est augmenté. Dans les deux cas, l'évolution est la dégradation progressive de la fonction du greffon jusqu'à sa perte. Il est donc nécessaire de développer des stratégies alternatives à la réduction des traitements immunosuppresseurs chez les transplantés ayant réactivé le virus BK.

Les IFN pourraient jouer un rôle important dans le contrôle de la réactivation du virus BK. Nous avons testé les trois types d'IFN sur le virus BK dans les cellules Véro. Nous avons confirmé l'effet antiviral de l'IFN-gamma sur le virus BK mais le mécanisme est inconnu. La découverte du mécanisme d'action de l'IFN-gamma pourrait nous aider à développer une stratégie thérapeutique. Ainsi, nous avons isolé 5 protéines qui pourraient être impliquées dans l'effet antiviral de l'IFN-gamma. L'une d'entre elles, l'indoleamine 2,3-dioxygénase ou IDO, présente un double intérêt dans le contexte d'une réactivation à virus BK chez le transplanté rénal. En effet IDO possède une activité antivirale et une activité immunorégulatrice. Nos résultats préliminaires pour évaluer le potentiel effet antiviral de IDO sur le virus BK nous encouragent à poursuivre nos recherches sur la contribution de IDO dans l'effet antiviral de l'IFN-gamma.

Actuellement, nous cherchons à démontrer un effet antiviral de IDO sur le virus BK dans les cellules Véro. Dans ce but, nous envisageons de surexprimer IDO dans les cellules Véro afin d'observer un effet antiviral et de bloquer son expression par *silencing* à l'aide de *siRNA* (*small interfering RNA*) dirigé contre IDO. Si le blocage de IDO restaure totalement la réplication du virus BK dans les cellules Véro traitées par l'IFN-gamma, cela suggèrera que IDO contribue à l'effet antiviral de l'IFN-gamma sur le virus BK.

La modulation pharmacologique de IDO pourrait trouver sa place dans l'arsenal thérapeutique chez les transplantés rénaux ayant réactivé le virus BK.

Communication orale :

Ce travail a été présenté lors du *19th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology* le 16 septembre 2016 à Lisbonne.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Hirsch HH, Steiger J: **Polyomavirus BK**. *Lancet Infect Dis* 2003, **3**(10):611-623.
2. Ramos E, Drachenberg CB, Portocarrero M, Wali R, Klassen DK, Fink JC, Farney A, Hirsch H, Papadimitriou JC, Cangro CB *et al*: **BK virus nephropathy diagnosis and treatment: experience at the University of Maryland Renal Transplant Program**. *Clin Transpl* 2002:143-153.
3. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J: **Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients**. *N Engl J Med* 2002, **347**(7):488-496.
4. Randhawa P, Brennan DC: **BK virus infection in transplant recipients: an overview and update**. *Am J Transplant* 2006, **6**(9):2000-2005.
5. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B: **New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation**. *Lancet* 1971, **1**(7712):1253-1257.
6. Gross L: **A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice**. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953, **83**(2):414-421.
7. Eddy BE, Rowe WP, Hartley JW, Stewart SE, Huebner RJ: **Hemagglutination with the SE polyoma virus**. *Virology* 1958, **6**(1):290-291.
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, **1**(7712):1257-1260.
9. Mazalrey Simon MID, Bressollette-Bodin Céline: **Le polyomavirus BK. Interactions virus-cellule, réponse immunitaire antivirale, pathogénèse virale**. *Virologie* 2015, **19**(numéro 5).
10. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL: **Seroepidemiology of human polyomaviruses**. *PLoS Pathog* 2009, **5**(3):e1000363.
11. Knowles W: **The epidemiology of BK virus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes**. Khalili K, Stoner GL, eds *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives New-York: Wiley-Liss* 2001:527-559.
12. Viscidi RP, Rollison DE, Sondak VK, Silver B, Messina JL, Giuliano AR, Fulp W, Ajidahun A, Rivanera D: **Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus**. *Clin Vaccine Immunol* 2011, **18**(10):1737-1743.
13. Sroller V, Hamsikova E, Ludvikova V, Vochozkova P, Kojzarova M, Fraiberk M, Salakova M, Moravkova A, Forstova J, Nemeckova S: **Seroprevalence rates of BKV, JCV, and MCPyV polyomaviruses in the general Czech Republic population**. *J Med Virol* 2014, **86**(9):1560-1568.
14. Knowles WA: **Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV)**. *Adv Exp Med Biol* 2006, **577**:19-45.
15. Zheng HY, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, Ohno N, Sugimoto C, Takasaka T, Kitamura T *et al*: **Relationships between BK virus lineages and human populations**. *Microbes Infect* 2007, **9**(2):204-213.
16. Ikegaya H, Saukko PJ, Terti R, Metsarinne KP, Carr MJ, Crowley B, Sakurada K, Zheng HY, Kitamura T, Yogo Y: **Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations**. *J Gen Virol* 2006, **87**(Pt 11):3201-3208.
17. Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, Hokama S, Momose A, Funiyu T, Fujioka T *et al*: **Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region**. *J Gen Virol* 2004, **85**(Pt 10):2821-2827.

