



HAL
open science

Revue de la littérature sur la région non codante du BK Virus : illustration par l'étude de la région non codante du BK Virus chez 18 patients bordelais

Jordi Pacaud

► To cite this version:

Jordi Pacaud. Revue de la littérature sur la région non codante du BK Virus : illustration par l'étude de la région non codante du BK Virus chez 18 patients bordelais. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03048592

HAL Id: dumas-03048592

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03048592>

Submitted on 9 Dec 2020

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.



Université de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2020

Thèse n° 3197

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Spécialité Biologie Médicale

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 Octobre 2020

Par Jordi PACAUD

Né le 17 Novembre 1986 à Saint-Michel (16)

**REVUE DE LA BIBLIOGRAPHIE SUR LA REGION NON CODANTE DU
BK VIRUS. ILLUSTRATION PAR L'ETUDE DE LA REGION NON
CODANTE DU BK VIRUS CHEZ 18 PATIENTS BORDELAIS**

Sous la direction de Madame le Professeur Marie-Edith LAFON

Membres du jury :

Madame le Professeur Cécile BEBEAR

Président

Madame le Professeur Sandrine DABERNAT

Rapporteur

Monsieur le Docteur Edouard FORCADE

Examineur

Madame le Docteur Brigitte LLANAS

Examineur

Madame le Docteur Camille CICCONE

Examineur



Université de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2020

Thèse n° 3197

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Spécialité Biologie Médicale

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 Octobre 2020

Par Jordi PACAUD

Né le 17 Novembre 1986 à Saint-Michel (16)

**REVUE DE LA BIBLIOGRAPHIE SUR LA REGION NON CODANTE DU
BK VIRUS. ILLUSTRATION PAR L'ETUDE DE LA REGION NON
CODANTE DU BK VIRUS CHEZ 18 PATIENTS BORDELAIS**

Sous la direction de Madame le Professeur Marie-Edith LAFON

Membres du jury :

Madame le Professeur Cécile BEBEAR

Président

Madame le Professeur Sandrine DABERNAT

Rapporteur

Monsieur le Docteur Edouard FORCADE

Examineur

Madame le Docteur Brigitte LLANAS

Examineur

Madame le Docteur Camille CICCONE

Examineur

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury,

A Madame le Professeur Cécile Bébéar, présidente du jury, votre implication dans la coordination du DES de Biologie Médicale du CHU de Bordeaux vous place au plus près du cursus des internes et des orientations individuelles. A ce titre, je suis honoré de bénéficier de votre regard sur mon travail ainsi que sur mon parcours qui s'est rapidement tourné vers la microbiologie. Votre expérience dans ce domaine constituera très certainement un atout précieux dans l'appréciation de ce projet. Je tiens également à vous remercier pour votre prévenance dans les moments délicats qui ont ponctué mes débuts d'internat.

A Madame le Professeur Sandrine Dabernat, rapporteur de thèse, je te suis reconnaissant d'avoir pris le temps de juger de la recevabilité de ce travail, que j'espère à la hauteur de tes attentes. Ton enthousiasme et ta curiosité scientifique ont suscité chez moi la volonté d'approfondir mes connaissances. Dans les moments de doute, tes encouragements m'ont conforté dans l'idée de découvrir le domaine de la recherche. Pour cela je te remercie chaleureusement et suis heureux de recevoir ton appréciation rigoureuse pour ce travail.

Au Docteur Edouard Forcade, examinateur de thèse, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Vous me faites l'honneur de porter sur ce travail votre regard d'hématologue clinicien, d'autant plus légitime que vous êtes impliqué dans la prise en charge des patients concernés par cette étude. Au fil des dossiers parcourus, j'ai entraperçu une spécialité riche et exigeante aux multiples spécificités en particulier dans la prise en charge des pathologies infectieuses. Veuillez recevoir toute ma gratitude pour votre expertise dans le cadre de cet exposé.

Au Docteur Brigitte Llanas, examinateur de thèse, je sais le contenu de ce travail quelque peu éloigné de vos activités quotidiennes et vous remercie d'avoir tout de même accepté de prendre part à ce jury. J'ai grandement apprécié votre encadrement lors de mon passage dans votre service et suis admiratif de l'énergie que vous déployez dans la prise en charge si particulière des enfants hospitalisés. Aujourd'hui, je suis très heureux de pouvoir bénéficier de votre appréciation sur ce travail et de partager avec vous ce moment important de mes études.

Au Docteur Camille Ciccone, examinateur de thèse, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir guidé pendant ce travail dont certains aspects rejoignent tes travaux actuels. Même à distance tu as fait preuve d'une grande disponibilité. Tes remarques ont été précieuses pour la rédaction de ce manuscrit. Je suis heureux de bénéficier de ton expérience sur le sujet et espère en retour avoir l'opportunité de t'assister pour mener à bien tes projets.

Au Professeur Marie-Edith Lafon, directeur de thèse, je suis honoré d'avoir pu mener ce travail sous ta direction. Malgré le contexte sanitaire actuel qui t'accapare, tu t'es montrée disponible pour suivre mes avancées dans ce projet et tes conseils ont souvent fait murir ma réflexion. J'admire ton enthousiasme, ta générosité, ton sens du partage qui créent une ambiance positive et inclusive dans le quotidien du laboratoire et qui contribuent à rendre passionnants les enseignements de virologie que tu dispenses. Les choix dans la vie sont souvent affaire de rencontres et il fait nul doute que mon expérience à tes côtés aura été marquante.

A mes collègues du laboratoire de virologie,

A Brigitte Tauzin, je te suis reconnaissant d'avoir pu m'accorder un peu de ton temps. Ton aide fût salvatrice dans la mise en œuvre des techniques de biologie moléculaire présentées dans ce travail. J'ai beaucoup appris à tes côtés et j'espère que nous aurons à nouveau l'occasion de travailler ensemble sur de nouveaux projets.

A Pascale Trimoulet et Isabelle Garrigue, je vous remercie chaleureusement pour votre patience, votre bonne humeur et votre encadrement tout au long de ce semestre qui s'achève trop rapidement. Votre porte toujours ouverte est une invitation aux échanges. Ils m'auront beaucoup apporté.

A Justine, j'ai apprécié ce semestre passé en ta compagnie. Je te remercie pour les sessions d'escalade, chouettes instants de décompression après des journées bien remplies en virologie, ponctuées par nos soucis de thèse respectifs. Je te souhaite un été perpétuel sous d'autres cieux et dans ton quotidien.

A mes collègues techniciens de laboratoire du plateau de biologie moléculaire, je vous remercie pour votre accueil dans un contexte sanitaire qui ne vous a pas laissé beaucoup de répit. Je me suis senti à mon aise et votre bienveillance à mon égard a été très appréciée.

A mes co-internes, Anne-Sophie, Victor-Emmanuel, Maxime, Paul, Julien, Thomas, Elodie R, Elodie B, Elodie W, Anaëlle, Marion, Léa, Lila, Audrey, Fanny, Mathilde, Elsa, Séverine, Aurélie, Sarah, Clémentine, Benjamin, Valentin, Ghanou, Paola, Cécile, Julie, Chloé, Emilie, Charly, Camille, Elvina, Julian, Etienne, je vous remercie pour ces années d'internat, plus douces en votre compagnie et vous souhaite à tous de vous épanouir dans vos projets personnels et professionnels.

A mes amis,

A Sophie, je te remercie pour ta relecture et tes corrections rendues dans des délais records. Dans tous les domaines, tes conseils sont souvent sages et appréciés. Je vous souhaite à Simon et toi le meilleur dans les années à venir.

A Matthieu, Fabien et Romain, que de chemin parcouru depuis notre rencontre ! Je me réjouis de vous voir construire votre vie de famille et suis toujours aussi enjoué à l'idée de partager des moments devenus trop rares avec vous. Vous m'êtes des amis chers avec qui je me suis forgé d'heureux souvenirs. Je vous souhaite de les enrichir continuellement.

A Mathilde, Sarah, Itsaso et Pierre, le hasard des rencontres fait parfois bien les choses. Vous avez contribué à mon adaptation à la vie bordelaise et ce fut un réel plaisir de vous côtoyer à la faculté, en stage et en dehors. Je salue vos parcours respectifs et espère que le temps n'affectera pas notre lien qui m'est précieux.

A ma famille,

A mes chers parents Patricia et Franck, je vous suis reconnaissant à bien des égards mais j'aimerais vous témoigner combien je suis heureux d'avoir pu grandir et m'épanouir dans un cadre aimant et soucieux du bien-être de vos enfants. Vous avez su nous accompagner sans jamais nous imposer une trajectoire qui ne nous ressemblait pas. Je mesure les sacrifices que vous avez consentis pour nous permettre d'atteindre nos objectifs. J'espère continuer à marcher dans vos pas et transmettre à mon tour tout l'amour que j'ai reçu.

A ma sœur Vicky, ma toute petite sœur déjà si grande ! Te voilà depuis longtemps une femme rayonnante. Je chéris les instants complices que nous avons vécu, parfois paisibles, parfois comme chien et chat. Ton bonheur m'a toujours importé et suis

désormais serein en apercevant le chemin que tu empreintes avec Damien et Théo. Je suis fier de toi.

A ma femme et mon fils,

Adélaïde, ces dernières années les heureux évènements se succèdent, les projets s'initient, notre quotidien s'enrichit. Tu sais à quel point cela compte pour moi et je t'en remercie. Tu m'as aidé à surmonter bien des épreuves en éveillant en moi la volonté de me surpasser.

L'arrivée d'Aloïs me gonfle d'enthousiasme et de fierté. Je manque encore de références bibliographiques sur le sujet, mais promis, je m'y mets entre deux tétés.

TABLE DES MATIERES

INDEX DES FIGURES

INDEX DES TABLEAUX

RESUME

ABREVIATIONS ET ACRONYMES

MANUSCRIT

I.	INTRODUCTION.....	14
1.	GENERALITES.....	14
	<i>a. Eléments de taxonomie des Polyomaviridae.....</i>	<i>14</i>
	<i>b. Historique des Polyomaviridae.....</i>	<i>14</i>
2.	LE BK VIRUS.....	15
	<i>a. Découverte.....</i>	<i>15</i>
	<i>b. Structure et organisation génomique.....</i>	<i>17</i>
	<i>c. Epidémiologie – Histoire naturelle de l’infection.....</i>	<i>19</i>
	<i>d. Cycle biologique du BKPyV.....</i>	<i>20</i>
	<i>e. Maladies associées.....</i>	<i>24</i>
	<i>f. Ressources thérapeutiques.....</i>	<i>31</i>
3.	FOCUS SUR LA NCCR DU BKPYV.....	34
	<i>a. Rétrospective.....</i>	<i>34</i>
	<i>b. Structure en blocs et réarrangements.....</i>	<i>36</i>
	<i>c. Sites de liaison aux facteurs de transcription.....</i>	<i>38</i>
	<i>d. Détection in vivo et implications cliniques.....</i>	<i>41</i>
	<i>e. Limites et perspectives.....</i>	<i>43</i>
4.	OBJECTIFS DE L’ETUDE.....	45
II.	MATERIEL ET METHODE.....	45
1.	REALISATION DE LA PCR BKPYV EN ROUTINE, AU LABORATOIRE DE VIROLOGIE.....	45
2.	ETUDE DE LA NCCR DU BKPYV DANS LES URINES DE PATIENTS D’HEMATOLOGIE.....	46
	<i>a. Echantillons et critères d’inclusion.....</i>	<i>46</i>
	<i>b. Extraction des acides nucléiques.....</i>	<i>47</i>
	<i>c. Mélange réactionnel de la PCR NCCR.....</i>	<i>47</i>
	<i>d. Amplification de la NCCR par PCR point final.....</i>	<i>48</i>
	<i>e. Purification enzymatique de l’échantillon par la méthode ExoSAP.....</i>	<i>50</i>

<i>f.</i>	<i>Séquençage de la NCCR du BKPyV.....</i>	<i>50</i>
<i>g.</i>	<i>Post-traitement et alignement de séquence.....</i>	<i>51</i>
<i>h.</i>	<i>Analyse des séquences NCCR obtenues.....</i>	<i>51</i>
III.	RESULTATS	52
1.	SEQUENÇAGE DE LA NCCR DU BKPYV SUR ECHANTILLON INITIAL	52
2.	SEQUENÇAGE DE LA NCCR DU BKPYV SUR ECHANTILLONS SUPPLEMENTAIRES.....	55
3.	ANALYSE DES NCCR SEQUENCEES.....	57
IV.	DISCUSSION.....	59
V.	CONCLUSION	62

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DOCUMENTS ANNEXES

SERMENT D'HIPPOCRATE

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU BKPYV.....	17
FIGURE 2. GENOME DU BKPYV.....	18
FIGURE 3. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE BIOLOGIQUE DU BKPYV.	23
FIGURE 4. NCCR DU BKPYV. REPRESENTATION EN BLOCS ET EXEMPLES DE REARRANGEMENTS.	36
FIGURE 5. REPARTITION DES TFBS AU SEIN DE LA NCCR.	38
FIGURE 6. MODELISATION DE L'INFLUENCE DES TFBS SUR LA TRANSCRIPTION DES GENES DU BKPYV.	40
FIGURE 7. PRINCIPE GENERAL DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE PAR L'AUTOMATE QIAXCEL®.	49
FIGURE 8. COMPTE-RENDU D'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE AVEC L'AUTOMATE QIAXCEL®.	49
FIGURE 9. EXEMPLE DE CHROMATOGRAMME D'UNE SEQUENCE NCCR DE BKPYV SOUS CHROMAS 2.6.6.....	51
FIGURE 10. ALIGNEMENT DES SEQUENCES NCCR AVEC LA NCCR ARCHETYPE DE REFERENCE.....	54
FIGURE 11. ALIGNEMENT DES SEQUENCES DE NCCR DE BKPYV SUPPLEMENTAIRES.	56

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1. POLYOMAVIRUS HUMAINS, DECOUVERTE, SERO-PREVALENCE ET IMPLICATION EN PATHOLOGIE. ...	16
TABLEAU 2. DIFFERENTS GENOTYPES ET SOUS TYPES DE BKPyV.....	20
TABLEAU 3. FACTEURS DE RISQUE DE VIREMIE A BKPyV.....	26
TABLEAU 4. FACTEURS DE RISQUES ASSOCIES A LA SURVENUE DE BKVN.	27
TABLEAU 5. NEPHROPATHIE A BKPyV. MARQUEURS DIAGNOSTIQUES ET RECOMMANDATION DE TRAITEMENT	28
TABLEAU 6. EVALUATION ET GRADES DE L'HEMATURIE.....	29
TABLEAU 7. INCIDENCE DE LA BKPyV-CH EN FONCTION DU TYPE DE GREFFE ET DE L'AGE DES PATIENTS.	30
TABLEAU 8. FACTEURS DE RISQUES DE BKPyV-HC.	31
TABLEAU 9. MELANGE REACTIONNEL POUR AMPLIFICATION DE LA NCCR DU BKPyV PAR PCR POINT FINAL....	47
TABLEAU 10. AMORCES UTILISEES POUR LA PCR ET LE SEQUENÇAGE DE LA NCCR.	48
TABLEAU 11. ETAPES DE L'AMPLIFICATION DE LA NCCR DU BKPyV PAR PCR POINT FINAL.	48
TABLEAU 12. MELANGE REACTIONNEL POUR LE SEQUENÇAGE DE LA NCCR DU BKPyV	50
TABLEAU 13. RESUME DES CARACTERISTIQUES DES PATIENTS.	52
TABLEAU 14. COMPARAISON DES SEQUENCES NCCR DE BKPyV AVEC LA LIBRAIRIE GENBANK DANS BLAST®.	53
TABLEAU 15. SEQUENÇAGE DE LA NCCR DU BKPyV SUR ECHANTILLONS SUPPLEMENTAIRES	55
TABLEAU 16. RESUME DES MUTATIONS DE LA NCCR. CONSEQUENCES SUR LES TFBS DU BKPyV.....	58

RESUME

Résumé : Le BK virus (BKPyV) est un virus à ADN de la famille des *Polyomaviridae* découvert en 1971. C'est un virus ubiquitaire, strictement humain dont le réservoir s'établit après la primo-infection dans le rein et le tractus urinaire. La primo-infection et les réactivations sont habituellement asymptomatiques mais constituent cependant une menace pour la santé des patients immunodéprimés en contexte de greffe rénale ou de greffe de cellules souches hématopoïétiques.

La région non codante du BKPyV, remarquable par sa plasticité, peut se présenter sous forme sauvage dite « archétype » ou réarrangée comportant des duplications et délétions en bloc. Par son interaction avec des facteurs de transcription cellulaire, elle orchestre la réplication de l'ADN viral ainsi que la transcription de gènes viraux précoces et tardifs. L'origine et la signification des réarrangements est incertaine. Des données expérimentales suggèrent que les souches de BKPyV arborant des réarrangements seraient associées à une pathogénicité plus importante, un tropisme cellulaire élargi ou encore un pouvoir transformant accru. Ces caractéristiques peinent toutefois à être confirmées *in vivo*.

Afin d'illustrer ces problématiques, nous avons séquencé puis analysé la structure de la région non codante du BKPyV répliquant à haut niveau dans les urines de 18 patients en situation de greffe de cellules souches hématopoïétiques entre le 01/04/2019 et le 31/03/2020 au CHU de Bordeaux. L'ensemble des régions non codantes du BKPyV séquencées était de conformation archétype. Les réarrangements de la région non codante semblent donc être un évènement rare et non associé à une réplication intense ainsi qu'à la survenue de cystite hémorragique liée au BKPyV. Un polymorphisme de plusieurs nucléotides a par ailleurs été mis en évidence et pourrait affecter la distribution des sites de liaison aux facteurs de transcription selon notre analyse prédictive. L'influence de ces variations de séquence sur transcription des gènes viraux reste néanmoins à être précisée.

Abstract: *BK Virus (BKpyV) is a DNA virus discovered in 1971 which belongs to the Polyomaviridae family. This virus is restricted to humans and widely spread within the population. After primary infection the virus establishes latency in kidneys and the urinary tract. Primary infection and reactivation are usually asymptomatic but may turn into a severe threat for immunocompromised patients who have undergone renal transplantation or hematopoietic stem cell transplantations.*

BKPyV non coding control region is remarkable for its plasticity. It can be found in wild-type conformation, called "archetype", or rearranged conformation which harbors block duplications and/or deletions. Through its interaction with cellular transcription factors, it orchestrates the replication of viral DNA as well as the transcription of early and late viral genes. The source and significance of such rearrangements remain unclear. Experimental data suggest that rearranged BKPyV could be associated with increased pathogenicity, enlarged cellular tropism or oncogenic properties. However, these features need to be confirmed in vivo.

In our study, we have sequenced then analyzed the non-coding control region of BKPyV found to replicate at high level in the urine of 18 patients after hematopoietic stem cell transplantation between 04/01/2019 and 03/31/2020 at University hospital of Bordeaux in France. All of the sequenced BKPyV non-coding control regions harbored archetype conformation. Thus, rearrangements of the non-coding control region seem to be rare in this context and not associated with high level replication of the BKPyV and BKPyV hemorrhagic cystitis. Besides, our archetype sequences revealed nucleotide polymorphism. A predictive analysis showed that those variations could affect transcription factor binding sites distribution among the non-coding control region. Whether such variations influence BKPyV gene transcription remains to be clarified in further studies.

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

AP-1	Activating Protein 1
AS	Souche AS de BKPyV (NCCR archétype)
BET	Bromure d'ethidium
BKPyV	BK Polyomavirus
BKPyV-CH	Cystite Hémorragique liée au BK Polyomavirus
BKTT	amorce d'amplification de la NCCR du BKPyV
BKVN	Néphropathie à BK Polyomavirus
CH	Cystite Hémorragique
CMV	Cytomegalovirus
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
Dik	Souche Dik de BKPyV (NCCR archétype)
Dun	Souche Dunlop de BKPyV (NCCR réarrangée)
dNTP	desoxy Nucléotide Trisphosphate
ddNTP	didesoxy Nucléotide Trisphosphate
EBV	Epstein Barr Virus
ECIL	European Conference on Infection in Leukemia
ERE	Élément de réponse aux estrogènes
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GVH	Réaction du greffon contre l'hôte
HHV-6	Human Herpes Virus 6
HSV	Herpes Simplex Virus
JCPyV	JC Polyomavirus
LED	Diode électroluminescente
LEMP	Leuco-Encéphalite Multifocale Progressive
LTA_g	Large T antigen
miRNA	micro ARN
MM	Souche MM de BKPyV (NCCR réarrangée)
MptV	Murine Pneumotropic Virus
MPyV	Mouse Polyomavirus
SV40	Simian Virus 40
NCCR	Non-Coding Control Region

NF-1	Nuclear Factor 1
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NGS	Séquençage Nouvelle Génération
NLS	Signal de localisation nucléaire
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDB	Paires de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PML-NB	Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies
PRE	Elément de réponse à la progestérone
PSH	Primary Sample Handling
PSU	PCR Set-Up
QS	Quantification Standard
RE	Réticulum Endoplasmique
RTPEC	Cellules Epithéliales Tubulaires Proximales Rénales
siRNA	ARN interférant
SIL	Système informatique de laboratoire
SP-1	Specificity Protein 1
STAg	Small T Antigen
TF	Facteur de transcription
TFBS	Site de liaison aux facteurs de transcription
Tm	Température de fusion
TruncTAg	Truncated T antigen
VP	Viral Protein
WT	Souche Prototype de BKPyV (NCCR réarrangée)
WW	Souche WW de BKPyV (NCCR archétype)
WWM	Souche WWM de BKPyV (NCCR archétype consensus)

I. Introduction

1. Généralités

a. Éléments de taxonomie des Polyomaviridae

Le BK Virus (BKPyV) est un virus ubiquitaire strictement humain appartenant à la famille des *Polyomaviridae*. Le nom « Poly-oma-viridae » fait référence au fait que les premiers virus étudiés induisaient de nombreuses tumeurs chez la souris.

Historiquement les Polyomavirus appartenaient à la famille des *Papovaviridae* à laquelle se rattachaient également les papillomavirus. Cette famille est supprimée depuis 2001 au profit de celle des *Polyomaviridae* d'une part et des *Papillomaviridae* d'autre part.

Les Polyomaviridae présentent les plusieurs caractéristiques communes. Ce sont des virus non enveloppés, à capsid icosaédrique de 40 à 45 nm. Ils possèdent un génome à ADN double brin circulaire d'environ 5 kpb avec une réplication bidirectionnelle à partir d'une origine unique de réplication. La traduction des protéines s'effectue en deux phases, précoce et tardive, avec épissage alternatif. Enfin les Polyomaviridae possèdent une spécificité d'hôte étroite.

On recense à ce jour plus de 95 espèces infectant une grande variété de mammifères dont l'Homme et dernièrement certaines espèces de poissons (1). Ces virus sont classés en 4 genres : *Alpha*, *Beta*, *Gamma* et *Deltapolyomavirus* en se basant sur la séquence d'acide aminés d'une protéine majeure et conservée de ces virus, le « LargeT antigen » (LTag) (1).

b. Historique des Polyomaviridae

Le premier représentant des *Polyomaviridae* le « *Murine pneumotropic Virus* » (MptV) a été découvert en 1952 par Lawrence Kilham (2) suivi par le « *Mouse Polyoma Virus* » (MPyV) découvert l'année suivante par Ludwick Gross au cours de ses travaux sur la leucémie de la souris (3,4). Le « *Simian Virus 40* » (SV40), a quant à lui été découvert en 1960 et fut à l'origine d'une controverse lors de sa mise en évidence dans les vaccins inactivés contre la poliomyélite administrée entre 1955 et 1963. Cette contamination de produits destinés à la santé humaine et utilisés à l'échelle mondiale a incité la

communauté scientifique à conduire des études recherchant une association entre l'infection par le virus et le développement de tumeurs chez l'Homme, association qui n'est pas à ce jour formellement démontrée (5).

L'étape qui restera marquante pour cette famille de virus et son implication en santé humaine fut la caractérisation en 1971 par Sylvia D. Gardner du premier polyomavirus humain, le BKPyV, dans les urines d'un patient greffé rénal (6). Cela fut suivi la même année par l'isolement post mortem du JC Virus (JCPyV) par Billie Padgett dans le tissu cérébral d'un patient qui présentait une Leuco-Encéphalopathie Multiple Progressive (LEMP) et traité pour un lymphome Hodgkinien (7).