18. Nishimoto Y, Zheng HY, Zhong S, Ikegaya H, Chen Q, Sugimoto C, Kitamura T, Yogo Y: **An Asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis.** *J Mol Evol* 2007, **65**(1):103-111.
19. Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J: **BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: implications for transmission.** *Virology* 2009, **394**(2):183-193.
20. 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):91-99.
21. Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F, Girones R: **Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA.** *J Virol* 2001, **75**(21):10290-10299.
22. Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, Lavorino C, Manca M, Degener AM: **Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre.** *J Gen Virol* 2000, **81**(Pt 8):1967-1973.
23. 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, **158**(1):176-181.
24. Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Cocca N, Zaffaroni M, Riboni F, Monga G, Viscidi R: **Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in humans.** *J Gen Virol* 2011, **92**(Pt 5):1044-1050.
25. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH: **Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors.** *J Infect Dis* 2009, **199**(6):837-846.
26. Polo C, Perez JL, Mielnichuck A, Fedele CG, Niubo J, Tenorio A: **Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children.** *Clin Microbiol Infect* 2004, **10**(7):640-644.
27. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, Shapiro R, Vivas C, Jordan M, Picken MM, Demetris AJ: **Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney.** *Transplantation* 1999, **67**(1):103-109.
28. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nickleit V, Ramos E, Randhawa P *et al*: **Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations.** *Transplantation* 2005, **79**(10):1277-1286.
29. Lanot A, Bouvier N, Chatelet V, Dina J, Bechade C, Ficheux M, Henri P, Lobbedez T, Hurault de Ligny B: **[BK virus infections in kidney transplantation].** *Nephrol Ther* 2016, **12**(2):76-85.
30. Trofe J, Gordon J, Roy-Chaudhury P, Koralnik I, Atwood W, Eash S, Alloway RR, Khalili K, Alexander JW, Woodle ES: **Basic and clinical research in polyomavirus nephropathy.** *Exp Clin Transplant* 2004, **2**(1):162-173.
31. Trofe J, Gordon J, Roy-Chaudhury P, Koralnik IJ, Atwood WJ, Alloway RR, Khalili K, Woodle ES: **Polyomavirus nephropathy in kidney transplantation.** *Prog Transplant* 2004, **14**(2):130-140; quiz 141-132.
32. Leung AY, Chan M, Cheng VC, Lie AK, Yuen KY, Kwong YL: **Polyoma BK viruria in patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation.** *Bone Marrow Transplant* 2005, **35**(10):1029-1030.
33. Hirsch HH, Randhawa P: **BK polyomavirus in solid organ transplantation.** *Am J Transplant* 2013, **13 Suppl 4**:179-188.
34. Hwang YY, Sim J, Leung AY, Lie AK, Kwong YL: **BK virus-associated bilateral ureteric stenosis after haematopoietic SCT: viral kinetics and successful treatment.** *Bone Marrow Transplant* 2013, **48**(5):745-746.

35. Sandler ES, Aquino VM, Goss-Shohet E, Hinrichs S, Krisher K: **BK papova virus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation.** *Bone Marrow Transplant* 1997, **20**(2):163-165.
36. Medeiros PV, Abagge KT, Carvalho VO, Bonfim CM, Raboni SM: **Polyomavirus BK: possibly associated skin eruption in a patient with hemorrhagic cystitis.** *Pediatr Dermatol* 2011, **28**(1):76-77.
37. Jeffers L, Webster-Cyriaque JY: **Viruses and salivary gland disease (SGD): lessons from HIV SGD.** *Adv Dent Res* 2011, **23**(1):79-83.
38. Burger-Calderon R, Madden V, Hallett RA, Gingerich AD, Nickeleit V, Webster-Cyriaque J: **Replication of oral BK virus in human salivary gland cells.** *J Virol* 2014, **88**(1):559-573.
39. Petrogiannis-Halioitis T, Sakoulas G, Kirby J, Koralknik IJ, Dvorak AM, Monahan-Earley R, PC DEG, U DEG, Upton M, Major EO *et al*: **BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient.** *N Engl J Med* 2001, **345**(17):1250-1255.
40. Fioriti D, Videtta M, Mischitelli M, Degener AM, Russo G, Giordano A, Pietropaolo V: **The human polyomavirus BK: Potential role in cancer.** *J Cell Physiol* 2005, **204**(2):402-406.
41. Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ: **BK virus and human cancer: innocent until proven guilty.** *Semin Cancer Biol* 2009, **19**(4):252-260.
42. Sawinski D, Goral S: **BK virus infection: an update on diagnosis and treatment.** *Nephrol Dial Transplant* 2015, **30**(2):209-217.
43. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA, Green MD, Jha V, Josephson MA, Kiberd BA *et al*: **KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary.** *Kidney Int* 2010, **77**(4):299-311.
44. Bernhoff E, Gutteberg TJ, Sandvik K, Hirsch HH, Rinaldo CH: **Cidofovir inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression.** *Am J Transplant* 2008, **8**(7):1413-1422.
45. Tylden GD, Hirsch HH, Rinaldo CH: **Brincidofovir (CMX001) inhibits BK polyomavirus replication in primary human urothelial cells.** *Antimicrob Agents Chemother* 2015, **59**(6):3306-3316.
46. Guasch A, Roy-Chaudhury P, Woodle ES, Fitzsimmons W, Holman J, First MR: **Assessment of efficacy and safety of FK778 in comparison with standard care in renal transplant recipients with untreated BK nephropathy.** *Transplantation* 2010, **90**(8):891-897.
47. Knoll GA, Humar A, Fergusson D, Johnston O, House AA, Kim SJ, Ramsay T, Chasse M, Pang X, Zaltzman J *et al*: **Levofloxacin for BK virus prophylaxis following kidney transplantation: a randomized clinical trial.** *JAMA* 2014, **312**(20):2106-2114.
48. Lee BT, Gabardi S, Grafals M, Hofmann RM, Akalin E, Aljanabi A, Mandelbrot DA, Adey DB, Heher E, Fan PY *et al*: **Efficacy of levofloxacin in the treatment of BK viremia: a multicenter, double-blinded, randomized, placebo-controlled trial.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2014, **9**(3):583-589.
49. Moens U. and Rekvig.P KKaSGL: **Molecular biology of BK virus and clinical and basic aspects of BK virus renal infection.** *Molecular and Clinical perspectives* 2001, **1**(Human polyomaviruses):359-408.
50. Yogo Y, Sugimoto C, Zhong S, Homma Y: **Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications.** *Rev Med Virol* 2009, **19**(4):185-199.
51. Abend JR, Joseph AE, Das D, Campbell-Cecen DB, Imperiale MJ: **A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA.** *J Gen Virol* 2009, **90**(Pt 5):1238-1245.