Pendant plus de 30 ans le BKPyV et le JCPyV sont restés les seuls virus connus infectant l'Homme. Depuis peu, les avancées des techniques de détection telles que l'amplification des acides nucléiques et l'essor de techniques de séquençage haut débit ont permis l'identification de nombreux autres représentants de cette famille avec une accélération ces dernières années (8). On reconnaît à ce jour 13 polyomavirus humains (1). Seuls quatre d'entre ont une implication prouvée en pathologie, dont le BK virus (**Tableau 1.**) Un nouveau polyomavirus humain aurait été isolé en 2017 à partir de prélèvements de peau, gorge et cuir chevelu de patients mais d'autres études, notamment sérologiques, sont nécessaires pour confirmer ces observations (9).

2. Le BK Virus

a. [Découverte](#)

Le BKPyV a été mis en évidence en 1971 par Sylvia D. Gardner et ses collègues au cours d'un protocole de screening chez des patients après greffe rénale. L'objectif était de détecter les affections virales opportunistes survenant dans les suites du geste chirurgical. Il a été observé, par microscopie électronique, dans les urines d'un patient 3 mois après la greffe, un grand nombre de particules virales ressemblant morphologiquement aux polyomavirus. Ces virus furent également observés dans les cellules épithéliales du tissu urétéral et cultivés sur lignées cellulaires Vero et M.K à partir de ces deux prélèvements. L'apparition d'un effet cytopathique tardif, le caractère agglutinant des hématies et des données sérologiques ont permis de déterminer que ce virus était différent des autres polyomavirus connus, notamment le SV40 (6). Il a été nommé B.K virus, en hommage au patient soudanais aux initiales B.K chez qui le virus a été découvert.

Polyomavirus Humains	Détection du virus	Expression clinique	Année de découverte	Séro-prévalence estimée*
Polyomavirus BK	Urines	Néphropathie Cystite hémorragique	1971	80 – 90 %
Polyomavirus JC	Cerveau	Leucoencéphalopathie multifocale progressive	1971	50 -70 %
Polyomavirus KI	Respiratoire	?	2007	40 – 55 %
Polyomavirus WU	Respiratoire	?	2007	60 – 69 %
Polyomavirus de Merkel	Peau	Carcinome à cellules de Merkel	2008	60 – 70 %
Polyomavirus humain 6	Peau	?	2010	69 %
Polyomavirus humain 7	Peau	?	2010	35 %
Polyomavirus de la trichodysplasie spinulosique	Peau	Trichodysplasie spinulosique	2010	70 %
Polyomavirus humain 9	Peau, Urines Sang	?	2011	47 %
Polyomavirus MW	Selles	?	2012	42 – 75 % ^(10,11)
Polyomavirus STL	Selles	?	2012	68 – 93 % ^(12,13)
Polyomavirus humain 12	Tissu hépatique et digestif	?	2013	97 % ⁽¹³⁾
Polyomavirus New Jersey	Peau, Muscle Sang	?	2013	57 % ⁽¹³⁾
Polyomavirus Lyon (Putatif)	Peau ORL	?	2017	?

TABLEAU 1. Polyomavirus humains, découverte, sero-prévalence et implication en pathologie. (?) : inconnu à ce jour. (*) : Séro-prévalence maximale estimée en population générale. Adapté de (14).

b. Structure et organisation génomique

Le BKPyV appartient au genre Betapolyomavirus de la famille de Polyomaviridae. Il s'agit d'un virus non enveloppé d'une taille de 45 nm environ. Il possède une capsidie icosaédrique de symétrie T=7. Trois protéines constituent la capsidie. VP1 est majoritaire, organisée en 72 pentamères faisant protrusion à la surface. VP2 et VP3 sont situées à la partie interne de la capsidie et interviendraient dans la stabilisation des pentamères de VP1 (15).

La capsidie renferme le génome circulaire du virus qui se présente sous la forme d'ADN double brin enroulé autour d'histones d'origine cellulaire (H2A, H2B, H3 et H4) formant une vingtaine de nucléosomes (**Figure 1.**).

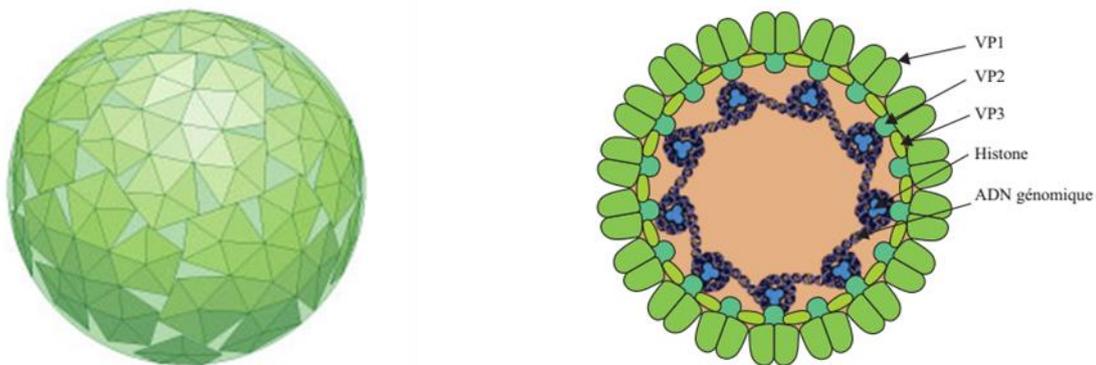


FIGURE 1. Représentation schématique du BKPyV.

A gauche : organisation en pentamères de la capsidie virale. A droite : coupe transversale du BKPyV. (VP1/VP2/VP3 – en vert) protéines de structure, VP1 fait protrusion, VP2 et VP3 sont situés à la partie interne de la capsidie. (ADN génomique – en gris et Histone – en bleu) : ADN du BKPyV enroulé autour d'histones cellulaires (H2A, H2B, H3 et H4) formant une vingtaine de nucléosomes.

Adapté de ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics.

Le génome du BKPyV possède un pourcentage d'homologie avec le JCPyV et le SV40 respectivement de 75% et 69% (16). D'une longueur d'environ 5kpb, il comprend trois régions distinctes. La région non codante (*Non-Coding Control Region* [NCCR]), la région précoce et la région tardive (**Figure 2.**).

La NCCR, d'une longueur d'environ 400pb, est une région non codante promotrice de l'expression des gènes viraux qui contient également l'origine de réplication. Elle sépare les deux autres régions codantes. La fixation de facteurs de transcription ou de réplication sur des sites spécifiques va ainsi moduler à distance l'expression des gènes précoces et tardifs. Cette région est organisée en blocs O, P, Q, R, S et peut se présenter sous deux formes : « archétype » (i.e. sauvage) de répartition ubiquitaire ou « réarrangée ». Elle fera l'objet d'un chapitre dédié.

La région précoce code pour 3 protéines régulatrices et multifonctionnelles nommées : antigène T (*large T antigen* [LTAg]), antigène t (*small t antigen* [STAg]) et

antigène T tronqué (*truncated T antigen* [truncTAg]) découvert plus récemment (17). Ces protéines sont traduites à partir d'ARNm obtenus par épissage alternatif d'un même transcrit primaire.

La région tardive code pour les protéines structurales de la capsid VP1, VP2, VP3 ainsi que pour une protéine régulatrice l'Agnoprotéine (18,19). Cette petite protéine basique multifonctionnelle interviendrait dans plusieurs étapes du cycle biologique du virus telles que la régulation de l'expression des gènes, la réplication du génome viral (20), l'assemblage et la libération des virions néoformés (18) ou encore la progression du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (21). Également codés par la région tardive, deux micro-ARN possédant une structure complémentaire des ARNm de la région précoce, possèderaient une fonction régulatrice en se liant à ces ARNm et en inhibant la traduction des protéines précoces (22).

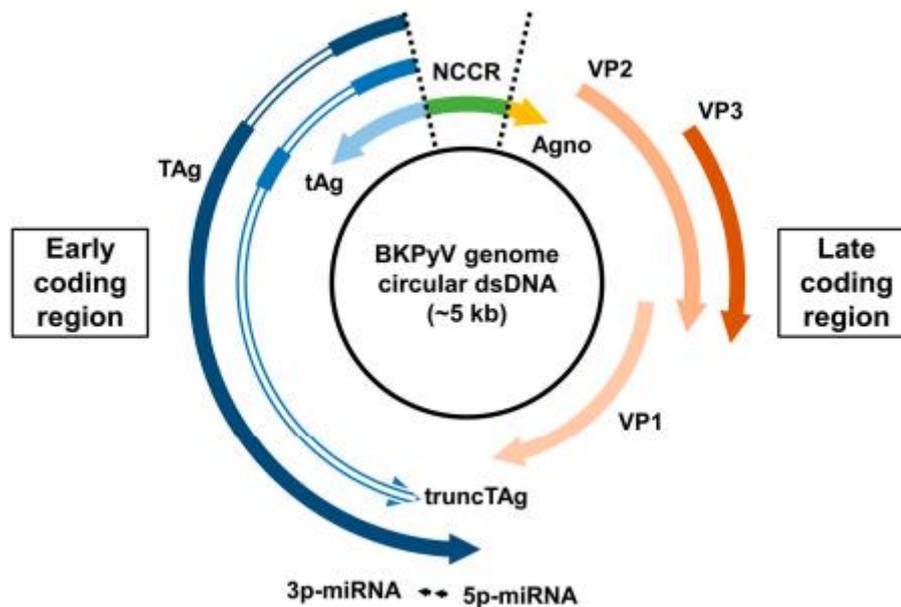


FIGURE 2. Génome du BKPyV.

NCCR : région non codante du BKPyV. **(Early coding region)** : région précoce du BKPyV codant pour tAg : antigène t (STAg). Tag : antigène T (LTag). TruncTAg : antigène T tronqué. Transcrits primaires obtenus par épissage alternatif. (//) introns. (■) : exons. **(Late coding region)** : région tardive du BKPyV codant pour (Agno) : Agnoprotéine. (VP1/VP2/VP3) : protéines virales 1,2 et 3. (3p-miRNA et 5p-miRNA) : micro ARNs 3' et 5' complémentaires de l'ARN du LTag. Adapté de (23)

c. Epidémiologie – Histoire naturelle de l'infection

Le BKPyV est exclusivement humain. Les études épidémiologiques montrent que le virus est ubiquitaire avec une apparition précoce d'anticorps spécifiques neutralisant dirigés contre VP1. La séroprévalence se situe autour de 40 - 60% entre 1 et 5 ans de vie et entre 80 - 90 % au-delà. Le taux d'anticorps anti-BKPyV diminue ensuite au-delà de 60 ans (24–26).

Après la primo-infection surviendrait une phase de virémie primaire (27). Le virus persiste ensuite indéfiniment dans les cellules épithéliales de l'appareil urinaire et cellules tubulaires rénales avec une excrétion intermittente dans les urines des individus infectés (28,29). Les mécanismes de persistance du virus dans l'organisme demeurent à ce jour incompris et semblent différer du modèle de latence connu pour les *Herpesviridae*. Il n'a notamment pas été mis en évidence d'ARN ou de protéines spécifiques régulant l'expression des autres gènes et permettant au virus d'échapper aux réponses anti-virales.

Le mode de transmission n'est à ce jour pas clairement identifié et pourrait être multiple, plus probablement respiratoire et oral. Certaines études suggèrent en effet une transmission par aérosols en montrant la survenue séquentielle d'une infection des voies aériennes supérieures et une séroconversion BKPyV dans l'enfance (30,31). D'autres études évoquent une contamination orale ou fécale-orale via l'eau ou les aliments souillés en se basant d'une part sur l'isolement du virus dans les eaux usées, sa stabilité dans ces échantillons estimée à plus de 53 jours, sa résistance à un pH acide (32,33) et d'autre part sur la mise en évidence de l'ADN du virus dans les selles de populations pédiatrique et adulte (34–38). D'autres voies de transmission sont également évoquées telles que la voie transplacentaire (39) mais aussi la transfusion de produits sanguins ou la transplantation d'organes avec en particulier la transplantation rénale (40,41). Enfin, on peut noter la mise en évidence du BKPyV dans d'autres tissus biologiques tels que la prostate (42), les amygdales (30), le tissu cérébral (43) ou encore les lymphocytes (40).

Le BKPyV est le seul polyomavirus pour lequel on distingue plusieurs génotypes (I, II, III et IV) qui induisent une réponse humorale spécifique chez son hôte (44). Ces génotypes comprennent au total 10 sous types viraux. Le génotype I est majoritaire dans la plupart des régions du globe suivi du génotype IV (**Tableau 2.**). Historiquement, ces génotypes et sous types ont été définis par l'étude de la variation de séquence de la boucle BC (nucléotides 1630 à 1956) de VP1 (45). D'autres analyses simplifiées du polymorphisme de VP1 ont été proposées pour catégoriser le BKPyV (46). Enfin une analyse génome entier du BKPyV comprenant notamment l'étude de la séquence du LTag permettrait une meilleure discrimination entre génotypes et sous types viraux (47).

Il a été montré qu'un individu sain ou malade pouvait héberger plusieurs génotypes ou sous-types différents (48,49). Toutefois la corrélation entre certains génotypes viraux qui répliqueraient mieux en culture (50) et le développement de pathologies liées au BKV ne semble pas établie (51,52). Enfin, le génotypage du BKPyV constitue, de manière similaire au JCPyV, un marqueur épidémiologique permettant d'étudier la coévolution du virus avec les populations humaines et d'expliquer les clusters géographiques observés (53).

Génotype viral	Sous-type viral	Prévalence*
I	Ia	46 – 82 %
	Ib1	
	Ib2	
	Ic	
II	-	0 – 6 %
III	-	0 – 9 %
IV	IVa1	5 – 54 %
	IVa2	
	IVb1	
	IVb2	
	IVc1	
	IVc2	

TABLEAU 2. Différents génotypes et sous types de BKPyV.

*Prévalence de chaque génotype, observée dans différentes régions du monde, d'après (52).

d. [Cycle biologique du BKPyV](#)

La connaissance des différentes étapes du cycle biologique des virus est cruciale car elle permet de comprendre les mécanismes par lesquels les virus peuvent être pathogènes pour un hôte et de concevoir des stratégies originales pour les en empêcher. Cela nécessite au préalable la mise au point d'un modèle d'étude cellulaire ou animal qui reproduira le plus fidèlement possible l'histoire naturelle de l'infection.

Le BKPyV a pour la première fois été isolé sur cellules Vero, il y a près de 50 ans (6). Par la suite d'autres lignées d'origine rénale ont été utilisées pour sa propagation en culture (HEK293, CV-1...) (54,55). Ce virus peut aussi être cultivé sur des cellules d'origine fibroblastique (MRC-5, WI-38...) mais qui ne sont pas les cibles naturelles du virus in vivo (54,56). Les cellules épithéliales tubulaires proximales rénales (RPTEC), semblent être les plus proches de la cible naturelle du virus. Ces cellules primaires humaines sont en revanche de manipulation difficile (57). Enfin, l'absence de modèle animal permissif à la réplication du BKPyV constitue un frein dans l'étude de la réponse immunitaire et de la relation hôte/pathogène.

L'infection par le BKPyV est un processus dynamique dont certaines étapes clés demeurent actuellement mal comprises. Les travaux qui ont été menés jusqu'à présents ainsi que les connaissances acquises avec des virus proches tels que le JCPyV et SV40 permettent néanmoins d'en connaître les contours (**Figure 3.**).

L'entrée du BKPyV s'initie par un contact de VP1 avec des gangliosides de série b (GD3, GD2, GD1b, GT1b) (58,59) contenant un acide sialique ramifié en $\alpha(2,3)$ ou $\alpha(2,8)$ (60). Cette spécificité de récepteur détermine le tropisme du virus. S'ensuit un processus d'internalisation qui serait indépendant de la clathrine et en partie dépendant de la cavéoline (Cav-1) (61,62). Cependant en bloquant spécifiquement ces mécanismes d'endocytose avec des siRNAs, une autre étude a montré que le virus pouvait tout de même pénétrer dans des cellules RPTec suggérant une voie alternative (63).

Après endocytose le BKPyV est libéré dans le cytoplasme après acidification de l'endosome (64) pour ensuite transiter via les microtubules jusqu'au réticulum endoplasmique (RE), qu'il atteindrait environ 10h après l'entrée (65).

Le passage du BKPyV dans le RE est une étape importante permettant au virus d'accéder secondairement au noyau pour se répliquer. Le BKPyV y utilise en effet des isomérases et réductases pour modifier la conformation de sa capsid. La réduction des ponts disulfures de VP1 permettrait notamment la dénudation partielle de la capsid et l'exposition de signaux de localisation nucléaire (NLS) (64,66). Le virus détourne ensuite des effecteurs de la voie de dégradation des protéines associée au RE et du protéasome afin de rejoindre à nouveau le cytosol (55). Les NLS portés par VP2 et VP3 permettent l'entrée dans le noyau en utilisant, entre autres, la voie de l'importine $\alpha/\beta 1$ (66).

Les étapes de réplication du BKPyV sont principalement extrapolées de ce qui est déjà connu pour le virus SV40. Elles comportent une phase précoce et une phase tardive. La transcription des gènes de la région précoce surviendrait dès l'entrée du virus dans le noyau grâce à l'ARN polymérase II. Les transcrits seraient exportés dans le cytosol pour être traduits en LTag, STAg et TruncTag. Un NLS porté par LTag et le TruncTag permettrait leur translocation dans le noyau. Le LTag (et le truncTag) y assurerait deux fonctions capitales : la promotion du cycle cellulaire en séquestrant pRb et p53 ainsi qu'une fonction de réplication par son activité hélicase après polymérisation. Le STAg, localisé à la fois dans le cytosol et le noyau, aurait un rôle complémentaire à celui du LTag sur le cycle cellulaire en complexant la phosphatase alcaline 2A (23). Les facteurs et protéines nécessaires à la réplication du virus sont apportés par la cellule hôte. Le complexe de réplication est en effet constitué de protéines cellulaires, l'ADN polymérase δ et la Pol α -primase assistées par la protéine de réplication A ou le facteur de réplication C (67,68). La réplication de l'ADN du BKPyV induit un dérèglement de l'expression de nombreux gènes cellulaires (69). Notamment, les dommages cellulaires irréversibles sont prévenus par l'activation des voies de réparation de l'ADN, médiées par

ATM et ATR (70). Une importante réorganisation des « Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies » (PML-NBs) a également été observée au sein du noyau, suggérant un contournement par le virus de leurs propriétés antivirales intrinsèques (71).

La phase tardive de la réplication du BKPyV correspond à la transcription des gènes codant pour les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3 ainsi que l'Agnoprotéine. Elle surviendrait avec l'augmentation du nombre de copies d'ADN donc du nombre de LTA_g dans le noyau qui modifierait l'équilibre entre transcription de gènes précoces et tardifs en faveur de ces derniers (23).

Après leur synthèse dans le cytosol, les protéines de capsides forment des dimères (VP1-VP2 et VP1-VP3) et sont importées dans le noyau grâce à un NLS porté par VP1 (66). L'assemblage de VP1, VP2 et VP3 autour de génomes néosynthétisés de BKPyV serait initié d'une part en raison de la concentration plus élevée en calcium dans le noyau, et d'autre part grâce à des protéines chaperonnes qui empêcheraient leur association prématurée dans le cytoplasme (72). Les premiers virions ont ainsi pu être détectés dans le noyau de cellules RPTec environ deux jours après leur infection par le BKPyV (57). Une étude réalisée à partir de biopsies rénales de patients atteints de BKVN retrouve une moyenne de 6000 virions de BKPyV par cellule infectée (27). L'accumulation de virions entraîne la formation d'inclusions nucléaires observables en microscopie électronique (73). Ces inclusions nucléaires caractérisent notamment les « decoy cells » qui sont des cellules urothéliales retrouvées dans le culot urinaire de patients infectés par le BKPyV.

Les étapes finales du cycle biologique du BKPyV qui succèdent à la formation de nouveaux virions ont été peu étudiées jusqu'à présent. C'est notamment le cas du mode de sortie des virions néoformés. Une étude a montré que le BKPyV, à l'instar de nombreux virus non enveloppés, possédait un cycle lytique (57). Cependant, l'histoire naturelle de l'infection, asymptomatique, avec persistance du BKPyV dans l'organisme, la pression immunitaire qui s'y exerce ainsi que l'effet cytopathique de BKPyV souvent discret (74) questionnent sur la coexistence, *in vivo*, de mécanismes qui permettraient au virus de se maintenir à long terme. Une étude a notamment rapporté qu'environ 1% des virions rejoindrait le compartiment extracellulaire en étant sécrété (75), avec un rôle potentiel de l'Agnoprotéine restant à élucider (18). Il semblerait également que les miRNA encodés par la région tardive jouent un rôle dans la persistance virale. Ils réguleraient la quantité de LTA_g dans les cellules infectées participant ainsi à l'échappement des polyomavirus à la réponse cellulaire T cytotoxique (76). De plus, le miRNA 3' inhiberait l'action de la protéine ULBP3, impliquée dans l'élimination par les lymphocytes NK des cellules infectées (77).

Enfin, comme mentionné précédemment, aucun mécanisme de latence comparable à celui des Herpesviridae n'a à ce jour été mis en évidence chez le BKPyV.

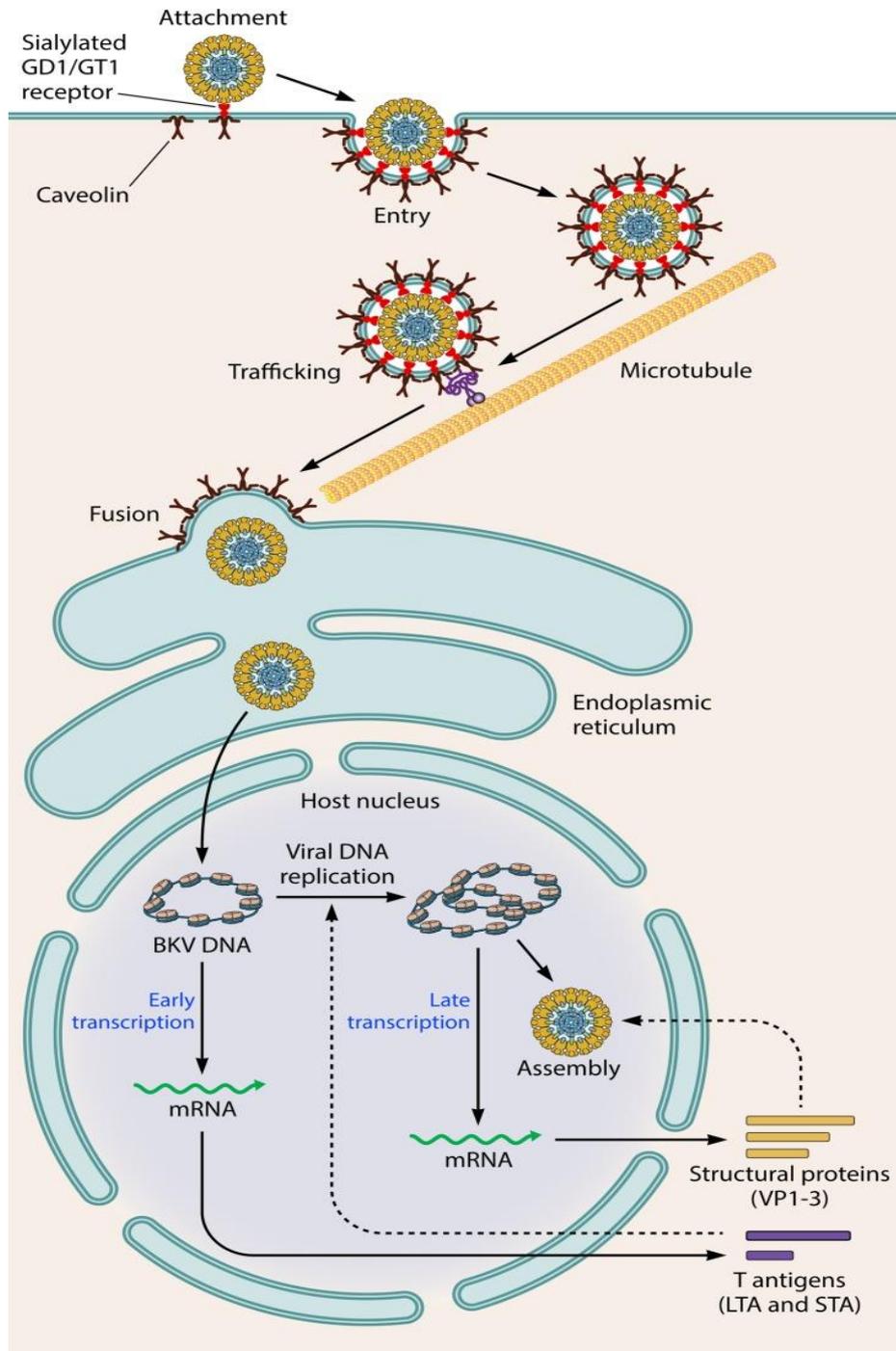


FIGURE 3. Représentation schématique du cycle biologique du BKPyV.

Description des étapes clés, de haut en bas : Attachement du BKPyV aux gangliosides sialylés cellulaires (GD1 et GT1). Endocytose en partie dépendante de la cavéoline. Transit vers le Réticulum Endoplasmique (RE) en utilisant le réseau de microtubules (mécanisme inconnu). Fusion des vésicules avec la membrane du RE. Dénudation de la capsidie dans le RE grâce à des isomérases et réductases. Sortie du RE et import dans le noyau grâce à l'exposition de signaux de localisation nucléaire. Transcription des gènes précoces. Traduction des gènes précoces dans le cytosol puis réplication du génome viral. Transcription puis traduction des gènes tardifs dans le cytosol. Import des protéines tardives dans le noyau et assemblage de nouveaux virions. Adapté de (78).

e. Maladies associées

Le BKPyV occupe une place croissante en pathologie humaine en raison de l'augmentation du nombre d'individus en situation d'immunodépression. En dehors de ce contexte spécifique, le virus n'est pas reconnu comme associé à la survenue de pathologies. Il a cependant été évoqué que le BKPyV pourrait jouer un rôle dans survenue de cancers notamment prostatiques ou des voies urinaires en raison de la détection du LTag séquestrant une protéine suppresseur de tumeur dans les cellules tumorales (79,80).

Les deux pathologies majeures causées par le virus sont la néphropathie associée au BKV (BKVN) chez les patients transplantés rénaux et la cystite hémorragique (CH) chez les patients après greffe de cellules souches hématopoïétiques. Il s'agit d'infections virales opportunistes potentiellement sévères et sources de morbidité importante pour les patients. D'autres atteintes ont été décrites dans la littérature mais ces observations demeurent marginales. Il s'agit de pneumopathies, rétinites, vascularites, hépatites ou encore méningo-encéphalites liées au BKPyV survenues chez des patients immunodéprimés et ayant fait l'objet de « case-reports » (81–84).

La néphropathie à BKPyV

A partir de 1995 la BKVN a émergé en parallèle de l'amélioration des protocoles d'immunosuppression comme complication redoutée de la greffe rénale (85,86). L'introduction du tacrolimus à hautes doses dans les régimes immunosuppresseurs semble avoir joué un rôle important puisque les cas de BKVN observés dans les années qui ont suivies ont tous été exposés à cette molécule (86). Le tacrolimus est actuellement reconnu comme facteur de risque de BKVN par rapport à d'autres immunosuppresseurs en situation de greffe rénale (87). Il faut néanmoins reconnaître l'apport non négligeable de ce médicament sur la diminution d'incidence du rejet de greffons.

La BKVN constitue le stade avancé et la conséquence d'une infection à BKPyV non contrôlée. L'incidence de cette affection après greffe rénale est comprise entre 1 et 10% en fonction des séries (88–90). Elle se caractérise par une réplication intense du BKPyV dans les cellules épithéliales tubulaires rénales du transplant entraînant une lyse cellulaire et une altération de la monocouche épithéliale. La production de médiateurs et l'afflux de cellules inflammatoires vers le site de réplication actif vont entraîner une atrophie tubulaire, une fibrose interstitielle et conduire à terme à une dysfonction voire une perte du greffon (91).

La BKVN n'est en revanche que rarement décrite dans le cadre de transplantation d'autres organes solides et a fait l'objet d'une revue de la littérature en 2018 (92). Au total, 21 cas ont été rapportés dont 19 survenus après transplantation cardiaque ou pulmonaire (92). Ces situations requièrent pourtant une immunosuppression plus intense et prolongée qu'en greffe rénale. Le degré d'immunosuppression et le type de protocole instauré ne semblent donc pas être les seuls facteurs associés à la survenue de la BKVN en transplantation d'organe solide. D'autres éléments ont été avancés pour expliquer le caractère particulier à la transplantation rénale :

En premier lieu, des **facteurs liés au geste chirurgical** interviendraient dans l'initiation de l'infection. La BKVN serait favorisée par les microtraumatismes tissulaires induits lors de l'implantation des reins ainsi que le maintien prolongé d'un stent urétéral (93–95). Ces lésions associées à des facteurs inflammatoires permettraient une réplification locale du BKV puis sa dissémination dans l'appareil urinaire.

En second lieu, des **facteurs immunologiques** seraient impliqués dans l'évolution vers la BKVN. Plusieurs études montrent en effet que la BKVN survient à partir du réservoir viral issu du greffon et non à partir de la souche initialement présente chez le patient (51,96–99). Ainsi, les anticorps neutralisants du patient pourraient être moins efficaces pour prévenir la réplification si la souche est de génotype différent (99).

Enfin, des **facteurs propres à la souche virale infectante** favoriseraient la survenue de la BKVN. Cela a été évoqué sur la base d'études épidémiologiques qui retrouvent une association entre génotype I et survenue de BKVN (100,101). Cette association n'a cependant pas été confirmée lors d'une étude rétrospective publiée en 2019 comparant les caractéristiques virologiques de 386 couples de donneurs/receveurs en greffe rénale (51). Les auteurs concluent que les observations réalisées jusque-là témoigneraient davantage de la répartition géographique des souches, avec une surreprésentation du génotype I, que d'une association spécifique d'un génotype avec le développement de BKVN. D'autre part, la NCCR du BKPyV a fait l'objet d'études pour tenter de trouver un lien entre les réarrangements qui peuvent apparaître dans cette région génomique et la survenue de BKVN. Plusieurs types de réarrangements ont été décrits *in vitro* et moins fréquemment *in vivo*. Certains types de réarrangements seraient associés, selon plusieurs auteurs, à une capacité répllicative accrue du BKPyV. Cet aspect sera développé dans une partie dédiée.

Par ailleurs une description plus systématique des **facteurs de risques de virémie à BKPyV** en transplantation rénale a été entreprise au travers de nombreux articles ces vingt dernières années. Les études menées sont pour la plupart rétrospectives, monocentriques, méthodologiquement hétérogènes et parfois discordantes. Une récente méta-analyse souligne la variabilité méthodologique de ces travaux et tente néanmoins

d'en faire la synthèse. Parmi les 144 facteurs de risques potentiels analysés, 33 ont été décrits comme significatifs dans la littérature. Au final, 8 facteurs de risques de virémie à BKPyV ont été retenus et discutés par *Demey et al.* car ayant fait l'objet d'au moins deux analyses multivariées (**Tableau 3.**) (102).

Facteurs de risques de virémie à BKPyV		
Caractéristiques Donneur/receveur	Paramètres post-transplantation	Traitement
Donneur décédé	Utilisation d'un stent urétéral	Tacrolimus
Receveur âgé	Retard à la reprise de fonction du greffon	
Receveur de sexe masculin	Episodes de rejet aigu du greffon	
Antécédents de transplantation		

TABLEAU 3. Facteurs de risque de virémie à BKPyV.
D'après (76).

Concernant les **facteurs** associés à une **BKVN prouvée histologiquement**, seulement six études ayant effectué une analyse multivariée ont été menées. Elles retrouvent plusieurs facteurs de risques présentés ci-dessous (**Tableau 4.**). En commun avec les facteurs de risque de virémie à BKPyV on retrouve : le traitement par tacrolimus, l'âge du receveur, les épisodes de rejet aigus du greffon.

La faible incidence de la BKVN n'a néanmoins pas permis aux différentes études d'analyser des effectifs importants et diminue *de facto* leur puissance statistique. Ces différents facteurs de risques nécessiteraient donc d'être investigués et confirmés à l'occasion d'études de plus grande ampleur.

Summary of predictive factors for biopsy-proven BKPyVN identified in multivariate analyses. OR: odds ratio; HR: hazard ratio.

Category	Risk factor identified	BKPyVN cases / Total population	Relative effect (95%CI)	p value
Immunosuppressive regimens	Mofetil mycophenolate	39/880	HR 3.5 (1.6-7.5)	0.0013
	Tacrolimus (TAC)	39/880	HR 3.3 (1.5-7.6)	0.0038
		9/227	HR 1.64 (0.44-6.11)	NR
	TAC level one month before the biopsy	33/99	OR 1.28 (1.01-1.62)	0.04
	TAC level three months before the biopsy	33/99	OR 1.4 (1.1-1.8)	0.009
	Mean TAC level over the 3 months before biopsy	33/99	OR 1.3 (1.02-1.7)	0.03
	Prednisone dose three months before the biopsy	33/99	OR 1.2 (1.04-1.36)	0.009
	Mean prednisone dose over the 3 months before biopsy	33/99	OR 1.22 (1.04-1.4)	0.02
	Intravenous methylprednisolone 1000 mg once daily for 3 days	12/407	HR 23.52 (4.57-120.99)	< 0.001
	Polyclonal antibody induction	25/542	OR 11.04 (2.94-41.52)	0.0004
Donor/recipient characteristics		39/880	HR 6.6 (2.3-18.9)	0.0005
	ABO incompatibility	11/62	OR 2.32 (NR)	0.04
	African-American recipient	31/666	HR 2.89 (1.36-6.14)	0.006
	Recipient age	31/666	HR 1.04 (1-1.07)	0.048
Surgery		12/407	HR 0.98 (0.92-1.03)	0.424
	Cold ischemia time	9/227	HR 1.18 (1.04-1.35)	0.009
Viral serology	Donor BKPyV seroactivity	12/407	HR 2.89 (1.33-6.29)	0.007
Post-transplantation outcomes	Acute rejection (≥ 1 episode)	31/666	HR 3.18 (1.42-7.12)	0.005
		9/227	HR 4.05 (0.99-16.53)	0.051
	Acute rejection (rejection score)	39/880	HR 5.1 (1.8-14.6)	0.0021
	CMV infection	31/666	HR 2.72 (1.19-6.24)	0.018
Time course of BKPyV viremia	First positive BKPyV viremia > 185,000 copies/mL	8/163	OR 113.25 (17.22-744.6)	< 0.001
	BKPyV peak viral load of 223,000 copies/mL at any time	8/163	OR 70.5 (8.08-615)	0.0001

TABLEAU 4. Facteurs de risques associés à la survenue de BKVN.
Adapté de (76).

La survenue de BKVN et les options thérapeutiques limitées en font une situation délicate que le clinicien doit anticiper. L'enjeu est d'intervenir avant que des lésions irréversibles ne compromettent la fonction du greffon (démarche préemptive).

Pour cela, au décours de la greffe, les récentes recommandations de l'*American society of Transplantation* préconisent un screening mensuel pendant 9 mois puis trimestriel jusqu'à 2 ans post-transplantation pour détecter précocement une réplication virale dans le compartiment urinaire et sanguin des patients (87). Les données biologiques ci-dessous (**Tableau 5.**) sont reconnues comme facteurs prédictifs de développer une BKVN et permettent de stratifier le risque en BKVN « possible », « probable » ou « très probable ». Il a notamment été montré que la détection et la persistance sur 3 semaines d'une virémie au-delà de 10 000 copies/ml était associée à un taux accru de BKVN prouvées histologiquement (89,103–106)

Le diagnostic de certitude de BKVN nécessite quant à lui une preuve histopathologique que l'atteinte rénale est liée au BKPyV. Deux techniques peuvent être utilisées à partir de biopsies du greffon : la détection du LTA_g en immunohistochimie ou la détection de séquences spécifiques par hybridation *in-situ* (91). L'atteinte tissulaire par Le BKPyV souvent focale rend cependant la procédure diagnostique peu sensible, avec un taux de faux négatifs pouvant atteindre 30% (73,100).

En pratique, 3 situations vont constituer une indication de prise en charge thérapeutique :

- Une virémie soutenue supérieure à 10^3 copies/ml sur au moins 2 prélèvements
- Une charge virale sanguine $> 10^4$ copies/ml
- Une BKVN prouvée sur biopsies rénales

Echantillon	Marqueurs biologiques / commentaires	Diagnostic de BKVN			
		Possible	Probable	Très probable	Prouvé
Urine	Signes de virurie à BKPyV : - Charge virale $> 10^6$ copies/ml - Particules virales en ME (« Haufen ») - Decoy cells	+	+	+	+
	Virémie à BKPyV : - Charge virale soutenue $> 10^3$ copies/ml sur 2 prélèvements consécutifs (< 3 semaines) - Charge virale $> 10^4$ copies/ml et augmentation sur 2 prélèvements consécutifs (< 3 semaines)	-	+	+	+
Sang	Signes de BKVN* : - Effet cytopathogène spécifique - Inflammation tubulaire rénale - Fibrose/ atrophie tubulaire sévère	-	-	-	+
	<i>Selon balance bénéfice/risque individuelle</i>	-	+/-	+	+

TABLEAU 5. Néphropathie à BKPyV. Marqueurs diagnostiques et recommandation de traitement. ME : Microscopie Electronique. *selon critères 2017 du groupe de travail Banff. Adapté de (61).

La cystite hémorragique liée au BKPyV (BKPyV-CH)

La CH est une pathologie survenant au décours d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Elle n'est pas spécifique du BKPyV. D'autres pathologies peuvent être associées à des saignements vésicaux. On retrouve notamment le cytomégalovirus (CMV), l'adénovirus, mais aussi des infections bactériennes, parasitaires ou encore des troubles de l'hémostase avec ou sans thrombopénie. La CH peut être d'intensité variable, évaluée cliniquement par l'hématurie. Plusieurs grades sont décrits, de sévérité croissante (107) (**Tableau 6.**).

Grades	Diagnostic
I	Hématurie microscopique
II	Hématurie macroscopique
III	Hématurie macroscopique + caillots
IV	Hématurie macroscopique + caillots et insuffisance rénale obstructive

TABLEAU 6. Evaluation et grades de l'hématurie.

Le BKPyV est reconnu comme agent étiologique de CH depuis 1986 où Arthur R. Ray et ses collègues observent une excrétion urinaire de BKPyV selon une séquence compatible, chez plusieurs patients atteints de CH après greffe de CSH (108). Ces observations seront confirmées une année plus tard par une seconde équipe (109).

La pathogénèse de cette affection est mal comprise. Une séquence d'évènements spécifiques semble en être à l'origine puisque la CH n'est pas une complication couramment décrite chez les patients transplantés rénaux. La chimiothérapie de conditionnement plus ou moins associée à l'irradiation corporelle totale entraineraient des lésions subcliniques de l'urothélium, aggravées ensuite par la réplication *in situ* à haut niveau de la souche de BKPyV issue du receveur (110). L'altération de l'épithélium vésical entrainerait un contact des urines avec la sous-muqueuse ainsi que le recrutement de cellules pro-inflammatoires. La dénudation de l'épithélium et l'inflammation intense d'une part plus ou moins associés à des troubles de la coagulation ou une thrombopénie d'autre part, seraient responsables des saignements intra-vésicaux (111,112).

La BKPyV-CH survient principalement en situation **d'allogreffe de CSH**. Elle est de survenue dite « tardive » car elle débute en général en 2 à 8 semaines mais peut survenir jusqu'à 6 mois après la greffe de CSH (113–115). Cela la distingue de la CH liée au conditionnement qui survient dans les 48h par toxicité vésicale directe des métabolites du cyclophosphamide, du busulfan et/ou de l'irradiation. Une revue de la littérature de l'European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) retrouve une incidence de la BKPyV-HC de 7 à 25% et jusqu'à 54 % en cas de greffe haplo-identique (**Tableau 7.**) (107).

Type de greffe / contexte	Incidence moyenne (%) (range)	Nombre de patients	Nombre d'études analysées
Allogénique	13 (7 – 25)	2096	> 10
Haplo-identique	24,5 (19 -54)	179	4
Autologue	0	118	1
Adultes	16 (7 – 54)	1413	8
Enfants	18 (8 -25)	724	6

TABLEAU 7. Incidence de la BKPyV-CH en fonction du type de greffe et de l'âge des patients. Adapté de (82).

Le diagnostic de BKPyV-CH repose sur une **triade** qui comprend des **signes cliniques de cystite** (dysurie ou douleurs hypogastriques), **une hématurie de grade II ou supérieur** ainsi qu'une **virurie à BKPyV supérieure ou égale à 10^7 copies/ml**.

La BKPyV-CH implique à *minima* prolongement de la durée d'hospitalisation pour surveillance simple mais peut être source de comorbidités et conduire, dans les atteintes sévères, à une intervention urologique notamment en cas saignements abondants ou d'insuffisance rénale liée aux caillots. Son impact médico-économique est important, évalué en France dans un seul centre à plus de 475 000 euros par an selon Gilis *et al.* (116). En revanche son implication dans la mortalité observée chez les patients après allogreffe de CSH reste à ce jour débattue (116–119).

Plusieurs auteurs ont effectué des analyses multivariées sur leurs données recueillies à partir de populations pédiatriques ou adultes présentant des pathologies onco-hématologiques diverses. Ils ont mis en évidence des **facteurs de risque de BKPyV-CH** en contexte de greffe de CSH (**Tableau 8.**). De manière analogue aux facteurs associés à la BKVN, ces études restent peu nombreuses, s'appuient parfois sur des échantillons restreints et leurs résultats nécessiteraient d'être confirmés par d'autres travaux.

En accord avec de nombreuses études sur le sujet et de manière assez intuitive, il semble en outre établi qu'une répllication active du BKPyV dans le compartiment urinaire ou sanguin du patient après la greffe de CSH est fortement associée à la survenue de BKPyV-HC (107).

Facteurs de risques de BKPyV-HC			
Caractéristiques du donneur/receveur	Type d'allogreffe	Type de conditionnement	Paramètres post-transplantation
Donneur non apparenté	Sang de cordon	Sérum anti-lymphocytaire	Virémie à CMV
Age du receveur > 7 ans	CSH recueillies par aphérèse	Cyclophosphamide	Virémie à HHV6
		Busulfan à hautes doses (16mg/kg)	GVH aigüe
		De type « myéloablatif »	GVH sévère (II, III, IV)

TABLEAU 8. Facteurs de risques de BKPyV-HC. Adapté de (82).

Enfin, quelques auteurs se sont intéressés aux facteurs virologiques pouvant influencer la survenue, la gravité ou l'évolution de la BKPyV-CH. Tout comme pour la BKVN, le génotype de la souche infectante et la structure de la NCCR ont été étudiés chez des patients présentant une BKPyV-CH. Quelques modifications spécifiques de la NCCR du BKPyV ont notamment été retrouvées chez les patients présentant une BKPyV-CH sans qu'elles ne soient pour autant nécessaires ou suffisantes pour expliquer l'apparition de la pathologie (120,121).

Contrairement à la greffe rénale où une attitude préemptive permet de détecter précocement une réplication du BKPyV et entraîne la mise en place de mesures pour prévenir la BKVN, il n'est pas établi qu'une démarche similaire après greffe de CSH réduise l'incidence et la sévérité de la BKPyV-CH (107). Cela s'explique par le manque de preuve sur le bénéfice apporté à la modification du régime immunosuppresseur en cas de BKPyV-CH, qui exposerait davantage le patient à une réaction du greffon contre l'hôte (GVH).

Ainsi seuls les patients symptomatiques seront testés pour le BKPyV. Une prise en charge sera indiquée au cas par cas en fonction de l'expérience des cliniciens qui s'appuieront sur plusieurs données comprenant l'intensité des symptômes et des saignements, les paramètres d'hémostase, la fonction rénale et les autres complications présentées par le patient (co-infections, GVH...).

f. [Ressources thérapeutiques](#)

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires et ne disposent que d'un équipement enzymatique partiel pour permettre leur réplication. De fait, une partie du

génomique virale est consacrée à la production de protéines multifonctionnelles ou spécifiques destinées d'une part à contourner les défenses anti-virales et d'autre part à réorienter la machinerie de réplication et de transcription cellulaire vers la production de nouveaux virions. D'une manière générale, le développement d'un traitement anti-viral ciblé représente un véritable challenge, car ce dernier devra inhiber une ou plusieurs étapes du cycle biologique du virus, souvent intriquées avec le cycle de la cellule qu'il infecte. Les antiviraux actuellement disponibles présentent ainsi, à des degrés divers, des effets secondaires liés à leur action indésirable sur le cycle des cellules. Une exception remarquable est celle de l'aciclovir, qui est un analogue nucléosidique, possédant une action antivirale optimale sur les virus HSV-1 et 2 associée à une très faible toxicité cellulaire. Pour être actif, cet analogue de la guanosine doit au préalable être phosphorylé par une enzyme virale, la thymidine kinase, lui conférant ainsi un haut degré de sélectivité. Seules les cellules infectées hébergeant une réplication active du virus seront ciblées. Cela a permis une utilisation large et sans danger de l'aciclovir en traitement probabiliste notamment de l'encéphalite herpétique améliorant grandement le pronostic de cette affection.

En ce qui concerne le BKPyV, nous ne disposons pas, à ce jour, de traitement spécifique inhibant de manière efficace sa réplication.

La principale stratégie en cas de BKVN suspectée ou avérée après greffe rénale consiste à adapter le traitement immunosuppresseur pour permettre un contrôle de l'infection par le système immunitaire du patient. Une méta-analyse (122) et de nombreuses études observationnelles légitiment cette stratégie en montrant une clairance virale dans 80 à 100% des cas sans sur-risque de rejet aigu du greffon (87). Une décroissance séquentielle des posologies des inhibiteurs de la calcineurine (tacrolimus ou cyclosporine A) et/ou de l'antimétabolite (mycophénolate mofetil), allant jusqu'à 50%, est ainsi opérée jusqu'à obtention de la clairance virale. La posologie des corticoïdes est également réduite (87). Enfin, dans les cas sévères ou récidivants, quelques études évoquent l'intérêt des inhibiteurs de mTOR (sirolimus) et de la cyclosporine A en relais du mycophénolate mofetil et du tacrolimus respectivement car ils possèderaient également une action inhibitrice sur la réplication du BKPyV (123–125).

Le BKPyV-CH fait quant à elle l'objet de mesures prophylactiques reposant essentiellement sur l'hyperhydratation du patient pendant et au décours du conditionnement visant à réduire sa toxicité urothéliale (107). Lorsque le diagnostic de BKPyV-CH est établi, seuls les soins de support tels que l'hyperhydratation, l'irrigation vésicale, la supplémentation en plaquettes et des anti-douleurs sont recommandés dans la prise en charge jusqu'à résolution de l'infection. Au cas par cas, en se basant sur les

résultats d'études non contrôlées (cf. infra), l'administration intraveineuse du cidofovir peut être envisagée (107).

Des essais thérapeutiques ont par ailleurs été conduits pour mesurer l'efficacité de molécules déjà disponibles sur le marché pour la prophylaxie et le traitement des infections à BKPyV.

C'est le cas des fluoroquinolones, antibiotiques qui ciblent les topoisomérases II et IV (hélicase) des bactéries, inhibant ainsi la synthèse protéique et la réplication de l'ADN. Ces antibiotiques possèderaient également une activité anti-hélicase *in vitro*, bien que peu spécifique, à l'encontre du BKPyV, en interagissant avec les polymères de LTag (126–128). Malheureusement une étude prospective randomisée en double aveugle comparant l'administration prophylactique de levofloxacin 500mg/j pendant 3 mois contre placebo ne retrouve pas de différence d'incidence de la virurie et de la virémie à BKPyV entre les deux groupes après greffe rénale (129). Ceci étant, il est donc probable que les fluoroquinolones ne soient pas efficaces pour le traitement de la BKVN constituée (87). Leur utilisation en situation de greffe de CSH est également décevante. Malgré les résultats d'une étude en faveur d'une réduction d'incidence de la BKPyV-CH après prophylaxie par ciprofloxacine (130), deux autres études dont une prospective ne retrouvent pas un tel bénéfice (131,132).

Le cidofovir suscite également l'intérêt des cliniciens dans le traitement des infections à BKPyV. C'est un analogue nucléotidique à large spectre dont l'indication principale est celle de la rétinite à CMV. Depuis une étude montrant son efficacité *in vitro* dose dépendante sur la réplication et la transcription du virus (133), plusieurs essais ont été conduits pour évaluer son efficacité *in vivo* en administration intra-veineuse. Des résultats contrastés ont été obtenus dans le cadre de BKVN, expliqués en partie par des concentrations plasmatiques insuffisantes (87). Pour la BKPyV-CH, des réponses cliniques et virologiques soutenues ont été observées au sein des différentes séries étudiées. Il manque cependant une étude randomisée pour confirmer le rôle du cidofovir dans ces améliorations (107). Du fait de la fourchette thérapeutique étroite et de la néphrotoxicité de ce médicament, les espoirs se portent désormais sur le brincidofovir qui est un ester lipidique de cidofovir. Le brincidofovir disposerait d'une biodisponibilité plusieurs centaines de fois supérieure permettant d'inhiber la réplication du BKPyV avec une moindre toxicité rénale. Des études *in-vivo* doivent être conduites pour confirmer ces résultats encourageants (134–136).