52. Gjoerup O, Chang Y: **Update on human polyomaviruses and cancer.** *Adv Cancer Res* 2010, **106**:1-51.
53. Topalis D, Andrei G, Snoeck R: **The large tumor antigen: a "Swiss Army knife" protein possessing the functions required for the polyomavirus life cycle.** *Antiviral Res* 2013, **97**(2):122-136.
54. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ: **Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus.** *J Virol* 2006, **80**(3):1361-1366.
55. Neu U, Allen SA, Blaum BS, Liu Y, Frank M, Palma AS, Stroh LJ, Feizi T, Peters T, Atwood WJ *et al*: **A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus.** *PLoS Pathog* 2013, **9**(10):e1003688.
56. Eash S, Querbes W, Atwood WJ: **Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae.** *J Virol* 2004, **78**(21):11583-11590.
57. Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A: **Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells.** *J Virol* 2007, **81**(16):8552-8562.
58. Moriyama T, Sorokin A: **Intracellular trafficking pathway of BK Virus in human renal proximal tubular epithelial cells.** *Virology* 2008, **371**(2):336-349.
59. Isaacs A, Lindenmann J: **Virus interference. I. The interferon.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957, **147**(927):258-267.
60. Plataniias LC: **Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**(5):375-386.
61. Uze G, Monneron D: **IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family.** *Biochimie* 2007, **89**(6-7):729-734.
62. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, Hergott D, Porter-Gill P, Mumy A, Kohaar I *et al*: **A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus.** *Nat Genet* 2013, **45**(2):164-171.
63. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ: **The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood.** *Science* 1999, **284**(5421):1835-1837.
64. Liu YJ: **IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors.** *Annu Rev Immunol* 2005, **23**:275-306.
65. Garcia-Sastre A, Biron CA: **Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente.** *Science* 2006, **312**(5775):879-882.
66. Samuel CE: **Antiviral actions of interferons.** *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**(4):778-809, table of contents.
67. Levy DE, Garcia-Sastre A: **The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2001, **12**(2-3):143-156.
68. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T: **IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo.** *PLoS Pathog* 2008, **4**(3):e1000017.
69. Pestka S, Krause CD, Walter MR: **Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.** *Immunol Rev* 2004, **202**:8-32.
70. Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Borden R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S: **Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons.** *Cancer Res* 1998, **58**(12):2489-2499.
71. Valente G, Ozmen L, Novelli F, Geuna M, Palestro G, Forni G, Garotta G: **Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues.** *Eur J Immunol* 1992, **22**(9):2403-2412.
72. Biron CA: **Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look.** *Immunity* 2001, **14**(6):661-664.