Le leflunomide est un agent immunosuppresseur principalement utilisé dans des indications rhumatologiques, telles que la polyarthrite rhumatoïde et le rhumatisme psoriasique. Ce médicament possèderait une activité inhibitrice vis-à-vis du BKPyV (137).

Que ce soit en contexte de greffe rénale ou de CSH, peu d'études sont disponibles et les résultats décevants (87,107).

Plusieurs autres procédures thérapeutiques ont fait l'objet soit d'études non contrôlées, soit de cases reports. C'est le cas des injections intra-vésicales de cidofovir ou encore de l'application de « colle » hémostatique intra-vésicale à base de fibrine qui sont parfois proposées aux patients atteints de BKPyV-CH (107). Dans le cadre de la BKVN, l'administration d'immunoglobulines IV a également été étudiée avec des résultats difficiles à évaluer, la réduction de l'immunosuppression adoptée en parallèle constituant un facteur confondant. Enfin, une piste encore peu étudiée dans le cas du BKPyV mais dont les premiers résultats sont encourageants (138) est celle de la thérapie cellulaire spécifique anti-virale. Elle repose sur l'administration clonale de lymphocytes T rendus compétents et sélectionnés pour leur capacité à combattre un ou plusieurs pathogènes après stimulation antigénique in-vitro.

3. Focus sur la NCCR du BKPyV

a. [Rétrospective](#)

Les premiers travaux concernant le BKPyV ont été réalisés à partir de la souche dite « prototype » (WT) initialement découverte et cultivée par Sylvia D. Gardner en 1971.

Depuis, le BKPyV a de nouveau été isolé puis propagé avec succès en culture cellulaire à partir des urines d'un patient atteint d'un syndrome de Wiskott-Aldrich, constituant ainsi des stocks distincts (139,140). Deux autres souches, Dunlop (Dun) et MM furent ainsi caractérisées et étudiées. A la fin des années 70, le séquençage entier de leur génome fut publié, faisant la lumière sur l'organisation générale du BKPyV (141,142) et révélant à cette occasion le polymorphisme d'une région située proche de l'origine de réplication, la NCCR (143). La NCCR du BKPyV suscite rapidement l'intérêt des chercheurs pour son étonnante variabilité.

En 1982, Watanabe *et al.* ont observé que des réarrangements génomiques surviennent dans cette région après plusieurs passages en culture cellulaire alors que les régions codantes sont conservées. Ces réarrangements ont été mis en évidence grâce au profil de restriction obtenu après digestion enzymatique (*HindIII*-C) de l'ADN du BKPyV. Ils affecteraient à la fois la capacité répliquative, l'effet cytopathique ainsi que le pouvoir transformant du virus (144).

D'autres études ont confirmé que la NCCR du BKPyV, après un ou plusieurs passages du virus en culture cellulaire, présentait des réarrangements qui n'étaient pas présents chez la souche clinique (145,146). De plus, certaines conformations de NCCR ne permettraient pas une réplication optimale du BKPyV en culture cellulaire, entraînant un

biais de sélection des souches avec cette méthode d'étude (147). Ces observations *in vitro*, bien qu'expérimentalement intéressantes, constituent un obstacle dans la compréhension du cycle infectieux et la pathogénicité du BKPyV chez l'Homme.

Pour s'affranchir de ces limitations, une équipe a réussi en 1981 à étudier la structure du génome de BKPyV excrété dans les urines de deux patients sans passage préalable en culture cellulaire (148). En 1984 *Chauhan et al.* ont perfectionné cette approche en réussissant à cloner dans un plasmide (pBR322) une souche clinique de BKPyV recueillie à partir des urines d'un troisième patient. La transfection du plasmide recombinant dans une culture bactérienne d'*Escherichia Coli* transformés (HB101) a permis une amplification du génome viral et l'étude de son organisation. Dans ces deux études, la caractérisation de la souche a révélé une organisation différente de la NCCR par rapport aux souches WT, Dun et MM isolées de cultures cellulaires classiques. Cette souche a été nommée « WW » et serait peu adaptée à la culture cellulaire conventionnelle (147,148).

Dans la lignée de ces travaux, en 1987, *Rubinstein et al.* ont affiné l'étude de la NCCR de la souche WW en la séquençant et la comparant à la souche WT. Ils ont montré que la NCCR de la souche WW comportait une insertion de 63 paires de bases ainsi qu'un seul exemplaire d'une région de 68 paires de bases habituellement retrouvée en plusieurs exemplaires chez les autres souches issues de culture cellulaire (Figure 4.) (149).

La culture cellulaire ne permettant donc pas de préserver l'architecture originale du virus ainsi que la découverte de la souche WW et d'autres souches à NCCR structurellement similaires (souches Dik et AS) (150,151) ont permis d'instaurer une réflexion sur l'organisation de la NCCR d'une souche dite « sauvage » de BKPyV.

Rubinstein et al. ont alors proposé à l'issue de travaux complémentaires (152,153) que la souche WW correspondrait à cette souche « sauvage » argumentant qu'il était peu probable que l'isolement consécutif d'un BKPyV à NCCR identique (WW) dans les urines de plusieurs patients soit due au hasard. Ils ont ainsi opposé une organisation « archétype » de la NCCR retrouvée notamment chez leur souche WW et une organisation « réarrangée » de la NCCR retrouvée chez les autres souches (Figure 3.) (152).

Le développement de la PCR au début des années 90 a permis l'isolement de plus en plus fréquent de souches cliniques de BKPyV dont l'analyse a révélé des NCCR similaires à la souche BKPyV WW renforçant l'hypothèse de *Rubinstein et al.* (154–156). Les premières souches à NCCR réarrangées obtenues directement à partir d'échantillons biologiques ont également été détectées durant cette période, instaurant un débat sur la

significativité clinique de telles souches (cf. infra) (150,154,157,158). Des études ultérieures confirmeront néanmoins la prédominance et la répartition ubiquitaire des souches archétype de BKPyV (27,159,160).

b. Structure en blocs et réarrangements

En 1995, *Moens et al.*, dans une revue de la littérature à propos de la NCCR du BKPyV reprennent et confirment la dichotomie NCCR archétype/NCCR réarrangée (161). Ils introduisent également une représentation arbitraire de la NCCR en « blocs » encore utilisée à ce jour et adaptée de travaux précédents (Figure 4.) (162). Ces blocs ont été nommés « O, P, Q, R et S ». Ils contiennent des sites de liaison aux facteurs de transcription (TFBS) qui sont des courtes régions génomiques dont les relations fonctionnelles avec les promoteurs des gènes précoces et tardifs ont été mises en évidence à la fin des années 80 (cf. infra). La représentation en blocs de la NCCR a été déterminée de manière arbitraire mais présente l'avantage de rendre plus lisible sa structure et l'analyse de ses réarrangements.

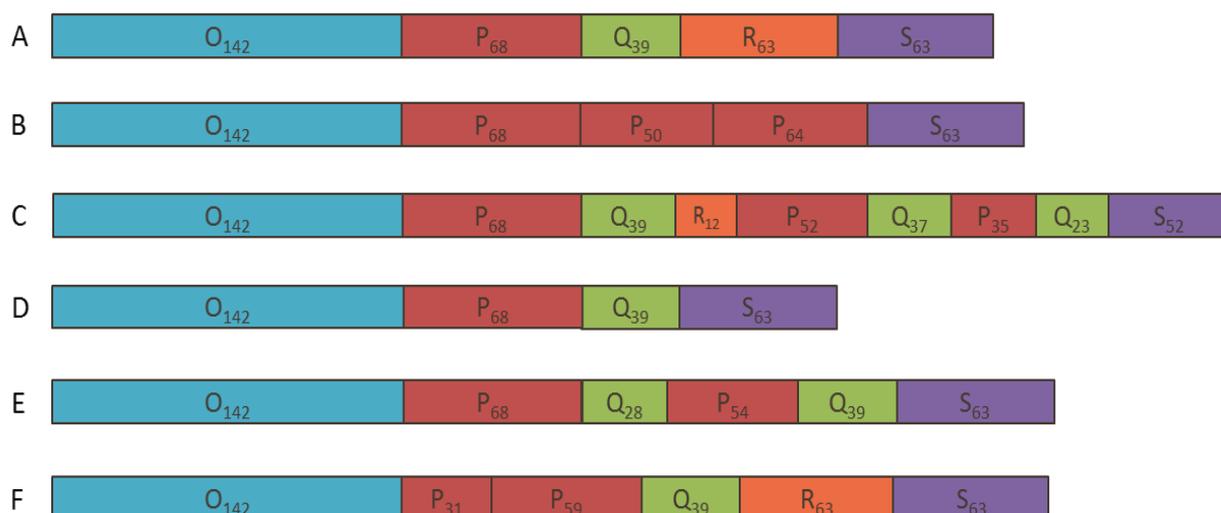


FIGURE 4. NCCR du BKPyV. Représentation en blocs et exemples de réarrangements. (A) Souche WW (NCCR archétype). (B) Souche Dunlop. (C) Souche MM (décrite uniquement en culture cellulaire). (D) Souche PQ. (E) Souche BKVAN-2. (F) Souche BMT-14.

Le bloc O englobe une région conservée de 142 pdb contenant l'origine de réplication du BKPyV ainsi que le promoteur des gènes précoces et tardifs, la TATA box. Il contient également plusieurs sites de liaison au LTag ainsi que d'autres TFBS régulant l'expression des gènes précoces et tardifs (163).

Les blocs P-Q-R englobent quant à eux trois régions de 68, 39 et 63 pdb respectivement. Ils comprennent de nombreux TFBS putatifs ou prouvés. Les réarrangements de NCCR observés affectent principalement ces blocs-ci, modifiant la

dynamique d'interaction avec les TF. Les duplications et délétions de toute ou partie de ces blocs peuvent soit modifier le nombre de TFBS spécifiques ou bien créer des jonctions aberrantes masquant ou faisant apparaître de nouveaux TFBS (161,162,164). Il a notamment été montré que la duplication du bloc P était associée à l'activation du promoteur des gènes précoces et conférait un avantage dans l'adaptation à la culture cellulaire (157,165). Il semblerait en outre que le bloc P soit constamment préservé au sein des souches réarrangées étudiées *in vitro* et *in vivo*, soulignant son importance. A l'inverse les délétions concernent davantage le bloc R qui est parfois absent en totalité (163).

Enfin le bloc S d'une longueur 63 pdb, contient notamment deux sites de liaison à NF-1 et d'autres TFBS putatifs. Ce bloc serait moins exposé aux réarrangements que les blocs P-Q-R, comme en témoigne jusqu'ici l'absence de duplication et de délétion complète observée dans cette région chez les différentes souches étudiées à l'exception de deux isolats (**Figure 5.**) (161,163).

Une revue systématique des différentes NCCR archétypes et réarrangées isolées directement d'échantillons biologiques a été effectuée en 2005. Elle illustre à la fois la diversité et la fréquence inhabituelle, pour un virus à ADN, des réarrangements qui peuvent survenir *in vivo* avec plus de 40 souches à NCCR réarrangées différentes recensées dans la littérature (163).

L'origine et les mécanismes de ces réarrangements ne sont pas clairement identifiés. Il a été suggéré qu'ils pourraient apparaître à l'occasion d'erreurs de re-circularisation consécutives à la réplication bidirectionnelle de l'ADN (164). Cette étape a lieu au niveau de l'origine de réplication qui jouxte la TATA box située proche de la jonction O-P (23,167). Des mécanismes additionnels en faveur d'une plasticité de la NCCR ont également été décrits chez le JCPyV et le SV40 qui sont des polyomavirus structurellement proches du BKPyV. Il a été montré qu'un virus SV40 défectif pouvait capter et intégrer à sa NCCR les éléments génétiques nécessaires à sa réplication (168). Sur la base d'arguments indirects il a été discuté, au cours de la réplication du JCPyV, de la possibilité de recombinaisons non homologues entre les différents brins d'ADN viral en cours de réplication. Ces recombinaisons, lors de leur résolution, pourraient donner naissance à des souches réarrangées (169). Enfin, plus récemment et sur un faisceau d'arguments indirects, des auteurs ont proposé une modélisation des mécanismes à l'œuvre dans l'apparition des réarrangements de la NCCR des polyomavirus (170). Selon cette étude, les réarrangements apparaîtraient au sein du complexe de réplication au tout début de l'élongation de l'ADN et résulteraient de plusieurs événements. Le processus impliquerait le premier fragment d'Okazaki ainsi que la polymérase qui pourrait accidentellement « glisser » du brin direct vers le brin rebours. Il en résulterait

une synthèse aberrante d'ADN avec un recouvrement du fragment d'Okazaki (« flap »). Normalement ce recouvrement est excisé par des endonucléases cellulaires (en particulier FEN1) garantissant l'absence de répétition dans l'ADN répliqué. Dans certaines conditions en partie dépendantes de la longueur du recouvrement, la résolution ferait plutôt intervenir la voie réparation de l'ADN qui mobilise d'autres enzymes. Ces dernières entraîneraient alors une cassure de l'ADN, des recombinaisons non homologues permettant une intégration du recouvrement dans l'ADN viral. Il en résulterait une duplication partielle ou totale des nucléotides qui jouxtent l'origine de réplication dans la NCCR (en particulier le bloc P) des polyomavirus (170).

c. Sites de liaison aux facteurs de transcription

La découverte au sein de la NCCR de séquences spécifiques influençant la transcription des gènes précoces et tardifs a été possible grâce à des études de mutagenèse (linker scanning) et d'empreinte à la DNase. Elles ont permis d'identifier les premiers TFBS pour l'« Activating Protein 1 » (AP-1), le « Nuclear Factor 1 » (NF-1), la « Specificity Protein 1 » (SP-1) ou encore des éléments de réponse aux glucocorticoïdes, progestérone ou estrogènes (GRE,PRE,ERE) (165,171–176). De manière complémentaire, l'utilisation d'algorithmes a permis par la suite de prédire une trentaine d'autres TFBS putatifs (Figure 5.) (161,177). L'identification de ces TFBS repose sur la reconnaissance de séquences consensus au sein des différents blocs de la NCCR avec lesquelles peuvent interagir des facteurs de transcription (TF) spécifiques.

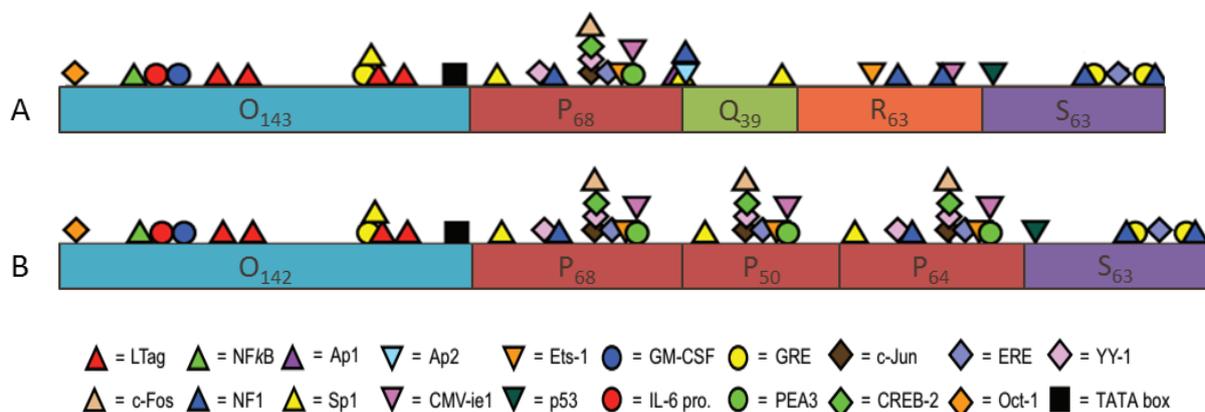


FIGURE 5. Répartition des TFBS au sein de la NCCR.
 (A) NCCR archétype. (B) Exemple de NCCR réarrangée (Dunlop).
 Prédiction des TFBS obtenue *in silico* après analyse des séquences NCCR par les outils bio-informatiques « Alibaba2.1 » et « PROMO ». Adapté de (177).

Peu de travaux ont exploré le rôle joué par les différents TFBS dans la transcription des gènes du BKPyV. Les conclusions des premières études sur le sujet doivent être confrontées à des expériences plus récentes car toutes ont été menées sur

des souches réarrangées. Elles ont de plus utilisé des modèles rapporteurs unidirectionnels pour évaluer l'impact des TFBS sur la transcription des gènes (177).

Certaines observations ont néanmoins été corroborées par Bethge *et al.* qui ont récemment mis au point un modèle expérimental permettant d'évaluer plus précisément l'influence des TFBS sur l'activité transcriptionnelle du BKPyV. A partir d'une NCCR archétype de BKPyV, les auteurs ont introduit des mutations ponctuelles prédites pour inactiver sélectivement les TFBS. Ces NCCR mutées ont ensuite été clonées dans des vecteurs rapporteurs (pHRG) permettant de mesurer sélectivement la transcription des gènes précoces et tardifs *in cellulo* (cellules HEK293) par immunofluorescence.

Cette équipe a ainsi pu montrer que cette transcription bidirectionnelle était régulée en de nombreux sites répondant à une hiérarchie d'activation. L'inactivation successive de ces sites a permis d'individualiser trois profils de réponse (**Figure 6.**) : transcription précoce forte (groupe 1), transcription précoce et tardive équilibrée (groupe 2), transcription précoce faible (groupe 3).

Ces profils permettent de souligner l'importance des TFBS de SP-1 (sites SP-1² et SP-1⁴) dont l'inactivation semble fortement impacter le sens de transcription. Les TFBS de NF-1 (sites NF-1² et NF-1⁴) auraient pour leur part un effet stabilisateur sur les TFs voisins et moduleraient l'intensité de la transcription précoce ou tardive (177).

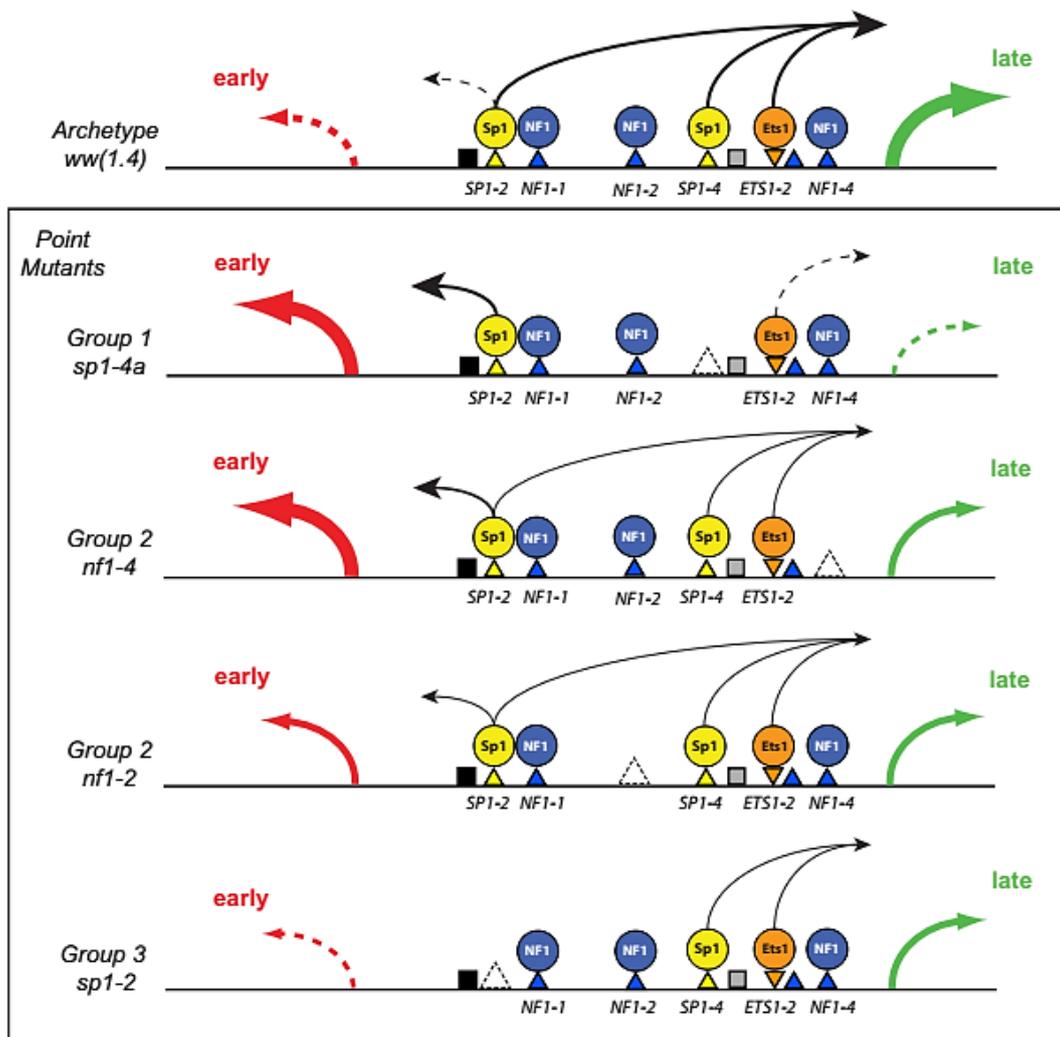


FIGURE 6. Modélisation de l'influence des TFBS sur la transcription des gènes du BKPyV.

Les facteurs de transcription SP-1, NF-1 et Ets-1 influencent le sens et l'intensité de l'expression des gènes précoces (flèches rouges) et tardifs (flèches vertes). La séquence NCCR archétype du BKPyV présente une balance transcriptionnelle en faveur des gènes tardifs. L'inactivation spécifique de TFBS par l'introduction de mutations ponctuelles (schématisée par un triangle en pointillés) modifie cette balance. Trois groupes sont individualisés. L'inactivation de SP-1⁴ renforce la transcription des gènes précoces au détriment des gènes tardifs (groupe1). L'inactivation de NF-1² et NF-1⁴ entraîne une transcription équilibrée, à un niveau intermédiaire des gènes précoces et tardifs (groupe 2). L'inactivation de SP-1² diminue à la fois l'expression des gènes précoces et tardifs (groupe 3). Adapté de (177).

D'autres auteurs ont également avancé la possibilité qu'une réorientation de la transcription des gènes viraux puisse survenir progressivement avec l'accumulation du nombre de génome du BKPyV dans la cellule entraînant une disponibilité insuffisante de certains facteurs de transcription nécessaires pour activer dans un sens ou l'autre la transcription (175).

Enfin, il a été montré que le LTA_g agit également comme TF et oriente le sens de transcription vers les gènes précoces dans des modèles cellulaires modifiés exprimant cette protéine (178). Il est intéressant de noter que cette stratégie a été développée et mise à profit pour contourner les difficultés initiales de propagation de BKPyV archétype

en culture cellulaire. L'utilisation de lignées cellulaires transformées (HEK293TT et COS-7) exprimant constitutivement la protéine LTA_g du virus SV40 a en effet récemment abouti à la propagation avec succès du BKPyV à NCCR archétype sans en altérer la structure (179,180).

Les connaissances expérimentales du fonctionnement de la NCCR du BKPyV ne rendent cependant pas toujours compte de la complexité des interactions qui peuvent survenir *in vivo* (181). La conformation tridimensionnelle de l'ADN viral (grand sillon, petit sillon, pourcentage local en GC etc.) pourrait en effet influencer la capacité d'interaction entre TF et TFBS (182,183). De plus il apparaît que l'activation ou la répression de la transcription peuvent être médiées par des signaux complémentaires à la liaison d'un TF à son TFBS comme par exemple une interaction entre plusieurs TFs ou la mise en jeu de cofacteurs ne se liant pas directement à l'ADN (183). Certaines études ont tenté de mettre en avant ces relations fonctionnelles au sein de la NCCR du BKPyV (175,184,185) mais leur description exhaustive dans un modèle global reste un défi à relever.

d. Détection *in vivo* et implications cliniques

L'émergence du nombre d'infections liées au BKPyV a été contemporaine des principales avancées sur l'organisation archétype/réarrangée de la NCCR et sur son rôle régulateur de la transcription. Les premières souches à NCCR réarrangée ont été isolées à partir d'urines de patients aux trajectoires cliniques variées (150,154,157,158). Il est intéressant de noter que des souches de BKPyV à NCCR réarrangées ont également été isolées de patients indemnes d'atteinte clinique (186). L'isolement de telles souches, *a fortiori* lorsqu'elles accompagnent une pathologie liée au BKPyV pose légitimement la question de leur signification.

La plus importante mobilisation scientifique sur le sujet a eu lieu au début des années 2000. Trois principaux axes de réflexion ont été dégagés concernant les NCCR réarrangées :

- 1) Elles pourraient être associées à des pathologies liées au BKPyV plus sévères. Il est actuellement admis qu'une souche de BKPyV à NCCR archétype possède une transcription dirigée vers ses gènes tardifs alors qu'une souche à NCCR réarrangée exprime davantage ses gènes précoces indépendamment du type de réarrangement lui conférant ainsi une meilleure réplication en culture cellulaire (164,187,188). Par extension, il a été avancé que certaines souches réarrangées répliqueraient mieux que les souches archétype *in vivo* (189). Plusieurs études cliniques ont donc tenté de mettre en évidence des patterns pouvant refléter une pathogénicité accrue des souches réarrangées.

A l'exception d'une étude soulignant la fréquence d'une même mutation dans le TFBS de SP-1 (SP1⁴) chez une cohorte de patients atteints de BKPyV-CH (120), il n'a pas été trouvé d'architecture réarrangée spécifique qui soit en lien avec la BKVN ou la BKPyV-CH (121,159,186,190).

Ces études ainsi que d'autres ont également tenté d'établir des liens statistiques entre souches réarrangées et caractéristiques cliniques en faveur d'une pathologie plus sévère au sein de cohortes de patients transplantés. La plupart des auteurs n'ont pas mis en évidence de différences pouvant expliquer une pathogénicité particulière des souches réarrangées (121,190–192). Cela reste débattu dans le cas de la BKVN, ou d'autres travaux ont relevé des charges plasmatiques plus élevées ainsi que des marqueurs d'inflammation plus importants dans les biopsies rénales de patients hébergeant des souches réarrangées (159). Une méta-analyse portant sur les caractéristiques cliniques et épidémiologiques associées à 507 NCCR note également que parmi les patients transplantés, les réarrangements sont plus fréquents chez les patients atteints de BKVN. Il ne faut cependant pas exclure que la détection de souches réarrangées représente en réalité la conséquence d'une réplication intense chez ces patients plutôt que la cause. En considérant les autres données de cette méta-analyse, les auteurs concluent en outre que les souches à NCCR réarrangées ne sont ni nécessaires ni suffisantes pour expliquer la survenue des BKVN et BKPyV-CH (186).

2) Elles seraient nécessaires pour élargir le tropisme du BKPyV. Cette idée s'appuie sur la découverte de souches de BKPyV à NCCR réarrangée en de nombreux autres sites que l'appareil urinaire, site de persistance du virus. Par exemple des NCCR réarrangées ont été détectées au sein du système nerveux central (193,194), le système respiratoire (195,196) ou encore dans les cellules mononuclées du sang (40,197,198). De plus l'apparition récurrente de NCCR réarrangées en culture cellulaire conventionnelle suggère que les réarrangements puissent résulter d'une sélection de souches de BKPyV dans un environnement inédit pour le virus. L'hypothèse a alors été avancée que de nombreuses souches BKPyV à NCCR réarrangées apparaîtraient *in vivo*, parmi lesquelles une faible proportion serait viable et confèrerait au BKPyV un avantage répliatif dans des tissus peu permissifs, différents du site habituel de réplication. Bien qu'il soit plausible que des réarrangements apparaissent *in vivo* consécutivement à une réplication active du BKPyV (196), l'hypothèse d'un tropisme particulier conféré par la NCCR apparaît moins claire. L'histoire clinique des patients concernés par ces observations est hétérogène, en particulier leur niveau d'immunocompétence. Dans ces conditions, il est difficile d'exclure que des facteurs d'hôtes spécifiques plutôt que le site d'isolement aient été à l'origine des réarrangements. De plus, des souches de BKPyV à NCCR archétype ont également été détectées dans la plupart des tissus en question (163) rendant flou le lien entre réarrangement et localisation du virus. Enfin, comme

l'exposent Moens *et al.* dans leur revue de la littérature, aucun réarrangement « type » tissu dépendant n'a pu être proposé fragilisant davantage l'hypothèse d'un tropisme dépendant de la NCCR du BKPyV. Ces auteurs précisent toutefois que la rareté des observations ne permet pas de conclure définitivement sur cet aspect (163).

3) Elles pourraient être impliquées dans le développement de tumeurs en raison d'un pouvoir oncogène accru. Les polyomavirus, disposent d'un pouvoir oncogène certain chez les modèles animaux et cellulaires (199). Certains mécanismes conduisant à la transformation cellulaire ont été identifiés avec un rôle central attribué au LTA_g qui interagit avec p53 et pRb et promeut une croissance cellulaire inappropriée (200). Les souches de BKPyV à NCCR réarrangées, qui expriment davantage leurs gènes précoces dont le LTA_g, pourraient donc favoriser un environnement propice à la transformation cellulaire (201). Cet état « transformé » pourrait en revanche être insuffisant pour permettre l'apparition de tumeurs *in vivo* et devrait probablement être associée à d'autres mutations (202). Le BKPyV a été détecté intégré à l'ADN de cellules tumorales cérébrales (203) et a été retrouvé par PCR dans d'autres tumeurs (204) notamment du système urinaire et de la prostate (79,201). Une production active de LTA_g a également été objectivée dans certains de ces tissus (205–208). Enfin, des auteurs ont rapporté un échec dans leurs tentatives de mettre en culture le BKPyV à partir de tissus tumoraux suggérant que le virus puisse être présent sous une forme intégrée à l'ADN des cellules ou sous forme épisomale altérée (201). Bien que ces observations remplissent en partie les critères proposés par *H. zur Hausen* pour établir une relation causale entre infection et cancer (209), le rôle BKPyV en tant que facteur ou co-facteur de carcinogénèse demeure controversé en l'état actuel des connaissances (210,211). En l'absence de preuves formelles, l'OMS considère toutefois le BKPyV et le JCPyV comme des agents infectieux « possiblement cancérigènes pour l'Homme » (groupe 2B) (212).

Malgré ces éléments d'orientation, il reste difficile de tirer des enseignements à la fois sur les conditions d'émergence *in vivo* des souches de BKPyV à NCCR réarrangée mais aussi sur leur implication potentielle dans le développement de pathologies liées au BKPyV.

e. [Limites et perspectives](#)

Même si les fonctions de NCCR du BKPyV sont de mieux en mieux caractérisées, de nombreux efforts restent à mettre en œuvre pour appréhender plus finement quelles interactions produisent un effet sur la transcription des gènes précoces ou tardifs. Il en est de même pour les déterminants qui donnent naissance aux BKPyV à NCCR réarrangée ainsi que la signification de ces réarrangements en pathologie humaine. L'accélération des connaissances dans ce domaine se heurte cependant à plusieurs obstacles.

En premier lieu, les modèles expérimentaux habituellement utilisés pour l'étude de la NCCR BKPyV ne sauraient reproduire exactement l'environnement auquel sont soumis les tissus infectés chez l'Homme. Par exemple la réponse cellulaire à un stress hypoxique, les variations de concentration tissulaire en hormones stéroïdiennes ou encore l'environnement inflammatoire au sein du tissu pourraient être des paramètres susceptibles d'influencer la disponibilité et l'abondance intracellulaire de certains TF (NFκB, estrogènes ...) donc de moduler l'activité transcriptionnelle du BKPyV. De plus, bien que l'immunité innée, humorale et cellulaire dirigée contre le BKPyV ait été évaluée dans plusieurs études (213), la pression immunitaire qui s'exerce *in vivo* sur le virus est difficilement modélisable dans son intégralité en conditions de laboratoire. Son impact global dans la sélection de mutations au sein de la NCCR ou dans les régions codantes reste à déterminer. L'absence de modèle animal permettant de reproduire et de monitorer *in vivo* la course d'une infection à BKPyV constitue une difficulté supplémentaire pour pouvoir répondre à ces écueils.

En second lieu, la plupart des études n'offrent qu'une image instantanée d'un processus infectieux dont les caractéristiques varient généralement dans l'espace et le temps. Cette limitation technique est notamment illustrée par la problématique des souches de BKPyV à NCCR réarrangée qui font l'objet de conjectures à partir de données expérimentales statiques. Ces conditions rendent délicate à formaliser le rapport de causalité entre la découverte de lésions tissulaires et la présence *in-situ* de BKPyV à NCCR réarrangée. Il pourrait s'avérer que le virus ne soit qu'un facteur confondant ou ne possède qu'un rôle secondaire dans le processus physiopathologique observé.

Des approches plus récentes permettent néanmoins de jeter un regard nouveau sur la problématique des NCCR réarrangées du BKPyV. Jusqu'à présent, les méthodes de détection et de séquençage les plus couramment utilisées (méthode Sanger) ne permettaient l'analyse que de la souche virale majoritaire, ne révélant la présence de variants que s'ils excédaient 20% de la population. La récente utilisation du séquençage haut débit (NGS) a permis de détecter des souches de BKPyV à NCCR réarrangées en proportions minoritaire au sein d'échantillons cliniques (de l'ordre de 1%) (196,214). Ces souches n'auraient pas été détectées en utilisant les méthodes classiques, moins sensibles. L'utilisation de la NGS pourrait ainsi mettre en lumière une plus grande hétérogénéité des souches de BKPyV au sein des échantillons dans les études à venir.

4. Objectifs de l'étude

Afin d'illustrer cette revue sur la NCCR du BKPyV et ses problématiques associées, nous avons choisi d'étudier la NCCR de 20 patients en situation de greffe de cellules souche hématopoïétiques au CHU de Bordeaux.

Peu de données locales sont disponibles dans ce contexte précis, en dehors d'un travail de séquençage génome entier de souches issues d'urines de patients présentant une BKPyV-CH (Boijoux, H., Lafon, M.-E., Bissau, R.K., non publié). Ce travail avait permis de caractériser deux souches de BKPyV dont les NCCR étaient archétypes (GenBank : MF627830.1 et MF627831.1).

L'objectif de cette étude préliminaire est de caractériser la NCCR de souches de BKPyV isolées dans les urines de ces 20 patients afin de déterminer si la souche responsable de l'épisode clinique possède une NCCR archétype ou réarrangée. Les objectifs secondaires de ce travail sont : 1) Rechercher, le cas échéant, une association entre la détection de souches à NCCR réarrangée et des caractéristiques cliniques spécifiques ou critères de gravité de l'atteinte. 2) Etudier l'impact potentiel d'éventuelles mutations de la NCCR sur les TFBS connus.

II. Matériel et méthode

1. Réalisation de la PCR BKPyV en routine, au laboratoire de virologie

Après le recueil, les urines sont acheminées dans des pots vissés à bouchon rouge à une température de 5°C en pochette thermostatée. Les prélèvements accompagnés de la prescription, sont réceptionnés par l'accueil de biologie centralisée où est effectué l'enregistrement de l'analyse. Les prélèvements sont ensuite acheminés au laboratoire de virologie via un pneumatique et réceptionnés par un technicien de virologie afin d'être acquittés (preuve de la réception de l'échantillon par le laboratoire). Un aliquotage en tube Sarstedt® d'un volume d'environ 2 mL d'urine est effectué par les techniciens de laboratoire.

La PCR BKPyV est effectuée sur le plateau technique de biologie moléculaire (PTBM) à l'aide des automates du système Flow (société Roche) en utilisant des kits de PCR Argene® (société Biomerieux). Ce système Flow permet la réalisation des PCR virales EBV, CMV, HHV-6, adénovirus et BKPyV au sein du laboratoire.

La première étape de l'analyse consiste à extraire les acides nucléiques viraux présents dans le prélèvement. L'échantillon est déposé sur une plaque de 96 puits par l'automate PSH (Primary Sample Handling) puis l'extraction est réalisée par l'automate MagnaPure96® permettant d'obtenir une seconde plaque contenant l'éluat de

l'échantillon qui est une solution concentrée en acides nucléiques. Au cours de cette étape, un contrôle d'extraction (inclus dans les trousse Argene®) est également incorporé dans l'échantillon primaire afin de valider la technique d'extraction.

La plaque d'éluats est ensuite traitée par le PSU (PCR Set-Up) qui est l'automate dédié à la préparation du mélange réactionnel à partir de la trousse commerciale BK Virus R-gène®, Biomérieux. Cette trousse contient les sondes spécifiques Taq Man®, les amorces du contrôle interne d'extraction, les amorces d'une séquence de 158 paires de bases de la région génomique du STAg (Small T Antigen) du BKPyV, l'enzyme Taq polymérase, ainsi qu'une solution tampon permettant l'amplification. La réaction de PCR est ensuite réalisée à l'aide d'un thermocycleur Light Cycler 480® (société Roche).

La PCR BKPyV réalisée en routine est quantitative grâce à une courbe de calibration en 4 points QS1, QS2, QS3 et QS4 (Quantification Standard) correspondant à des quantités d'ADN plasmidiques croissantes et connues de BKPyV. A l'issue de la PCR, on obtient ainsi un résultat en « copies/mL » d'échantillon converti en « UI/mL » grâce à l'utilisation d'un standard international facilitant la comparaison des résultats entre laboratoires.

L'ensemble de ce processus est piloté grâce à un serveur informatique nommé « Flow Server ». Les résultats sont transmis au système informatique du laboratoire « Glims » (SIL) après validation technique. Enfin, la validation biologique permet de générer un compte rendu électronique qui sera consultable par le clinicien via le logiciel patient « DxCare ».

Par ailleurs, une biothèque de tous les prélèvements analysés sur le système Flow est réalisée et conservée à -20°C au laboratoire de Virologie.

2. Etude de la NCCR du BKPyV dans les urines de patients d'hématologie

a. Echantillons et critères d'inclusion

Nous avons réalisé un recueil rétrospectif des prélèvements d'urine testés positifs pour le BKPyV par PCR, analysés dans notre laboratoire de virologie. Ces échantillons provenaient de patients des services d'hématologie clinique du CHU de Bordeaux. Ils ont été extraits de notre biothèque pour séquençage de la région NCCR du BKPyV.

Les critères d'inclusion étaient : échantillon d'urine de patients ayant bénéficié d'une greffe de cellule souche hématopoïétique, analysé entre le 01/04/2019 et 31/03/2020 et une PCR BKPyV positive avec une charge virale supérieure à notre limite de quantification (3.100.000 UI/ml). 32 échantillons d'urine correspondaient aux critères d'inclusion.

Dans un premier temps, le séquençage de la NCCR su BKPyV a été réalisé pour 20 échantillons d'urine correspondant à 20 patients distincts. Il s'agissait, pour chaque patient, du premier échantillon d'urine correspondant à l'épisode clinique et qui répondait aux critères d'inclusion.

Dans un second temps, 12 échantillons supplémentaires ont été analysés correspondant à de nouveaux prélèvements chez ces mêmes patients. Ces échantillons supplémentaires, lorsqu'ils étaient disponibles, ont permis d'obtenir des données longitudinales grâce au séquençage de la NCCR du BKPyV à différents moments de l'infection.

b. [Extraction des acides nucléiques](#)

Après décongélation, 200µL de chaque prélèvement ont été déposés dans une plaque 96 puits. L'extraction des acides nucléiques viraux a été réalisée sur notre automate MagnaPure96® en utilisant le kit « MagNA Pure 96 DNA and Viral Nucleic Acid Small Volume »

c. [Mélange réactionnel de la PCR NCCR](#)

Un mélange réactionnel a été préparé (**Tableau 9.**) pour la réalisation de la PCR en point final permettant d'amplifier la NCCR du BKPyV.

Composés	Volume par échantillon (µL)
MgCl ₂ (25mM)	5
Solution tampon	5
H ₂ O	25
dNTP (5mM)	2
Amorce sens (20µM)	1,25
Amorce anti-sens (20µM)	1,25
Taq GOLD	0,5
Volume Total	40

TABLEAU 9. Mélange réactionnel pour amplification de la NCCR du BKPyV par PCR point final.

Les amorces utilisées dans ce travail (**Tableau 10.**) ont été publiées et utilisées dans d'autres études pour amplifier la NCCR du BKPyV (97,159).

Amorces	Séquence	Position ^c
BKTT 5 ^a	5'- GAGCTCCATGGATTCTTC -3'	5115 – 5132
BKTT 6 ^a	5'- CCAGTCCAGGTTTTACCA -3'	429 – 446
BKTT 7 ^b	5'- CCCTGTTAAGAAGCTTTATCCATTT -3'	5132 – 2
BKTT 8 ^b	5'- AACTTTCACCTGAAGCTTGTCGT -3'	408 – 429

TABLEAU 10. Amorces utilisées pour la PCR et le séquençage de la NCCR.

(a) Amorces utilisées en première intention. Amorce sens: BKTT 5; Amorce anti-sens: BKTT 6. (b) Amorces utilisées en seconde intention en cas d'échec de la première amplification. Amorce sens : BKTT 7; Amorce anti-sens : BKTT 8. (c) Position des nucléotides par rapport à la séquence Dunlop, GenBank #V01108.1.

d. Amplification de la NCCR par PCR point final

Pour chaque échantillon, 10µL d'éluat et 40µL de mélange réactionnel ont été déposés dans des cupules pour réalisation d'une PCR point final en utilisant l'automate de PCR Primus HT® (MWG AG Biotech, société Eurofins) avec le programme de PCR suivant (**Tableau 11.**).

Programme de la PCR	Durée (min)	Température (°C)
Activation de la Taq	-	110
	10	95
Cycle de PCR (x40)	-	-
	1. Dénaturation	95
	2. Hybridation	51
	3. Elongation	72
Elongation finale	3	72
Refroidissement	10	8

TABLEAU 11. Etapes de l'amplification de la NCCR du BKPyV par PCR point final.

À la fin de la PCR, la présence ainsi que la taille (en paires de bases) du produit d'amplification ont été analysés pour chaque échantillon grâce à une électrophorèse capillaire sur l'automate QIAxcel Advanced® (société QIAGEN) (**Figure 7.**) (**Figure 8.**).

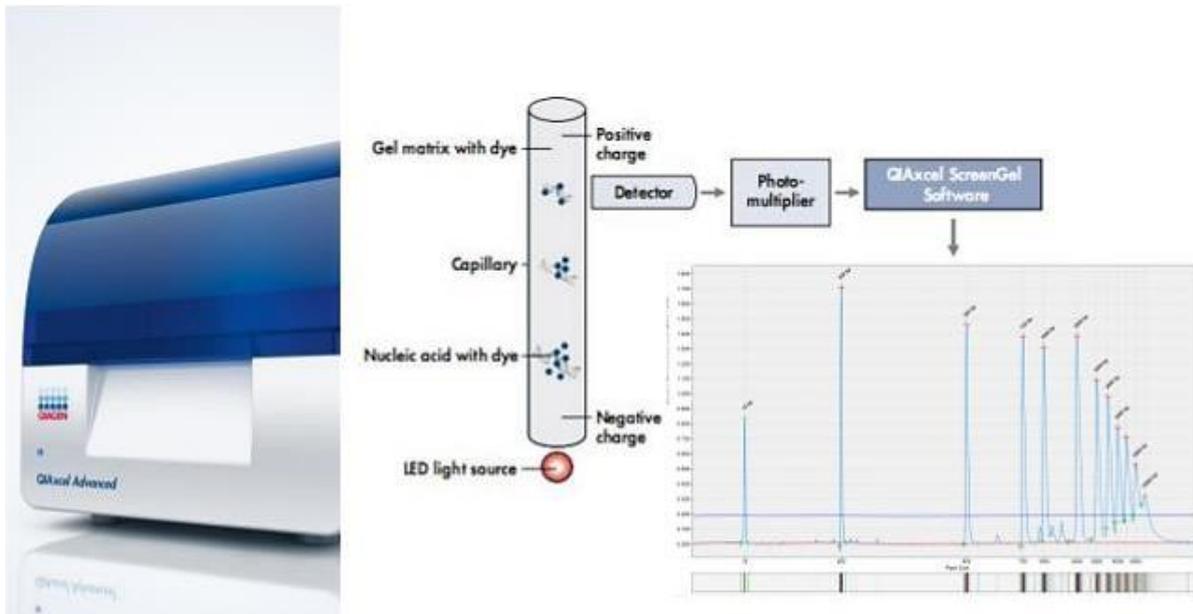


FIGURE 7. Principe général de l'électrophorèse capillaire par l'automate QIAxcel®.

Prise d'échantillon par application d'une différence de potentiel aux extrémités du capillaire. Migration des acides nucléiques vers la cathode (« positive charge »). Séparation des fragments. Les fragments de plus petit poids moléculaire migrent plus rapidement. Les acides nucléiques sont marqués lors de leur passage dans la matrice constituée d'un polymère associé à du BET (« gel matrix with dye »). Excitation par une diode électroluminescente (« LED light source ») avec émission de fluorescence. Recueil du signal lumineux par un détecteur couplé à un photomultiplicateur. Transduction du signal lumineux en signal électronique puis analyse des données à l'aide du logiciel QIAxcel ScreenGel Software® qui génère un compte rendu électronique.

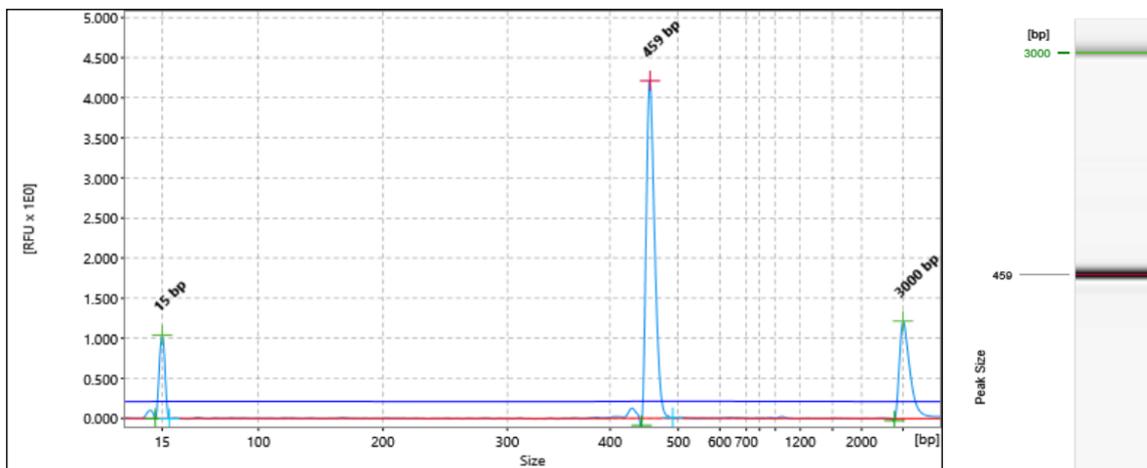


FIGURE 8. Compte-rendu d'électrophorèse capillaire avec l'automate QIAxcel®.

Echantillon d'urine après amplification de la NCCR du BKPv. (RFU) : « relative fluorescent unit » correspondant à la quantité relative des fragments détectés. (bp) : taille des fragments paires de bases. (En haut) : Les pic à 15bp et 3000 bp représentent les témoins de migration permettant d'évaluer la taille des fragments amplifiés. Le pic détecté à 459 bp correspond aux fragments d'ADN amplifiés dans l'échantillon d'urine. (A droite) : représentation des résultats sous forme de bandes.

e. Purification enzymatique de l'échantillon par la méthode ExoSAP

Une purification enzymatique de chaque produit d'amplification a ensuite été réalisée. 4µL d'Exo-SAP-IT Express® (USB® products, société Thermofischer) contenant deux enzymes, une exonucléase I chargée d'éliminer les amorces en excès et une phosphatase alcaline de crevette chargée d'éliminer les dNTP, ont été mélangés avec 10µL de produit de PCR. Le mélange a ensuite été incubé dans un thermocycleur Primus HT® 4 minutes à 37°C pour initier la purification puis 1 minute à 80°C pour inactiver les enzymes.

f. Séquençage de la NCCR du BKPyV

Le séquençage de la NCCR du BKPyV a été réalisé par la méthode Sanger. La réaction de séquence s'est déroulée sur le thermocycleur Primus HT® selon programme décrit précédemment (**Tableau 11.**). Un nouveau mélange réactionnel comprenant le kit de séquençage BigDye® v3.1 (Applied Biosystems, société Thermofischer) a été préparé pour cette réaction (**Tableau 12.**). Au minimum deux réactions de séquence de la NCCR ont été effectuées pour chaque échantillon, en utilisant l'amorce du brin sens dans un premier puits et l'amorce du brin anti-sens dans un second puits.