73. Iwasaki A: **A virological view of innate immune recognition.** *Annu Rev Microbiol* 2012, **66**:177-196.
74. Barber GN: **Cytoplasmic DNA innate immune pathways.** *Immunol Rev* 2011, **243**(1):99-108.
75. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM: **Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses.** *Annu Rev Immunol* 2014, **32**:513-545.
76. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA: **The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.** *Cell* 1996, **86**(6):973-983.
77. Kawai T, Akira S: **Antiviral signaling through pattern recognition receptors.** *J Biochem* 2007, **141**(2):137-145.
78. Pichlmair A, Reis e Sousa C: **Innate recognition of viruses.** *Immunity* 2007, **27**(3):370-383.
79. Heim MH, Thimme R: **Innate and adaptive immune responses in HCV infections.** *J Hepatol* 2014, **61**(1 Suppl):S14-25.
80. Wen Z, Darnell JE, Jr.: **Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(11):2062-2067.
81. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr.: **Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation.** *Cell* 1995, **82**(2):241-250.
82. Varinou L, Ramsauer K, Karaghiosoff M, Kolbe T, Pfeffer K, Muller M, Decker T: **Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity.** *Immunity* 2003, **19**(6):793-802.
83. Schoggins JW, Rice CM: **Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions.** *Curr Opin Virol* 2011, **1**(6):519-525.
84. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH: **Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(26):15623-15628.
85. Ivashkiv LB, Donlin LT: **Regulation of type I interferon responses.** *Nat Rev Immunol* 2014, **14**(1):36-49.
86. Malakhov MP, Malakhova OA, Kim KI, Ritchie KJ, Zhang DE: **UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins.** *J Biol Chem* 2002, **277**(12):9976-9981.
87. Ribeiro A, Wornle M, Motamedi N, Anders HJ, Grone EF, Nitschko H, Kurktschiev P, Debiec H, Kretzler M, Cohen CD *et al*: **Activation of innate immune defense mechanisms contributes to polyomavirus BK-associated nephropathy.** *Kidney Int* 2012, **81**(1):100-111.
88. Abend JR, Low JA, Imperiale MJ: **Inhibitory effect of gamma interferon on BK virus gene expression and replication.** *J Virol* 2007, **81**(1):272-279.
89. Acott PD, O'Regan PA, Lee SH, Crocker JF: **Utilization of vero cells for primary and chronic BK virus infection.** *Transplant Proc* 2006, **38**(10):3502-3505.
90. Descamps V, Martin E, Morel V, Francois C, Helle F, Duverlie G, Castelain S, Brochot E: **Comparative Evaluation of Three Nucleic Acid-Based Assays for BK Virus Quantification.** *J Clin Microbiol* 2015, **53**(12):3822-3827.
91. Hierholzer JC, RB K: **Virology Methods Manual.** 1996:41-43.
92. Chew T, Noyce R, Collins SE, Hancock MH, Mossman KL: **Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production.** *Mol Immunol* 2009, **46**(3):393-399.
93. Anderson SL, Carton JM, Lou J, Xing L, Rubin BY: **Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus.** *Virology* 1999, **256**(1):8-14.
94. Itsui Y, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Koyama T, Takeda Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Sekine Y *et al*: **Expressional screening of interferon-**

- stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J Viral Hepat* 2006, **13**(10):690-700.**
95. Vestal DJ, Jeyaratnam JA: **The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase.** *J Interferon Cytokine Res* 2011, **31**(1):89-97.
96. Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S: **Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells.** *J Immunol* 1999, **162**(2):957-964.
97. Adams O, Besken K, Oberdorfer C, MacKenzie CR, Takikawa O, Daubener W: **Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections.** *J Virol* 2004, **78**(5):2632-2636.
98. Adams O, Besken K, Oberdorfer C, MacKenzie CR, Russing D, Daubener W: **Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase.** *Microbes Infect* 2004, **6**(9):806-812.
99. Mao R, Zhang J, Jiang D, Cai D, Levy JM, Cuconati A, Block TM, Guo JT, Guo H: **Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates the antiviral effect of gamma interferon against hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells.** *J Virol* 2011, **85**(2):1048-1057.
100. Terajima M, Leporati AM: **Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Antiviral Activity of Interferon-gamma Against Vaccinia Virus.** *Viral Immunol* 2005, **18**(4):722-729.
101. Yeung AW, Wu W, Freewan M, Stocker R, King NJ, Thomas SR: **Flavivirus infection induces indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocyte-derived macrophages via tumor necrosis factor and NF-kappaB.** *J Leukoc Biol* 2012, **91**(4):657-666.
102. Becerra A, Warke RV, Khaja K, Evans B, Evans J, Martin K, de Bosch N, Rothman AL, Bosch I: **Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected dengue patients linked to gamma interferon antiviral function.** *J Gen Virol* 2009, **90**(Pt 4):810-817.
103. Kroger A, Koster M, Schroeder K, Hauser H, Mueller PP: **Activities of IRF-1.** *J Interferon Cytokine Res* 2002, **22**(1):5-14.
104. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T: **The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis.** *Annu Rev Immunol* 2008, **26**:535-584.
105. Konan KV, Taylor MW: **Importance of the two interferon-stimulated response element (ISRE) sequences in the regulation of the human indoleamine 2,3-dioxygenase gene.** *J Biol Chem* 1996, **271**(32):19140-19145.
106. Kimura T, Kadokawa Y, Harada H, Matsumoto M, Sato M, Kashiwazaki Y, Tarutani M, Tan RS, Takasugi T, Matsuyama T *et al*: **Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3 gamma) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies.** *Genes Cells* 1996, **1**(1):115-124.
107. Miki T, Sun H, Lee Y, Tandin A, Kovscek AM, Subbotin V, Fung JJ, Valdivia LA: **Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts.** *Transplant Proc* 2001, **33**(1-2):129-130.
108. Alexander AM, Crawford M, Bertera S, Rudert WA, Takikawa O, Robbins PD, Trucco M: **Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes.** *Diabetes* 2002, **51**(2):356-365.
109. Sucher R, Fischler K, Oberhuber R, Kronberger I, Margreiter C, Ollinger R, Schneeberger S, Fuchs D, Werner ER, Watschinger K *et al*: **IDO and regulatory T**

- cell support are critical for cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4 Ig-mediated long-term solid organ allograft survival. *J Immunol* 2012, **188**(1):37-46.
110. Greco FA, Coletti A, Camaioni E, Carotti A, Marinozzi M, Gioiello A, Macchiarulo A: **The Janus-faced nature of IDO1 in infectious diseases: challenges and therapeutic opportunities.** *Future Med Chem* 2016, **8**(1):39-54.
 111. Wilson JJ, Lin E, Pack CD, Frost EL, Hadley A, Swimm AI, Wang J, Dong Y, Breeden CP, Kalman D *et al*: **Gamma interferon controls mouse polyomavirus infection in vivo.** *J Virol* 2011, **85**(19):10126-10134.
 112. Burdeinick-Kerr R, Govindarajan D, Griffin DE: **Noncytolytic clearance of sindbis virus infection from neurons by gamma interferon is dependent on Jak/STAT signaling.** *J Virol* 2009, **83**(8):3429-3435.
 113. Trilling M, Le VT, Rashidi-Alavijeh J, Katschinski B, Scheller J, Rose-John S, Androsiac GE, Jonjic S, Poli V, Pfeffer K *et al*: **"Activated" STAT proteins: a paradoxical consequence of inhibited JAK-STAT signaling in cytomegalovirus-infected cells.** *J Immunol* 2014, **192**(1):447-458.
 114. Sohn SY, Hearing P: **Adenovirus sequesters phosphorylated STAT1 at viral replication centers and inhibits STAT dephosphorylation.** *J Virol* 2011, **85**(15):7555-7562.
 115. Vu D, Sakharkar P, Shah T, Naraghi R, Yasir Q, Hutchinson I, Min D: **Association of interferon gamma gene polymorphisms with BK virus infection among Hispanic renal allograft recipients.** *Transplantation* 2014, **97**(6):660-667.
 116. Mulley WR, Nikolic-Paterson DJ: **Indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation.** *Nephrology (Carlton)* 2008, **13**(3):204-211.
 117. Hainz U, Jurgens B, Heitger A: **The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation.** *Transpl Int* 2007, **20**(2):118-127.
 118. Mehraj V, Routy JP: **Tryptophan Catabolism in Chronic Viral Infections: Handling Uninvited Guests.** *Int J Tryptophan Res* 2015, **8**:41-48.
 119. Chen YB, Li SD, He YP, Shi XJ, Chen Y, Gong JP: **Immunosuppressive effect of IDO on T cells in patients with chronic hepatitis B*.** *Hepatol Res* 2009, **39**(5):463-468.
 120. Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N *et al*: **Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection.** *J Gastroenterol* 2013, **48**(5):660-670.
 121. Byakwaga H, Boum Y, 2nd, Huang Y, Muzoora C, Kembabazi A, Weiser SD, Bennett J, Cao H, Haberer JE, Deeks SG *et al*: **The kynurenine pathway of tryptophan catabolism, CD4+ T-cell recovery, and mortality among HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy.** *J Infect Dis* 2014, **210**(3):383-391.
 122. Sadeghi M, Lahdou I, Daniel V, Schnitzler P, Fusch G, Schefold JC, Zeier M, Iancu M, Opelz G, Terness P: **Strong association of phenylalanine and tryptophan metabolites with activated cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients.** *Hum Immunol* 2012, **73**(2):186-192.
 123. Divanovic S, Sawtell NM, Trompette A, Warning JI, Dias A, Cooper AM, Yap GS, Arditi M, Shimada K, Duhadaway JB *et al*: **Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular infection.** *J Infect Dis* 2012, **205**(1):152-161.
 124. Nino-Castro A, Abdullah Z, Popov A, Thabet Y, Beyer M, Knolle P, Domann E, Chakraborty T, Schmidt SV, Schultze JL: **The IDO1-induced kynurenines play a major role in the antimicrobial effect of human myeloid cells against *Listeria monocytogenes*.** *Innate Immun* 2014, **20**(4):401-411.
 125. Chon SY, Hassanain HH, Gupta SL: **Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible**

- expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J Biol Chem* 1996, **271**(29):17247-17252.**
126. Jeong YI, Kim SW, Jung ID, Lee JS, Chang JH, Lee CM, Chun SH, Yoon MS, Kim GT, Ryu SW *et al*: **Curcumin suppresses the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by blocking the Janus-activated kinase-protein kinase Cdelta-STAT1 signaling pathway in interferon-gamma-stimulated murine dendritic cells.** *J Biol Chem* 2009, **284**(6):3700-3708.
127. Ramsauer K, Farlik M, Zupkovitz G, Seiser C, Kroger A, Hauser H, Decker T: **Distinct modes of action applied by transcription factors STAT1 and IRF1 to initiate transcription of the IFN-gamma-inducible gbp2 gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(8):2849-2854.

VIII. ANNEXES

Tableau n°1 : Expression relative des ARNm de 64 ISG dans les cellules stimulées par l'IFN-alpha, lambda ou gamma par rapport aux cellules non stimulées

ISG	IFN-alpha	IFN-lambda	IFN-gamma
ACTB	1,37	1,01	0,85
ADAR	1,36	1,10	1,34
ALCAM	1,34	1,11	1,38
BAK1	1,11	0,93	1,00
CCL2	1,68	0,93	7,17
CD47	1,59	1,69	1,71
DDX58	13,78	3,40	2,11
EIF2AK2	4,67	1,34	1,59
FAS	1,65	1,21	1,94
GAPDH	1,37	0,86	0,94
GBP1	25,78	1,45	411,70
GBP2	1,10	0,72	47,47
ICAM1	3,09	1,64	1,43
IFI27	83,94	6,10	5,15
IFI35	6,58	2,03	4,84
IFI44	952,30	578,89	42,37
IFIH1	16,01	3,90	4,88
IFIT1	110,35	17,02	1,87
IFIT2	24,39	4,76	6,69
IFIT3	47,27	5,65	6,50
IFIT5	12,41	2,03	1,64
IFITM1	45,56	3,36	2,90
IFNAR1	1,58	0,97	1,12
IFNAR2	1,28	1,00	1,33
IL10RA	1,69	1,56	2,29
IL15RA	1,69	1,00	3,92
IL6	0,70	0,69	0,68
IL8	1,58	1,00	1,48
IDO	1,65	1,00	900,42
IRF1	2,26	1,13	19,50
IRF3	1,10	0,77	0,71
IRF4	27,15	1,13	1,67
IRF5	1,59	0,98	1,23
IRF6	1,87	0,88	1,25
IRF8	1,73	2,09	7,68
ISG20	2,23	2,30	2,36
ISGF3G	8,36	0,40	0,22
MX1	7,77	2,92	0,93
NFKBIA	1,18	0,97	1,05
NMI	3,37	2,07	9,37
OAS1	7068,43	890,30	64,20
OAS2	1864,12	165,82	42,05
OAS3	16,14	3,71	3,00
PLSCR1	8,78	2,14	1,79
PML	2,95	1,79	1,67
PRKRA	1,25	0,91	0,89
PSMB10	1,27	1,02	1,71
PSMB8	4,25	0,77	4,38
PSMB9	4,93	1,03	40,75
PSMD8	1,27	0,92	0,92
PSME1	2,34	1,40	4,69
RELA	1,32	1,25	1,40
RELB	1,36	1,00	0,75
SP110	9,80	1,27	3,86
STAT1	8,84	3,58	10,63
STAT2	3,97	1,57	2,69
STAT3	1,43	1,49	2,93
STAT4	2,39	1,66	1,28
STAT5B	1,40	1,04	1,06
TNFSF10	3,62	2,46	2,04
TRADD	1,54	0,86	0,92
TRIM21	3,29	1,78	2,99
TRIM25	3,66	1,78	1,78