Une purification a ensuite été réalisée en mélangeant 55 µL de BigDye® Xterminator™ et solution SAM™ avec 10 µL d'échantillon puis agitation sur Vortex Genie 2® à 1800 t/min à température ambiante pendant 30 min. L'analyse des produits de la réaction de séquence a été effectuée par le séquenceur 3500xL Dx (Applied Biosystems). La mise en forme des données a été effectuée *par le logiciel* « 3500 series data collection software 3.1 » (Applied Biosystems).

Composés	Volume par échantillon (µL)
Kit BigDye® v3.1	1
Solution tampon	3,5
H ₂ O	13,5
Amorce sens ou anti-sens (20 µM)	1
Produit d'amplification de PCR (NCCR)	1
Volume Total	20

TABLEAU 12. Mélange réactionnel pour le séquençage de la NCCR du BKPyV

g. [Post-traitement et alignement de séquence](#)

La visualisation et le post-traitement des chromatogrammes ont été réalisés à l'aide du logiciel Chromas (version 2.6.6, Technelysium) (**Figure 9.**). Les séquences obtenues ont été comparées avec la librairie de séquences Genbank dans BLAST® (NCBI) (215). Un alignement des séquences sens et anti-sens a été réalisé avec l'outil bio-informatique Clustal Omega (216) afin de déterminer la séquence consensus de la NCCR du BKPyV de chaque échantillon.

Secondairement, un alignement multiple a été réalisé avec Clustal Omega pour comparer chaque séquence consensus avec une séquence NCCR du BKPyV de référence.

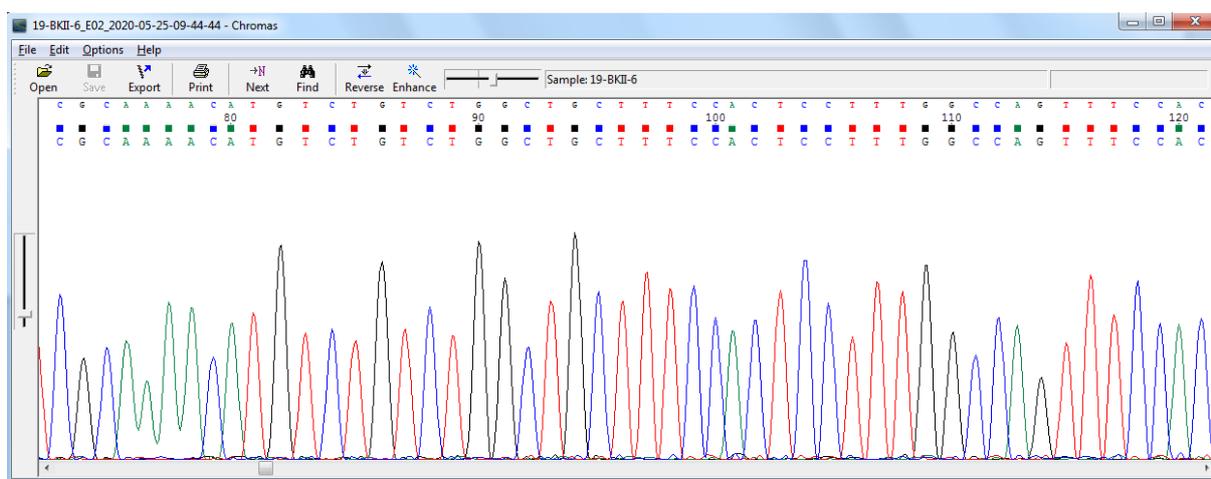


FIGURE 9. Exemple de chromatogramme d'une séquence NCCR de BKPyV sous Chromas 2.6.6

La séquence de référence sélectionnée pour l'alignement était la séquence consensus archétype de la NCCR du BKPyV « WWM » (GenBank JQ513592.1) publiée dans une revue de la littérature sur la NCCR du BKPyV en 2005 (163). Les résultats ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel Jalview (version 2.11.1.0) (217).

h. [Analyse des séquences NCCR obtenues](#)

Une analyse secondaire des NCCR séquencées a été réalisée grâce aux outils bio-informatique Alibaba2.1 (218). Les paramètres par défaut ont été utilisés offrant un compromis entre fiabilité et sensibilité des prédictions (218).

A l'aide de ce programme, l'objectif était de déterminer si les mutations observées se situaient au sein de TFBS connus ou putatifs puis de vérifier si ces mutations affectaient la prédiction des TFBS.

III. Résultats

Les caractéristiques des patients correspondant aux échantillons testés (**Annexe 1.**) sont résumées ci-dessous (**Tableau 13.**).

Sur le plan clinique, 18 des 20 patients présentaient une symptomatologie urinaire associée à une répllication du BKPyV. 40% (n=8) des patients présentaient la triade diagnostique de la BKPyV-CH (répllication du BKPyV à haut niveau, symptomatologie urinaire et hématurie de grade II ou supérieur).

Sexe	H	75% (15)
	F	25% (5)
Age moyen (années)		43,4 [8 – 67]
Type de Conditionnement	TBF	40% (8)
	FB2S	20% (4)
	Autre	40% (8)
Type de greffe	CSP	75% (15)
	MO	15% (3)
	SC /USP	10% (2)
Signes cliniques	Hématurie	40% (8)
	Dysurie	90% (18)
	Aucun	10% (2)
Délai moyen greffe/découverte BKPyV urines (j)		68,9 [10 – 408]

TABLEAU 13. Résumé des caractéristiques des patients.

n= 20 patients. (H/F) : Homme/Femme. (TBF): Thiotépa, Busulfan, Fludarabine. (FB2S): Fludarabine, Busulfan, Serum Anti-Lymphocytaire. (CSP) : Cellules Souches Périphériques. (MO) : Moelle osseuse. (SC/USP) : Sang de cordon/Unité de sang placentaire

1. Séquençage de la NCCR du BKPyV sur échantillon initial

Le séquençage de la NCCR du BKPyV a échoué pour les patients 1 et 2. Une vérification de la présence d'ADN dans les éluats correspondants a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop™, Thermofischer). La présence d'ADN, a été confirmée pour ces deux éluats mais il n'a pas été possible d'amplifier la NCCR du BKPyV malgré plusieurs tentatives.

Pour les 18 autres patients, les chromatogrammes ont révélé une bande dont la taille était similaire à la taille d'une NCCR du BKPyV. Après séquençage, la comparaison des séquences obtenues avec la librairie de séquences Genbank dans BLAST® a montré

une correspondance de 100% pour quasiment tous les échantillons avec une NCCR de BKPyV.

L'alignement des séquences avec la séquence archétype de référence a confirmé que la structure de la NCCR du BKPyV était archétypale pour tous les échantillons amplifiés. Cet alignement a également permis de mettre en évidence un polymorphisme nucléotidique entre les NCCR (**Figure 10.**).

Une comparaison de chaque séquence consensus avec la librairie de séquences GenBank dans BLAST® a montré que toutes les séquences NCCR de cette étude ont déjà été publiées à l'exception d'une seule (BKPyV-Ur_16) (**Tableau 14.**).

Référence (# Genbank)	Séquence (BKPyV_Ur_#)	Homologie (%)
WWM (JQ513592.1)	9	100
WWM2 (JQ513593.1)	5;6;14;15;17;18;20	100
WWM3 (JQ513594.1)	3	100
	4	100
WWM6 (JQ513597.1) ou WW (M15987.1)	10;11;19	100
WWM8 (JQ513599.1)	8	100
WWM10 (JQ513601.1)	16	99,73
WWT (M34048.1)	12	100
(LR216196.1)	7;13	100

TABLEAU 14. Comparaison des séquences NCCR de BKPyV avec la librairie Genbank dans BLAST®.

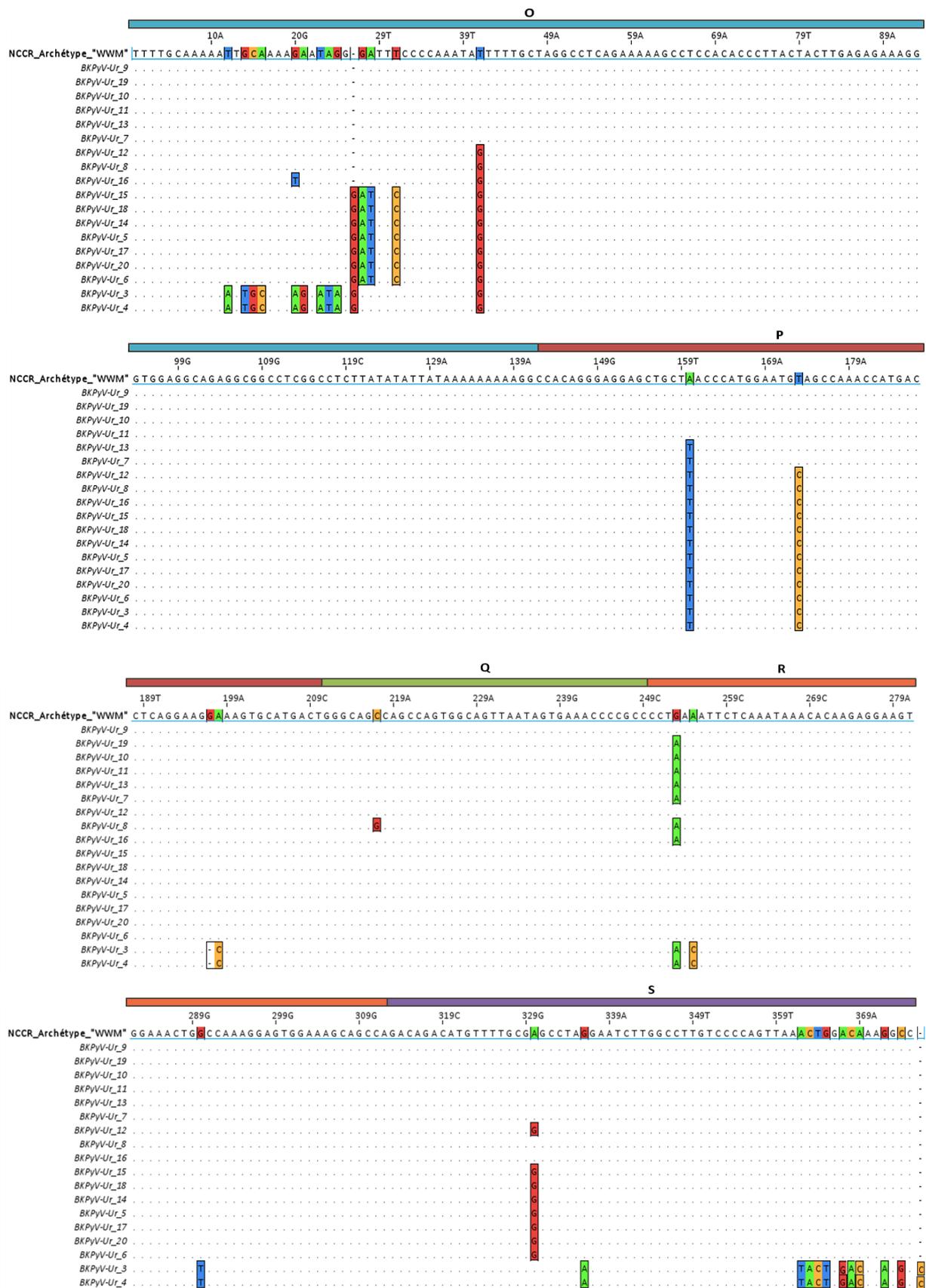


FIGURE 10. Alignement des séquences NCCR avec la NCCR archétype de référence.
 (.) : Nucléotide identique à celui de référence. (-) : gap. NCCR archétype. « WWM » : GenBank JQ513592.1.
 Séquences classées selon leur pourcentage d'homologie avec la séquence WWM.

2. Séquençage de la NCCR du BKPyV sur échantillons supplémentaires

Lorsqu'ils étaient disponibles, plusieurs échantillons ont été analysés pour un même patient. Au total, la NCCR du BKPyV de 12 échantillons supplémentaires a été séquencée (**Tableau 15.**).

Patients (#)	Séquençage NCCR BKPyV urines									Total
	J0	S1	S2	S3	S4	S5 ... S7	S8			
6	■		■							2
9	■			■						2
13	■				■	■		■		4
14	■		■							2
15	■						■			3
16	■		■							2
18	■	■								2
20	■		■		■					3

TABLEAU 15. Séquençage de la NCCR du BKPyV sur échantillons supplémentaires
 (■) : Échantillon initial (J0). (■) : Echantillon supplémentaire prélevé à semaine 1,2...x
 après analyse de l'échantillon initial

Pour tous les échantillons supplémentaires analysés, nous avons retrouvé une NCCR archétype de BKPyV. Un alignement des séquences initiales et supplémentaires a été effectué pour chaque patient. Par rapport aux séquences initiales, aucune mutation n'a été détectée sur les séquences supplémentaires (**Figure 11.**). La totalité des prélèvements analysés qu'ils soient initiaux ou après évolution de l'infection a donc mis en évidence une NCCR archétype de BKPyV.

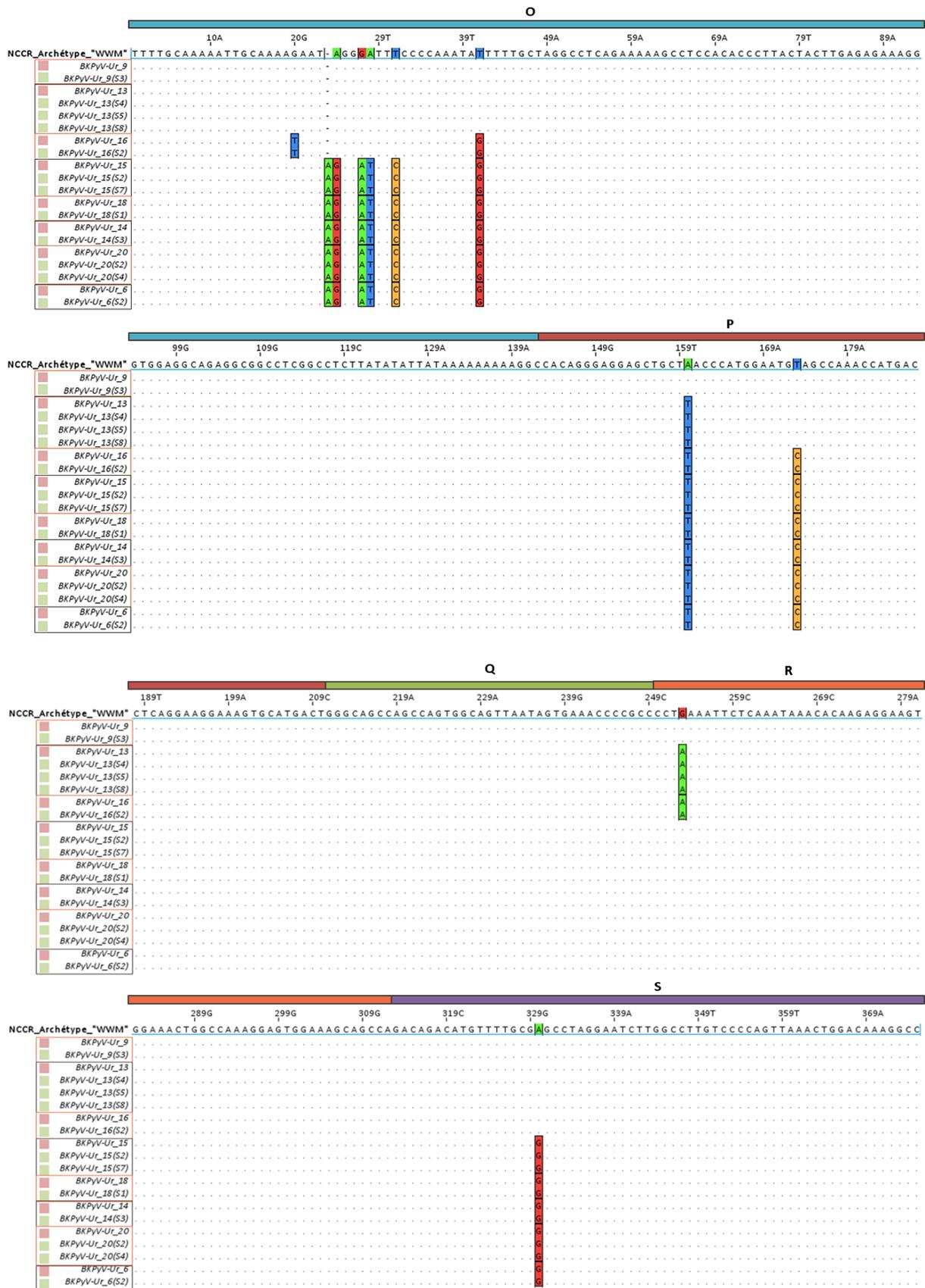


FIGURE 11. Alignement des séquences de NCCR de BKPvV supplémentaires.
 (.) : Nucléotide identique à celui de référence. (-): gap.
 (■) : Échantillon initial (J0). (■) : Echantillon supplémentaire (S1, 2...x).

3. Analyse des NCCR séquencées

En l'absence de détection de souches de BKPyV à NCCR réarrangée, la recherche dans notre étude, de caractéristiques spécifiques pouvant être en lien avec l'apparition de telles souches dans les urines des patients n'était pas applicable.

Les séquences archétypes de cette étude ont quant à elles font l'objet d'une analyse bio-informatique pour explorer le retentissement des différentes mutations sur la prédiction des TFBS. Un résumé de ces mutations et leur rapport avec les TFBS connus et putatifs de la NCCR du BKPyV est proposé ci-dessous (**Tableau 16.**).

Parmi les TFBS déjà étudiés, des mutations ont été retrouvées au sein de NF-1 (NF-1¹, NF-1² et NF-1³), SP-1 (SP-1⁴) et C/EBP α sur plusieurs de nos séquences NCCR. La prédiction de ces sites n'a pas été affectée pour les séquences mutées en comparaison avec la séquence archétype WWM. En revanche, d'autres mutations sur nos séquences pourraient conduire à l'inactivation ou l'apparition de TFBS putatifs (**Tableau 16.**).

NCCR	TFBS	Séquence WWM	Mutation	Incidence (n=)	Impact**
Bloc O	<i>Oct-1*</i> C/EBPα	⁹ AAAT <u>TG</u> CAAA ₁₈ ¹¹ AT <u>TGCA</u> AAAG ₂₀	¹² T > A ¹⁴ G > T ¹⁵ C > G ¹⁶ A > C	2 (11 %)	- <i>Oct-1*</i> X
	C/EBPα	¹¹ ATTGCAAAAG ₂₀	²⁰ G > T ²⁰ G > A	1 (5,5 %)	X
	?	?	²¹ A > G ²³ T > A ²⁴ A > T	2 (11 %)	X
	NFκB	²⁵ <u>GGGATT</u> ICCC ₃₄	²⁵ G > A ^{26_27} ins G ²⁷ G > A ²⁸ A > T ³¹ T > C	9 (50 %) 7 (39 %)	X
	<i>SRF*</i> <i>HOXA4*</i>	³⁴ CCAATATTT ₄₃ ³⁶ AAATA <u>TTTT</u> ₄₅	⁴¹ T > G	12 (66,5 %)	- <i>SRF/HOXA4*</i> + C/EBPα
Bloc P	?	?	¹⁶⁰ A > T	14 (78 %)	+ <i>Erg-1*</i>
	NF-1¹	¹⁷⁰ ATG <u>I</u> AGCCAA ₁₇₈	¹⁷³ T > C	12 (66,5 %)	X
	<i>IRF-1*/ISGF-3*</i>	¹⁹⁴ AAG <u>A</u> AGTGCA ₂₀₄	¹⁹⁷ del G ¹⁹⁸ A > C	2 (11 %)	+ <i>PU.1* / C/EBPδ*</i>
Bloc Q	NF-1² AP-2	²¹³ GCAG <u>C</u> AGCC ₂₂₂ ²⁰⁹ CTGGGCAG <u>C</u> ₂₁₈	²¹⁷ C > G	1 (5,5 %)	X
	SP-1⁴	²⁴⁴ CCCCCCT <u>G</u> ₂₅₃	²⁵³ G > A	9 (50 %)	X
Bloc R	?	?	²⁵⁵ A > C		X
	<i>C/EBPδ*</i> NF-1³	²⁸⁵ AACT <u>G</u> CCAA ₂₉₄ ²⁸⁸ TG <u>G</u> CCAAAGG ₂₉₇	²⁹⁰ G > T	2 (11 %)	- <i>C/EBP δ*</i>
Bloc S	?	?	³³⁰ A > G ³³⁶ G > A	8 (44,5 %)	X
	<i>ICSPB*</i>	³⁵⁵ CAGTTAA <u>ACT</u> ₃₆₄	³⁶² A > T ³⁶³ C > A ³⁶⁴ T > C		- <i>ICSPB*</i> + <i>HNF-1*</i>
	?	?	³⁶⁵ G > T ³⁶⁷ A > G	2 (11 %)	X
	NF-1^{6*}	³⁶⁸ <u>CAAAGGCC</u> AT ₃₇₇	³⁶⁸ C > A ³⁶⁹ A > C ³⁷² G > A ³⁷⁴ C > G ^{375_376} ins C		X

TABLEAU 16. Résumé des mutations de la NCCR. Conséquences sur les TFBS du BKPγV.
 (*) : TFBS putatif, non étudié chez le BKPγV. (**) : Impact des mutations sur la prédiction d'un TFBS.
 (X) : pas d'impact. (+) / (-) : Apparition / disparition du TFBS.

IV. Discussion

A l'échelle locale ce travail inédit a permis d'obtenir un aperçu de la conformation de la NCCR du BKPyV dans les urines chez 18 patients en situation de greffe de CSH. Ces souches de BKPyV possédaient toutes une NCCR archétype et étaient pour la plupart associées à une symptomatologie urinaire. Ce travail nous permet donc d'avancer que la réplication du BKPyV et la survenue d'une symptomatologie associée au BKPyV en contexte de greffe de CSH semble indépendante de l'apparition de souches de BKPyV à NCCR réarrangée dans les urines des patients.

Ce travail vient par ailleurs étoffer le faible nombre de données et de publications dont nous disposons sur la NCCR du BKPyV dans le cadre de la BKPyV-CH. Contrairement à nos résultats, 3 des 7 études traitant de ce sujet (120,121,154,206,219–221) ont détecté la présence de BKPyV à NCCR réarrangée chez une faible proportion de leurs patients. Cette situation semble toutefois marginale avec une incidence cumulée de 8,3 % (7/84 séquences analysées) dans les urines de patients greffés de CSH, et seulement de 3 % (1/33 séquences analysées) en considérant uniquement les patients atteints de cystite. Malgré un effectif limité de patients (n=8) présentant la triade diagnostique de la BKPyV-CH, nos observations rejoignent celles des autres auteurs ainsi que Sharma *et al.* qui concluent à l'absence d'association entre BKPyV-CH et NCCR réarrangée dans les urines dans leur revue de la littérature (186). Il est à noter que l'un de nos patients a présenté une réplication soutenue du BKPyV pendant plusieurs semaines sans que nous puissions mettre en évidence l'émergence de souches à NCCR réarrangée.

En accord avec d'autres travaux, cette étude a montré que les souches à NCCR archétype présentaient un polymorphisme de certains nucléotides. Des efforts ont été réalisés pour déterminer si certaines des mutations ponctuelles conféraient à la souche virale un pouvoir pathogène accru dans le cadre de la BKPyV-CH (120,121). Par exemple, Priftakis *et al.* ont montré que la mutation $_{246}^*C > G$ était localisée au sein du TFBS SP-1⁴ et significativement plus fréquente chez les patients atteints de BKPyV-CH (120). Cette mutation n'a été retrouvée dans aucune des séquences de notre étude. De leur côté, Carr *et al.* ont mis en évidence d'autres mutations ponctuelles dont $_{173}^*C > T$ et $_{217}^*C > G$ qui ont été décrites dans notre étude (*position selon la séquence de référence WWM). Ces mutations localisées au sein des TFBS NF-1 (NF-1¹ et NF-1²) et AP-2 mais n'ont pu être statistiquement associées à la survenue de BKPyV-CH.

D'autres mutations décrites dans notre étude étaient localisées au sein de séquences consensus des TFBS. L'analyse de ces mutations à l'aide du programme de

prédiction des TFBS Alibaba2.1 a retrouvé quelques différences de prédictions concernant essentiellement des TFBS putatifs et non encore étudiés chez le BKPyV. Les TFBS majeurs (NF-1, SP-1) dont l'activation est connue pour influencer le sens et l'intensité de transcription des gènes du BKPyV demeurent quant à eux conservés pour toutes les NCCR de cette étude. L'impact de ces mutations sur l'activité transcriptionnelle du BKPyV nécessiterait d'autres études qui confirmeraient d'une part l'existence de certains TFBS prédits par les algorithmes et évaluerait d'autre part leur influence sur la transcription des gènes viraux.