USP18	2,30	1,38	0,99

Elodie MARTIN

EFFET ANTIVIRAL DES INTERFÉRONS SUR LE VIRUS BK

Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

Université de Picardie Jules Verne

Année 2016

Mots clés : Virus BK, Interférons, Jak-STAT, ISG, cellules Véro

Résumé :

Le polyomavirus humain BK est un pathogène ubiquiste qui établit une infection persistante asymptomatique dans les voies rénales de 80% de la population humaine. Chez les patients immunodéprimés, la réactivation du virus BK est à l'origine de néphropathies ou de cystites hémorragiques. L'augmentation des pathologies associées au virus BK en même temps que l'utilisation de traitements immunosuppresseurs de plus en plus puissants souligne un lien étroit entre la réponse immunitaire de l'hôte et la réactivation virale. Cependant la réponse immune à l'infection par le virus BK, en particulier le rôle des cytokines antivirales dans le contrôle de l'infection est peu documentée.

Ici, nous avons étudié l'effet antiviral des interférons (IFN) sur le virus BK dans les cellules rénales. Nous avons testé les IFN-alpha, lambda et gamma sur la souche Dunlop du virus BK dans les cellules Véro et 293FT. L'IFN-gamma inhibe de façon dose-dépendante la transcription virale de la région précoce et de la région tardive ainsi que l'expression de la protéine virale VP1. Un moindre effet antiviral a été observé avec l'IFN-alpha et l'IFN-lambda. Ces résultats sont associés à une phosphorylation prolongée de STAT-1 avec l'IFN-gamma, non retrouvée avec l'IFN-alpha et lambda. La différence d'efficacité entre ces trois types d'IFN suggère que certaines protéines induites seulement par l'IFN-gamma ont un effet antiviral sur le virus BK. L'analyse transcriptionnelle révèle cinq protéines qui pourraient être impliquées dans cet effet antiviral et sont en cours d'étude.

En conclusion, l'IFN le plus puissant sur le virus BK est l'IFN-gamma. Trouver le mécanisme d'action de cet effet pourrait nous aider à développer une stratégie thérapeutique.

Président : - Professeur Gilles DUVERLIE, Virologie, CHU Amiens

Membres : - Professeur Christophe CARNOY, Immunologie, Lille
- Docteur Claire PRESNE, Néphrologie, CHU Amiens
- Docteur Anne-Sophie HURTEL-LEMAIRE, Pharmacologie, CHU Amiens
- Docteur Catherine FRANÇOIS, Virologie, CHU Amiens