Par ailleurs une explication à quelques-unes des variations mineures de séquence a été avancée par Yogo *et al.* en 2008. A partir d'un travail comparatif entre génotype du BKPyV et séquençage de leur NCCR, les auteurs ont proposé une hypothèse « évolutionniste » de la NCCR. Tout comme les mutations observées dans les gènes VP1 et LTA_g du BKPyV, certaines mutations ponctuelles trouvées au sein des NCCR archétypes seraient spécifiques des différents génotypes du BKPyV et donc le témoin d'une évolution divergente de ces souches (160). Les auteurs ont ainsi proposé une séquence consensus NCCR pour chaque génotype connu de BKPyV. La position des mutations trouvées dans les séquences NCCR de notre étude concordent avec celle des mutations décrites dans les 145 NCCR analysées par Yogo *et al.* (à l'exception du bloc O, non décrit dans son intégralité). Il est intéressant de noter que la position des mutations retrouvées dans la NCCR était également identique dans une autre étude chez des patients atteints de BKVN (214). En revanche, malgré des similitudes, les données présentées dans la revue de la littérature par Moens *et al.* montrent une plus grande variété des nucléotides concernés par des mutations ponctuelles au sein des NCCR archétypes (163). De plus, sur 18 séquences il n'a pas été possible d'apparier 5 de nos séquences avec les séquences consensus NCCR proposées pour chaque génotype dans l'article de Yogo *et al.* Ensemble, ces éléments suggèrent qu'il existerait au sein de chaque génotype de BKPyV un polymorphisme nucléotidique de la NCCR et donc que toute ou partie des mutations observées ne serait peut-être pas en lien avec l'évolution du virus. Il pourrait toutefois être intéressant de réaliser un génotypage des souches virales de notre étude afin de vérifier cette hypothèse.

En ce qui concerne notre méthode de séquençage de la région NCCR, elle s'est avérée performante, avec plus de 93% de réussite (30/32) à partir d'échantillons d'urine fortement positifs pour le BKPyV. Cette technique est actuellement non pertinente dans la prise en charge de l'infection à BKPyV mais présente néanmoins un intérêt théorique et pourrait nous permettre d'initier d'autres travaux afin d'élargir nos connaissances sur la NCCR du BKPyV dans d'autres situations cliniques (greffe rénale, cancers...). De plus, il serait intéressant d'évaluer le rendement de notre méthode à partir d'échantillons de

nature différente dont la charge est souvent peu importante en cas d'infection à BKPyV. Cela nous permettrait notamment de comparer la NCCR du BKPyV d'un site donné avec la NCCR du BKPyV responsable de l'infection des voies urinaires afin de vérifier s'il existe un effet de compartiment comme l'ont suggéré certains auteurs. Cette compartimentation permettrait aux copies d'une même souche virale de répliquer dans des conditions indépendantes de celles d'un autre site anatomique, générant ainsi ses propres variants. Une récente étude ayant analysé en parallèle les urines et le plasma de patients transplantés rénaux contredit cette hypothèse. Elle n'a pas retrouvé de différence entre les séquences NCCR du BKPyV au sein de ces deux compartiments (214).

La principale limite de notre étude est un effectif insuffisant avec, de surcroît, une présentation clinique hétérogène de l'infection à BKPyV chez les patients, allant de formes asymptomatiques jusqu'à la BKPyV-CH. Face à la faible incidence rapportée de NCCR réarrangées dans les urines de patients en situation de greffe de CSH, il aurait été intéressant d'inclure un effectif plus large afin de pouvoir mettre en évidence des réarrangements et les caractériser.

Avec l'analyse de plusieurs échantillons par patient, nous souhaitons déterminer si l'apparition de BKPyV à NCCR réarrangée était en lien avec réplication intense prolongée du virus dans le système urinaire d'un même patient. L'inclusion de 12 échantillons supplémentaires ne nous a pas permis de mettre en évidence des souches à NCCR réarrangée. Malheureusement, le nombre d'échantillons supplémentaires disponible par patient était disparate et souvent prélevés à des instants différents dans la course de l'infection, ce qui limite l'interprétation de nos résultats.

Afin d'augmenter la robustesse de la prédiction *in silico* des TFBS dans cette étude, nos résultats auraient peut-être dû être confrontés à des outils bio-informatiques de prédiction supplémentaires qui s'appuient sur d'autres algorithmes et bases de données de facteurs de transcription. Une synthèse de cette analyse comparative aurait ainsi pu améliorer pertinence de nos prédictions.

Le séquençage par la méthode Sanger utilisée dans notre étude pourrait également apparaître comme une limite technique car elle est peu sensible, ne rendant compte que de la souche majoritaire au sein de l'échantillon. Au contraire, l'utilisation de la NGS aurait pu nous permettre de déterminer si un ou plusieurs BKPyV à NCCR réarrangée étaient présents au sein de la population de BKPyV à NCCR archétype et d'étudier le cas échéant leur structure et leur dynamique d'apparition dans le temps. De telles données peuvent s'avérer précieuses pour comprendre les mécanismes et dans quelles conditions les réarrangements de la NCCR peuvent survenir. En revanche, il est

peu probable que la détection de ces variants minoritaires soit pertinente cliniquement tant qu'ils ne représentent pas une proportion significative des virus isolés chez le patient. La capacité d'un variant à se maintenir ou à croître au sein d'une population virale constitue un indicateur soit d'une pression de sélection (par exemple médicamenteuse) en faveur de ce dernier, soit d'un meilleur « fitness » (capacité répliquative) par rapport à la souche initiale. Le séquençage par la méthode Sanger, par son défaut de sensibilité, présente *in fine* l'avantage de révéler les séquences des souches virales les plus aptes à répliquer et par conséquent à entraîner une pathologie liée au BKPyV.

V. Conclusion

Tout comme les autres polyomavirus, le BKPyV est un virus peu étudié en comparaison avec les autres virus impliqués en pathologie humaine. Depuis sa découverte, la mobilisation scientifique a toutefois permis de mieux comprendre le cycle biologique du BKPyV, sa pathogénicité et d'optimiser les prises en charges des patients dans la limite des ressources thérapeutiques dont nous disposons à ce jour.

Ce travail met en avant quelques points importants concernant la réplication du BKPyV chez les patients d'hématologie greffés de CSH. La détection de NCCR réarrangées dans le cadre d'une infection liée au BKPyV et la BKPyV-CH semble un évènement rare puisqu'aucune souche réarrangée n'a été détectée sur nos 32 échantillons. De plus les NCCR réarrangées ne semblent pas associées à l'apparition d'une symptomatologie liée au BKPyV. Enfin, il existe des variations mineures de séquences entre les NCCR archétypes des différentes souches de notre étude dont l'origine et la signification restent à déterminer.

La NCCR est un élément clé du génome du BKPyV, remarquable par sa plasticité, qui régule la transcription de ses gènes et sa réplication. Sa propension à se présenter sous forme réarrangée *in vitro* et *in vivo* a fait l'objet d'investigations pour tenter d'éclaircir la signification et les éléments déclencheurs d'une telle configuration. Les observations *in vitro* en faveur d'une pathogénicité accrue et d'un pouvoir transformant des souches de BKPyV à NCCR réarrangée en font un champ d'investigation stimulant qui peine à trouver des réponses claires en pathologie humaine. Une mobilisation plus soutenue reste donc à mettre en œuvre pour collecter davantage de données qui offriront l'opportunité de lever ces incertitudes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Moens U, Calvignac-Spencer S, Lauber C, Ramqvist T, Feltkamp MCW, Daugherty MD, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J Gen Virol.* juin 2017;98(6):1159-60.
2. Kilham L. Isolation in suckling mice of a virus from C3H mice harboring Bittner milk agent. *Science.* 10 oct 1952;116(3015):391-2.
3. Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* juin 1953;83(2):414-21.
4. Morgan GJ. Ludwik Gross, Sarah Stewart, and the 1950s discoveries of Gross murine leukemia virus and polyoma virus. *Stud Hist Philos Sci Part C Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 1 déc 2014;48:200-9.
5. Rotondo JC, Mazzoni E, Bononi I, Tognon M, Martini F. Association Between Simian Virus 40 and Human Tumors. *Front Oncol.* 2019;9.
6. Gardner SylviaD, Field AnneM, Coleman DulcieV, Hulme B. NEW HUMAN PAPOVAVIRUS (B.K.) ISOLATED FROM URINE AFTER RENAL TRANSPLANTATION. *The Lancet.* juin 1971;297(7712):1253-7.
7. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet Lond Engl.* 19 juin 1971;1(7712):1257-60.
8. Feltkamp MCW, Kazem S, van der Meijden E, Lauber C, Gorbalenya AE. From Stockholm to Malawi: recent developments in studying human polyomaviruses. *J Gen Virol.* mars 2013;94(Pt 3):482-96.
9. Gheit T, Dutta S, Oliver J, Robitaille A, Hampras S, Combes J-D, et al. Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus. *Virology.* 2017;506:45-54.
10. Nicol JTJ, Leblond V, Arnold F, Guerra G, Mazzoni E, Tognon M, et al. Seroprevalence of Human Malawi Polyomavirus. *J Clin Microbiol.* 1 janv 2014;52(1):321-3.
11. Berrios C, Jung J, Primi B, Wang M, Pedamallu C, Duke F, et al. Malawi Polyomavirus Is a Prevalent Human Virus That Interacts with Known Tumor Suppressors. *J Virol.* 1 janv 2015;89(1):857-62.
12. Lim ES, Meinerz NM, Primi B, Wang D, Garcea RL. Common Exposure to STL Polyomavirus During Childhood. *Emerg Infect Dis.* sept 2014;20(9):1559-61.
13. Gaboriaud P, Ferté M, Arnold F, Leblond V, Nicol J, Debare H, et al. Age-specific seroprevalence of human polyomavirus 12 and Saint Louis and New Jersey polyomaviruses. *Emerg Microbes Infect.* déc 2018;7(1):1-5.
14. Foulogne Vincent, Morgane Solis, Fafi-Kremer Samira. Polyomavirus. In: *Traité de Virologie Médicale : Société Française de Microbiologie Ed ; 2019.* p. 331-8.
15. Hurdiss DL, Morgan EL, Thompson RF, Prescott EL, Panou MM, Macdonald A, et al. New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Struct England* 1993. 5 avr 2016;24(4):528-36.

16. Cubitt CL. Molecular genetics of the BK virus. *Adv Exp Med Biol.* 2006;577:85-95.
17. 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.* mai 2009;90(Pt 5):1238-45.
18. Rinaldo CH, Traavik T, Hey A. The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *J Virol.* juill 1998;72(7):6233-6.
19. Leuenberger D, Andresen PA, Gosert R, Binggeli S, Ström EH, Bodaghi S, et al. Human Polyomavirus Type 1 (BK Virus) Agnoprotein Is Abundantly Expressed but Immunologically Ignored. *Clin Vaccine Immunol CVI.* août 2007;14(8):959-68.
20. Gerits N, Moens U. Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology.* 25 oct 2012;432(2):316-26.
21. Khalili K, White MK, Sawa H, Nagashima K, Safak M. The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. *J Cell Physiol.* juill 2005;204(1):1-7.
22. Seo GJ, Fink LHL, O'Hara B, Atwood WJ, Sullivan CS. Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J Virol.* oct 2008;82(20):9823-8.
23. Helle F, Brochot E, Handala L, Martin E, Castelain S, Francois C, et al. Biology of the BKPyV: An Update. *Viruses.* 03 2017;9(11).
24. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DWG, et al. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol.* 2003;71(1):115-23.
25. Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *J Gen Virol.* juin 2003;84(Pt 6):1499-504.
26. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog.* mars 2009;5(3):e1000363.
27. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* oct 2003;3(10):611-23.
28. Chesters PM, Heritage J, McCance DJ. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis.* avr 1983;147(4):676-84.
29. Doerries K. Human Polyomavirus JC and BK Persistent Infection. In: Ahsan N, éditeur. *Polyomaviruses and Human Diseases [Internet].* New York, NY: Springer; 2006.p. 102-16. (Advances in Experimental Medicine and Biology).
30. Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol.* 1982;10(2):91-9.
31. Brown DW, Gardner SD, Gibson PE, Field AM. BK virus specific IgM responses in cord sera, young children and healthy adults detected by RIA. *Arch Virol.* 1984;82(3-4):149-60.
32. Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the Epidemiologic Patterns of Polyomaviruses in Human Populations by Studying Their Presence in Urban Sewage. *Appl Environ Microbiol.* 1 janv 2000;66(1):238-45.
33. 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.* nov 2001;75(21):10290-9.

34. Wong ASY, Cheng VCC, Yuen K-Y, Kwong Y-L, Leung AYH. High frequency of polyoma BK virus shedding in the gastrointestinal tract after hematopoietic stem cell transplantation: a prospective and quantitative analysis. *Bone Marrow Transplant.* janv 2009;43(1):43-7.
35. Vanchiere JA, Nicome RK, Greer JM, Demmler GJ, Butel JS. Frequent detection of polyomaviruses in stool samples from hospitalized children. *J Infect Dis.* 15 août 2005;192(4):658-64.
36. Vanchiere JA, Abudayyeh S, Copeland CM, Lu LB, Graham DY, Butel JS. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. *J Clin Microbiol.* août 2009;47(8):2388-91.
37. Vanchiere JA, Carillo B, Morrow AL, Jiang X, Ruiz-Palacios GM, Butel JS. Fecal Polyomavirus Excretion in Infancy. *J Pediatr Infect Dis Soc.* juin 2016;5(2):210-3.
38. Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP. Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* juill 2009;45(3):249-54.
39. Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Cocca N, Zaffaroni M, et al. Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in humans. *J Gen Virol.* mai 2011;92(Pt 5):1044-50.
40. Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, et al. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol.* août 2000;81(Pt 8):1967-73.
41. Shah KV. Human polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* juin 2000;15(6):754-5.
42. Zambrano A, Kalantari M, Simoneau A, Jensen JL, Villarreal LP. Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *The Prostate.* 1 déc 2002;53(4):263-76.
43. Dörries K. Latent and Persistent Polyomavirus Infection. In: *Human Polyomaviruses.* John Wiley & Sons, Ltd; 2002. p. 197-235.
44. Knowles WA. The Epidemiology of BK Virus and the Occurrence of Antigenic and Genomic Subtypes. In: *Human Polyomaviruses.* John Wiley & Sons, Ltd; 2002. p. 527-59.
45. Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewley JP. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *J Med Virol.* janv 1993;39(1):50-6.
46. Morel V, Martin E, François C, Helle F, Faucher J, Mourez T, et al. A Simple and Reliable Strategy for BK Virus Subtyping and Subgrouping. Tang Y-W, éditeur. *J Clin Microbiol.* avr 2017;55(4):1177-85.
47. Luo C, Bueno M, Kant J, Martinson J, Randhawa P. Genotyping schemes for polyomavirus BK, using gene-specific phylogenetic trees and single nucleotide polymorphism analysis. *J Virol.* mars 2009;83(5):2285-97.
48. Luo C, Hirsch HH, Kant J, Randhawa P. VP-1 quasispecies in human infection with polyomavirus BK. *J Med Virol.* janv 2012;84(1):152-61.
49. Gard L, Niesters HGM, Riezebos-Brilman A. A real time genotyping PCR assay for polyomavirus BK. *J Virol Methods.* 1 sept 2015;221:51-6.

50. Nukuzuma S, Takasaka T, Zheng H-Y, Zhong S, Chen Q, Tadaichi Kitamura, et al. Subtype I BK polyomavirus strains grow more efficiently in human renal epithelial cells than subtype IV strains. *J Gen Virol.* juill 2006;87(Pt 7):1893-901.
51. Wunderink HF, De Brouwer CS, Gard L, De Fijter JW, Kroes ACM, Rotmans JI, et al. Source and Relevance of the BK Polyomavirus Genotype for Infection After Kidney Transplantation. *Open Forum Infect Dis.* mars 2019;6(3):ofz078.
52. Boukoum H, Nahdi I, Sahtout W, Skhiri H, Segondy M, Aouni M. BK polyomavirus genotypes and nephropathy: is there a relationship? *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* avr 2016;18(2):309-11.
53. Zheng H-Y, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, et al. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect.* févr 2007;9(2):204-13.
54. Marshall WF, Telenti A, Proper J, Aksamit AJ, Smith TF. Rapid detection of polyomavirus BK by a shell vial cell culture assay. *J Clin Microbiol.* juill 1990;28(7):1613-5.
55. Bennett SM, Jiang M, Imperiale MJ. Role of cell-type-specific endoplasmic reticulum-associated degradation in polyomavirus trafficking. *J Virol.* août 2013;87(16):8843-52.
56. Seehafer J, Salmi A, Scraba DG, Colter JS. A comparative study of BK and polyoma viruses. *Virology.* juill 1975;66(1):192-205.
57. Low J, Humes HD, Szczypka M, Imperiale M. BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro. *Virology.* 1 juin 2004;323(2):182-8.
58. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of Gangliosides GD1b and GT1b as Receptors for BK Virus. *J Virol.* févr 2006;80(3):1361-6.
59. Neu U, Allen SA, Blaum BS, Liu Y, Frank M, Palma AS, et al. A Structure-Guided Mutation in the Major Capsid Protein Retargets BK Polyomavirus. *PLoS Pathog.* 10 oct 2013;9(10).
60. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *J Virol.* nov 2005;79(22):14442-5.
61. Eash S, Querbes W, Atwood WJ. Infection of Vero Cells by BK Virus Is Dependent on Caveolae. *J Virol.* nov 2004;78(21):11583-90.
62. 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.* août 2007;81(16):8552-62.
63. Zhao L, Marciano AT, Rivet CR, Imperiale MJ. Caveolin- and Clathrin-Independent Entry of BKPyV into Primary Human Proximal Tubule Epithelial Cells. *Virology.* mai 2016;492:66-72.
64. Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early Events during BK Virus Entry and Disassembly. *J Virol.* févr 2009;83(3):1350-8.
65. Moriyama T, Sorokin A. Intracellular trafficking pathway of BK virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology.* 20 févr 2008;371(2):336-49.
66. Bennett SM, Zhao L, Bosard C, Imperiale MJ. Role of a nuclear localization signal on the minor capsid proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. *Virology.* 1 janv 2015;474:110-6.

67. Tikhanovich I, Nasheuer HP. Host-Specific Replication of BK Virus DNA in Mouse Cell Extracts Is Independently Controlled by DNA Polymerase α -Primase and Inhibitory Activities. *J Virol.* juill 2010;84(13):6636-44.
68. Tikhanovich I, Liang B, Seoighe C, Folk W, Nasheuer H. Inhibition of Human BK Polyomavirus Replication by Small Noncoding RNAs. *J Virol.* 1 juill 2011;85:6930-40.
69. Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Global effects of BKV infection on gene expression in human primary kidney epithelial cells. *Virology.* 5 févr 2010;397(1):73-9.
70. Jiang M, Zhao L, Gamez M, Imperiale MJ. Roles of ATM and ATR-Mediated DNA Damage Responses during Lytic BK Polyomavirus Infection. *PLoS Pathog.* 30 août 2012;8(8).
71. Jiang M, Entezami P, Gamez M, Stamminger T, Imperiale MJ. Functional reorganization of promyelocytic leukemia nuclear bodies during BK virus infection. *mBio.* 2011;2(1):e00281-00210.
72. Teunissen EA, de Raad M, Mastrobattista E. Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. *J Controlled Release.* 28 nov 2013;172(1):305-21.
73. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, Cubitt CL, Ramos E. BK Polyoma Virus Allograft Nephropathy: Ultrastructural Features from Viral Cell Entry to Lysis. *Am J Transplant.* 2003;3(11):1383-92.
74. Henriksen S, Hansen T, Bruun J-A, Rinaldo CH. The Presumed Polyomavirus Viroporin VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release. *Banks L, éditeur. J Virol.* 15 nov 2016;90(22):10398-413.
75. Evans GL, Caller LG, Foster V, Crump CM. Anion homeostasis is important for non-lytic release of BK polyomavirus from infected cells. *Open Biol.* 5 août 2015;5(8).
76. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature.* juin 2005;435(7042):682-6.
77. Bauman Y, Nachmani D, Vitenshtein A, Tsukerman P, Drayman N, Stern-Ginossar N, et al. An Identical miRNA of the Human JC and BK Polyoma Viruses Targets the Stress-Induced Ligand ULBP3 to Escape Immune Elimination. *Cell Host Microbe.* 17 févr 2011;9(2):93-102.
78. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(2):503-28.
79. Das D, Shah RB, Imperiale MJ. Detection and expression of human BK virus sequences in neoplastic prostate tissues. *Oncogene.* 16 sept 2004;23(42):7031-46.
80. Delbue S, Ferrante P, Provenzano M. Polyomavirus BK and prostate cancer: an unworthy scientific effort? *Oncoscience.* 2014;1(4):296-303.
81. O'Reilly RJ, Lee FK, Grossbard E, Kapoor N, Kirkpatrick D, Dinsmore R, et al. Papovavirus excretion following marrow transplantation: incidence and association with hepatic dysfunction. *Transplant Proc.* mars 1981;13(1 Pt 1):262-6.
82. Vallbracht A, Löhler J, Gossmann J, Glück T, Petersen D, Gerth HJ, et al. Disseminated BK type polyomavirus infection in an AIDS patient associated with central nervous system disease. *Am J Pathol.* juill 1993;143(1):29-39.

83. Petrogiannis-Halioitis T, Sakoulas G, Kirby J, Koralnik IJ, Dvorak AM, Monahan-Earley R, et al. BK-Related Polyomavirus Vasculopathy in a Renal-Transplant Recipient. Massachusetts Medical Society; 2009.
84. Hedquist BG, Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Nennesmo I, Sundelin B, et al. Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology*. janv 1999;106(1):129-32.
85. Binet I, Nিকেleit V, Hirsch HH, Prince O, Dalquen P, Gudat F, et al. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation*. 27 mars 1999;67(6):918-22.
86. Nিকেleit V, Hirsch HH, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, et al. Polyomavirus Infection of Renal Allograft Recipients: From Latent Infection to Manifest Disease. *J Am Soc Nephrol*. 1 mai 1999;10(5):1080-9.
87. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. sept 2019;33(9):e13528.
88. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, Shapiro R, Vivas C, Jordan M, et al. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation*. 15 janv 1999;67(1):103-9.
89. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*. 15 août 2002;347(7):488-96.
90. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*. 27 mai 2005;79(10):1277-86.
91. Hirsch HH, Randhawa P, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. mars 2013;13 Suppl 4:179-88.
92. Shah A, Kumar V, Palmer MB, Trofe-Clark J, Laskin B, Sawinski D, et al. Native kidney BK virus nephropathy, a systematic review. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. août 2019;21(4):e13083.
93. Thomas A, Dropulic LK, Rahman MH, Geetha D. Ureteral stents: a novel risk factor for polyomavirus nephropathy. *Transplantation*. 15 août 2007;84(3):433-6.
94. Hashim F, Rehman S, Gregg JA, Dharnidharka VR. Ureteral Stent Placement Increases the Risk for Developing BK Viremia after Kidney Transplantation. *J Transplant*. 2014;2014:459747.
95. Maliakkal JG, Brennan DC, Goss C, Horwedel TA, Chen H, Fong DK, et al. Ureteral stent placement and immediate graft function are associated with increased risk of BK viremia in the first year after kidney transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. févr 2017;30(2):153-61.
96. Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Schnitzler MA, Major EO, et al. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. sept 2005;5(9):2213-21.

97. Schmitt C, Raggub L, Linnenweber-Held S, Adams O, Schwarz A, Heim A. Donor origin of BKV replication after kidney transplantation. *J Clin Virol.* févr 2014;59(2):120-5.
98. Schwarz A, Linnenweber-Held S, Heim A, Framke T, Haller H, Schmitt C. Viral Origin, Clinical Course, and Renal Outcomes in Patients With BK Virus Infection After Living-Donor Renal Transplantation. *Transplantation.* avr 2016;100(4):844-53.
99. Velay A, Porcher R, Domingo-Calap P, Soulier E, Joly M, Meddeb M, et al. Neutralizing Antibody-Mediated Response and Risk of BK Virus-Associated Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* janv 2018;29(1):326-34.
100. Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA, Stoner GL, Ryschkewitsch CF, Randhawa P. Molecular genotyping of BK and JC viruses in human polyomavirus-associated interstitial nephritis after renal transplantation. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* août 2001;38(2):354-65.
101. Varella RB, Zalona ACJ, Diaz NC, Zalis MG, Santoro-Lopes G. BK polyomavirus genotypes Ia and Ib1 exhibit different biological properties in renal transplant recipients. *Virus Res.* 02 2018;243:65-8.
102. Demey B, Tinez C, François C, Helle F, Choukroun G, Duverlie G, et al. Risk factors for BK virus viremia and nephropathy after kidney transplantation: A systematic review. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2018;109:6-12.
103. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, Wali R, Crowder C, Nogueira J, et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* déc 2004;4(12):2082-92.
104. Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, Griffin MD, Thomsen KM, Harmsen WS, et al. Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation.* 15 août 2007;84(3):340-5.
105. Pollara CP, Corbellini S, Chiappini S, Sandrini S, De Tomasi D, Bonfanti C, et al. Quantitative viral load measurement for BKV infection in renal transplant recipients as a predictive tool for BKVAN. *New Microbiol.* avr 2011;34(2):165-71.
106. Bicalho CS, Oliveira RDR, David DR, Fink MCDS, Agena F, Castro MC, et al. Determination of viremia cut-off for risk to develop BKPyV-associated nephropathy among kidney transplant recipients. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* oct 2018;20(5):e12969.
107. Cesaro S, Dalianis T, Hanssen Rinaldo C, Koskenvuo M, Pegoraro A, Einsele H, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 1 janv 2018;73(1):12-21.
108. Arthur RR, Shah KV, Baust SJ, Santos GW, Saral R. Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N Engl J Med.* 24 juill 1986;315(4):230-4.
109. Apperley JF, Rice SJ, Bishop JA, Chia YC, Krausz T, Gardner SD, et al. Late-onset hemorrhagic cystitis associated with urinary excretion of polyomaviruses after bone marrow transplantation. *Transplantation.* janv 1987;43(1):108-12.
110. Bogdanovic G, Priftakis P, Taemmeraes B, Gustafsson A, Flaegstad T, Winiarski J, et al. Primary BK virus (BKV) infection due to possible BKV transmission during bone

- marrow transplantation is not the major cause of hemorrhagic cystitis in transplanted children. *Pediatr Transplant*. nov 1998;2(4):288-93.
111. Binet I, Nিকেleit V, Hirsch HH. Polyomavirus infections in transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant*. sept 2000;5(3):210–216.
 112. Azzi A, Cesaro S, Laszlo D, Zakrzewska K, Ciappi S, De Santis R, et al. Human polyomavirus BK (BKV) load and haemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation patients. *J Clin Virol*. 1 oct 1999;14(2):79-86.
 113. Cesaro S, Brugiolo A, Faraci M, Uderzo C, Rondelli R, Favre C, et al. Incidence and treatment of hemorrhagic cystitis in children given hematopoietic stem cell transplantation: a survey from the Italian association of pediatric hematology oncology-bone marrow transplantation group. *Bone Marrow Transplant*. nov 2003;32(9):925-31.
 114. Erard V, Storer B, Corey L, Nollkamper J, Huang M-L, Limaye A, et al. BK virus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients: frequency, risk factors, and association with postengraftment hemorrhagic cystitis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 déc 2004;39(12):1861-5.
 115. Koskenvuo M, Dumoulin A, Lautenschlager I, Auvinen E, Mannonen L, Anttila V-J, et al. BK polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis among pediatric allogeneic bone marrow transplant recipients: treatment response and evidence for nosocomial transmission. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. janv 2013;56(1):77-81.
 116. Gilis L, Morisset S, Billaud G, Ducastelle-Leprêtre S, Labussière-Wallet H, Nicolini F-E, et al. High burden of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. mai 2014;49(5):664-70.
 117. Cesaro S, Tridello G, Pillon M, Calore E, Abate D, Tumino M, et al. A Prospective Study on the Predictive Value of Plasma BK Virus-DNA Load for Hemorrhagic Cystitis in Pediatric Patients After Stem Cell Transplantation. *J Pediatr Infect Dis Soc*. juin 2015;4(2):134-42.
 118. Lunde LE, Dasaraju S, Cao Q, Cohn CS, Reding M, Bejanyan N, et al. HEMORRHAGIC CYSTITIS AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION: RISK FACTORS, GRAFT SOURCE, AND SURVIVAL. *Bone Marrow Transplant*. nov 2015;50(11):1432-7.
 119. Kerbauy LN, Kerbauy MN, Bautzer V, Chapchap EC, de Mattos VRP, da Rocha JDA, et al. Severe hemorrhagic cystitis caused by the BK polyomavirus is associated with decreased survival post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. oct 2019;21(5):e13101.
 120. Priftakis P, Bogdanovic G, Kalantari M, Dalianis T. Overrepresentation of point mutations in the Sp1 site of the non-coding control region of BK virus in bone marrow transplanted patients with haemorrhagic cystitis. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. avr 2001;21(1):1-7.
 121. Carr MJ, McCormack GP, Mutton KJ, Crowley B. Unique BK virus non-coding control region (NCCR) variants in hematopoietic stem cell transplant recipients with and without hemorrhagic cystitis. *J Med Virol*. avr 2006;78(4):485-93.

122. Johnston O, Jaswal D, Gill JS, Doucette S, Fergusson DA, Knoll GA. Treatment of polyomavirus infection in kidney transplant recipients: a systematic review. *Transplantation*. 15 mai 2010;89(9):1057-70.
123. Li Y-J, Weng C-H, Lai W-C, Wu H-H, Chen Y-C, Hung C-C, et al. A suppressive effect of cyclosporine A on replication and noncoding control region activation of polyomavirus BK virus. *Transplantation*. 15 févr 2010;89(3):299-306.
124. Hirsch HH, Yakhontova K, Lu M, Manzetti J. BK Polyomavirus Replication in Renal Tubular Epithelial Cells Is Inhibited by Sirolimus, but Activated by Tacrolimus Through a Pathway Involving FKBP-12. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. mars 2016;16(3):821-32.
125. Mallat SG, Tanios BY, Itani HS, Lotfi T, McMullan C, Gabardi S, et al. CMV and BKPyV Infections in Renal Transplant Recipients Receiving an mTOR Inhibitor–Based Regimen Versus a CNI-Based Regimen: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 7 août 2017;12(8):1321-36.
126. Ferrazzi E, Peracchi M, Biasolo M-A, Faggionato O, Stefanelli S, Palu' G. Antiviral activity of gyrase inhibitors norfloxacin, coumermycin A1 and nalidixic acid. 1988.
127. Ali S, Chandraker A, DeCaprio J. Inhibition of Simian virus 40 large T antigen helicase activity by fluoroquinolones. *Antivir Ther*. 1 févr 2007;12:1-6.
128. Sharma BN, Li R, Bernhoff E, Gutteberg TJ, Rinaldo CH. Fluoroquinolones inhibit human polyomavirus BK (BKV) replication in primary human kidney cells. *Antiviral Res*. 1 oct 2011;92(1):115-23.
129. Knoll GA, Humar A, Fergusson D, Johnston O, House AA, Kim SJ, et al. Levofloxacin for BK Virus Prophylaxis Following Kidney Transplantation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 26 nov 2014;312(20):2106-14.
130. Miller AN, Glode A, Hogan KR, Schaub C, Kramer C, Stuart RK, et al. Efficacy and safety of ciprofloxacin for prophylaxis of polyomavirus BK virus-associated hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. août 2011;17(8):1176-81.
131. Leung AYH, Chan MTL, Yuen K-Y, Cheng VCC, Chan K-H, Wong CLP, et al. Ciprofloxacin Decreased Polyoma BK Virus Load in Patients Who Underwent Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis*. 15 févr 2005;40(4):528-37.
132. Phipps C, Ng HY, Appan P, Loh Y, Koh M, Ho AYL, et al. BK-virus prophylaxis: still no answer. *Bone Marrow Transplant*. oct 2013;48(10):1362-3.
133. 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):1413-22.
134. Randhawa P, Farasati NA, Shapiro R, Hostetler KY. Ether Lipid Ester Derivatives of Cidofovir Inhibit Polyomavirus BK Replication In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2006;50(4):1564-6.
135. Rinaldo CH, Gosert R, Bernhoff E, Finstad S, Hirsch HH. 1-O-Hexadecyloxypropyl Cidofovir (CMX001) Effectively Inhibits Polyomavirus BK Replication in Primary

- Human Renal Tubular Epithelial Cells. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2010;54(11):4714-22.
136. Tylden GD, Hirsch HH, Rinaldo CH. Brincidofovir (CMX001) Inhibits BK Polyomavirus Replication in Primary Human Urothelial Cells. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2015;59(6):3306-16.
 137. Farasati NA, Shapiro R, Vats A, Randhawa P. Effect of Leflunomide and Cidofovir on Replication of BK Virus in an In Vitro Culture System. *Transplantation.* janv 2005;79(1):116–118.
 138. Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, Tzannou I, Liu H, Martinez C, et al. Activity of broad-spectrum T-cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med.* 25 juin 2014;6(242):242ra83.
 139. Takemoto KK, Rabson AS, Mullarkey MF, Blaese RM, Garon CF, Nelson D. Isolation of papovavirus from brain tumor and urine of a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Natl Cancer Inst.* nov 1974;53(5):1205-7.
 140. Howley PM, Khoury G, Byrne JC, Takemoto KK, Martin MA. Physical map of the BK virus genome. *J Virol.* 1975;16(4):959-73.
 141. Seif I, Khoury G, Dhar R. The genome of human papovavirus BKV. *Cell.* 1 déc 1979;18(4):963-77.
 142. Yang RC, Wu R. BK virus DNA: complete nucleotide sequence of a human tumor virus. *Science.* 26 oct 1979;206(4417):456-62.
 143. Yang RC, Wu R. Comparative study of papovavirus DNA: BKV(MM), BKV(WT) and SV40. *Nucleic Acids Res.* 10 oct 1979;7(3):651-68.
 144. Watanabe S, Yoshiike K. Change of DNA near the Origin of Replication Enhances the Transforming Capacity of Human Papovavirus BK. *J VIROL.* 1982;42:8.
 145. O'Neill FJ, Carroll D. Amplification of papovavirus defectives during serial low multiplicity infections. *Virology.* 30 juill 1981;112(2):800-3.
 146. Watanabe S, Yoshiike K. Evolutionary Changes of Transcriptional Control Region in a Minute-Plaque Viable Deletion Mutant of BK Virus. *J VIROL.* 1986;59:7.
 147. Chauhan S, Lecatsas G, Harley EH. Genome analysis of BK (WW) viral DNA cloned directly from human urine. *Intervirology.* 1984;22(3):170-6.
 148. Mew RT, Lecatsas G, Prozesky OW, Harley EH. Characteristics of BK Papovavirus DNA Prepared Directly from Human Urine. *Intervirology.* 1981;16(1):14-9.
 149. Rubinstein R, Pare N, Harley EH. Structure and function of the transcriptional control region of nonpassaged BK virus. *J Virol.* mai 1987;61(5):1747-50.
 150. ter Schegget J, Sol CJ, Baan EW, van der Noordaa J, van Ormondt H. Naturally occurring BK virus variants (JL and Dik) with deletions in the putative early enhancer-promoter sequences. *J Virol.* janv 1985;53(1):302-5.
 151. Tavis JE, Walker DL, Gardner SD, Frisque RJ. Nucleotide sequence of the human polyomavirus AS virus, an antigenic variant of BK virus. *J Virol.* févr 1989;63(2):901-11.
 152. Rubinstein R, Harley EH. BK virus DNA cloned directly from human urine confirms an archetypal structure for the transcriptional control region. *Virus Genes.* mars 1989;2(2):157-65.

153. Rubinstein R. Recurring Theme of Changes in the Transcriptional Control Region of BK Virus during Adaptation to Cell Culture. 1991;65:5.
154. Negrini M, Sabbioni S, Arthur RR, Castagnoli A, Barbanti-Brodano G. Prevalence of the archetypal regulatory region and sequence polymorphisms in nonpassaged BK virus variants. *J Virol.* sept 1991;65(9):5092-5.
155. Flægstad T, Sundsfjord A, Arthur RR, Pedersen M, Traavik T, Subramani S. Amplification and sequencing of the control regions of BK and JC virus from human urine by polymerase chain reaction. *Virology.* 1 févr 1991;180(2):553-60.
156. Sugimoto C, Hara K, Taguchi F, Yogo Y. Regulatory DNA sequence conserved in the course of BK virus evolution. *J Mol Evol.* déc 1990;31(6):485-92.
157. Sugimoto C, Hara K, Taguchi F, Yogo Y. Growth efficiency of naturally occurring BK virus variants in vivo and in vitro. *J Virol.* juill 1989;63(7):3195-9.
158. Sundsfjord A, Johansen T, Flaegstad T, Moens U, Villand P, Subramani S, et al. At least two types of control regions can be found among naturally occurring BK virus strains. *J Virol.* août 1990;64(8):3864-71.
159. Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med.* 14 avr 2008;205(4):841-52.
160. Yogo Y, Zhong S, Xu Y, Zhu M, Chao Y, Sugimoto C, et al. Conserved archetypal configuration of the transcriptional control region during the course of BK polyomavirus evolution. *J Gen Virol.* août 2008;89(Pt 8):1849-56.
161. Moens U, Johansen T, Johnsen JI, Seternes OM, Traavik T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: Sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes.* oct 1995;10(3):261-75.
162. Markowitz RB, Dynan WS. Binding of cellular proteins to the regulatory region of BK virus DNA. *J Virol.* sept 1988;62(9):3388-98.
163. Moens U, Van Ghelue M. Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. *Virology.* 20 janv 2005;331(2):209-31.
164. Markowitz RB, Tolbert S, Dynan WS. Promoter evolution in BK virus: functional elements are created at sequence junctions. *J Virol.* mai 1990;64(5):2411-5.
165. Chakraborty T, Das GC. Identification of HeLa cell nuclear factors that bind to and activate the early promoter of human polyomavirus BK in vitro. *Mol Cell Biol.* sept 1989;9(9):3821-8.
166. Yoshiike K, Takemoto KK. Studies with BK Virus and Monkey Lymphotropic Papovavirus. In 1986.
167. Deyerle KL, Sajjadi FG, Subramani S. Analysis of origin of DNA replication of human papovavirus BK. *J Virol.* janv 1989;63(1):356-65.
168. Keiser S, Schmidt K, Bethge T, Steiger J, Hirsch HH, Schaffner W, et al. Emergence of infectious simian virus 40 whose AT tract in the replication origin/early promoter region is substituted by cellular or viral DNAs. *J Gen Virol.* 2015;96(3):601-6.
169. Johnson EM, Wortman MJ, Dagdanova AV, Lundberg PS, Daniel DC. Polyomavirus JC in the Context of Immunosuppression: A Series of Adaptive, DNA Replication-Driven

- Recombination Events in the Development of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Vol. 2013, Clinical and Developmental Immunology. Hindawi; 2013 p. e197807.
170. Witkin AE, Banerji J, Bullock PA. A model for the formation of the duplicated enhancers found in polyomavirus regulatory regions. *Virology*. 1 avr 2020;543:27-33.
 171. Deyerle KL, Subramani S. Linker Scan Analysis of the Early Regulatory Region of Human Papovavirus BK. *J VIROL*. 1988;62:10.
 172. Grinnell BW, Berg DT, Walls JD. Negative regulation of the human polyomavirus BK enhancer involves cell-specific interaction with a nuclear repressor. *Mol Cell Biol*. août 1988;8(8):3448-57.
 173. Cassill JA, Deyerle KL, Subramani S. Unidirectional deletion and linker scan analysis of the late promoter of the human papovavirus BK. *Virology*. mars 1989;169(1):172-81.
 174. Nakshatri H, Pater MM, Pater A. Activity and enhancer binding factors for BK virus regulatory elements in differentiating embryonal carcinoma cells. *Virology*. juill 1991;183(1):374-80.
 175. Ferguson AT, Subramani S. Complex functional interactions at the early enhancer of the PQ strain of BK virus. *J Virol*. juill 1994;68(7):4274-86.
 176. Moens U, Subramaniam N, Johansen B, Johansen T, Traavik T. A steroid hormone response unit in the late leader of the noncoding control region of the human polyomavirus BK confers enhanced host cell permissivity. *J Virol*. avr 1994;68(4):2398-408.
 177. Bethge T, Hachemi HA, Manzetti J, Gosert R, Schaffner W, Hirsch HH. Sp1 Sites in the Noncoding Control Region of BK Polyomavirus Are Key Regulators of Bidirectional Viral Early and Late Gene Expression. Imperiale MJ, éditeur. *J Virol*. 15 mars 2015;89(6):3396-411.
 178. Ajuh ET, Wu Z, Kraus E, Weissbach FH, Bethge T, Gosert R, et al. Novel Human Polyomavirus Noncoding Control Regions Differ in Bidirectional Gene Expression according to Host Cell, Large T-Antigen Expression, and Clinically Occurring Rearrangements. *J Virol*. 14 mars 2018;92(7).
 179. Hanssen Rinaldo C, Hansen H, Traavik T. Human endothelial cells allow passage of an archetypal BK virus (BKV) strain – a tool for cultivation and functional studies of natural BKV strains. *Arch Virol*. 1 juill 2005;150(7):1449-58.
 180. Broekema NM, Imperiale MJ. Efficient propagation of archetype BK and JC polyomaviruses. *Virology*. 20 janv 2012;422(2):235-41.
 181. Badis G, Berger MF, Philippakis AA, Talukder S, Gehrke AR, Jaeger SA, et al. Diversity and Complexity in DNA Recognition by Transcription Factors. *Science*. 26 juin 2009;324(5935):1720-3.
 182. Rohs R, West SM, Sosinsky A, Liu P, Mann RS, Honig B. The role of DNA shape in protein-DNA recognition. *Nature*. 29 oct 2009;461(7268):1248-53.
 183. Inukai S, Kock KH, Bulyk ML. Transcription factor–DNA binding: beyond binding site motifs. *Curr Opin Genet Dev*. avr 2017;43:110-9.
 184. Gorrill TS, Khalili K. Cooperative interaction of p65 and C/EBP β modulates transcription of BKV early promoter. *Virology*. 25 avr 2005;335(1):1-9.

185. Bethge T, Ajuh Tasi E, Hirsch H. Imperfect symmetry of Sp1 and core promoter elements regulates early and late viral gene expression of the bidirectional BK polyomavirus non-coding control region. *J Virol.* 31 août 2016;90:JV1.01008-16.
186. Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa PS. Polyomavirus BK non-coding control region rearrangements in health and disease. *J Med Virol.* août 2007;79(8):1199-207.
187. Johnsen JI, Seternes OM, Johansen T, Moens U, Mäntyjärvi R, Traavik T. Subpopulations of non-coding control region variants within a cell culture-passaged stock of BK virus: sequence comparisons and biological characteristics. *J Gen Virol.* juill 1995;76 (Pt 7):1571-81.
188. Olsen G-H, Hirsch HH, Rinaldo CH. Functional analysis of polyomavirus BK non-coding control region quasispecies from kidney transplant recipients. *J Med Virol.* nov 2009;81(11):1959-67.
189. Khalili K, Stoner G. *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives.* 2001
190. Boldorini R, Veggiani C, Turello E, Barco D, Monga G. Are sequence variations in the BK virus control region essential for the development of polyomavirus nephropathy? *Am J Clin Pathol.* août 2005;124(2):303-12.
191. Randhawa P, Zygmunt D, Shapiro R, Vats A, Weck K, Swalsky P, et al. Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney Int.* 1 août 2003;64(2):743-7.
192. Emami A, Yaghoobi R, Moattari A, Baseri Salehi M, Roozbeh J. Noncoding Control Region Pattern of BK polyomavirus in Kidney Transplant Patients With Nephropathy. *Exp Clin Transplant Off J Middle East Soc Organ Transplant.* 2017;15(2):150-6.
193. Stoner GL, Alappan R, Jobes DV, Ryschkewitsch CF, Landry ML. BK virus regulatory region rearrangements in brain and cerebrospinal fluid from a leukemia patient with tubulointerstitial nephritis and meningoencephalitis. *Am J Kidney Dis.* 1 mai 2002;39(5):1102-12.
194. Jørgensen GEK, Hammarin A-L, Bratt G, Grandien M, Flaegstad T, Johnsen JI. Identification of a unique BK virus variant in the CNS of a patient with AIDS. *J Med Virol.* mai 2003;70(1):14-9.
195. Sundsfjord A, Spein AR, Lucht E, Flaegstad T, Seternes OM, Traavik T. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol.* 1 mai 1994;32(5):1390-4.
196. Roy S, Mieczkowski PA, Weida C, Huo J, Roehrs P, Singh HK, et al. BK polyomavirus nephropathy with systemic viral spread: Whole genome sequencing data from a fatal case of BKPyV infection. *Transpl Infect Dis.* 2020;22(2):e13269.
197. Chatterjee M, Weyandt T, Frisque R. Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *J Med Virol.* 1 avr 2000;60:353-62.
198. Degener AM, Pietropaolo V, Di Taranto C, Jin L, Ameglio F, Cordiali-Fei P, et al. Identification of a new control region in the genome of the DDP strain of BK virus isolated from PBMC. *J Med Virol.* août 1999;58(4):413-9.

199. Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene*. 1 sept 2003;22:5192-200.
200. Harris KF, Christensen JB, Radany EH, Imperiale MJ. Novel Mechanisms of E2F Induction by BK Virus Large-T Antigen: Requirement of Both the pRb-Binding and the J Domains. *Mol Cell Biol*. mars 1998;18(3):1746-56.
201. Monini P, Rotola A, Di Luca D, De Lellis L, Chiari E, Corallini A, et al. DNA rearrangements impairing BK virus productive infection in urinary tract tumors. *Virology*. 1 déc 1995;214(1):273-9.
202. Gee CJ, Harris H. Tumorigenicity of cells transformed by Simian virus 40 and of hybrids between such cells and normal diploid cells. *J Cell Sci*. avr 1979;36:223-40.
203. Dörries K, Loeber G, Meixensberger J. Association of polyomaviruses JC, SV40, and BK with human brain tumors. *Virology*. 1 sept 1987;160(1):268-70.
204. Corallini A, Tognon M, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Evidence for BK Virus as a Human Tumor Virus. In: *Human Polyomaviruses*. John Wiley & Sons, Ltd; 2002. p. 431-60.
205. Corallini A, Pagnani M, Viadana P, Silini E, Mottes M, Milanesi G, et al. Association of BK virus with human brain tumors and tumors of pancreatic islets. *Int J Cancer*. 15 janv 1987;39(1):60-7.
206. Flaegstad T, Andresen PA, Johnsen JI, Asomani SK, Jørgensen GE, Vignarajan S, et al. A possible contributory role of BK virus infection in neuroblastoma development. *Cancer Res*. 1 mars 1999;59(5):1160-3.
207. Russo G, Anzivino E, Fioriti D, Mischitelli M, Bellizzi A, Giordano A, et al. p53 gene mutational rate, Gleason score, and BK virus infection in prostate adenocarcinoma: Is there a correlation? *J Med Virol*. déc 2008;80(12):2100-7.
208. Das D, Wojno K, Imperiale MJ. BK Virus as a Cofactor in the Etiology of Prostate Cancer in Its Early Stages. *J Virol*. mars 2008;82(6):2705-14.
209. Hausen H zur. Viruses in human cancers. *Science*. 22 nov 1991;254(5035):1167-73.
210. White MK, Khalili K. Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology*. 20 juin 2004;324(1):1-16.
211. Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ. BK Virus and Human Cancer: Innocent until Proven Guilty. *Semin Cancer Biol*. août 2009;19(4):252-60.
212. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol*. 1 avr 2012;13(4):339-40.
213. Solis M, Gallais F, Velay A, Fafi-Kremer S. Le virus BK et physiopathologie des maladies associées. *Virologie*. 1 janv 2019;23(1):7-22.
214. Liimatainen H, Weseslindtner L, Strassl R, Aberle SW, Bond G, Auvinen E. Next-generation sequencing shows marked rearrangements of BK polyomavirus that favor but are not required for polyomavirus-associated nephropathy. *J Clin Virol*. 2020;122.
215. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*. janv 2013;41(Database issue):D36-42.

216. F M, Ym P, J L, N B, T G, N M, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 1 juill 2019;47(W1):W636-41.
217. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 1 mai 2009;25(9):1189-91.
218. Grabe N. AliBaba2: Context Specific Identification of Transcription Factor Binding Sites. *In Silico Biol.* 1 janv 2002;2(1):S1-15.
219. Leung AYH, Chan M, Kwong YL. Genotyping of the noncoding control region of BK virus in patients with haemorrhagic cystitis after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* mars 2005;35(5):531-2.
220. Fioriti D, Degener AM, Mischitelli M, Videtta M, Arancio A, Sica S, et al. BKV infection and hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplant. *Int J Immunopathol Pharmacol.* juin 2005;18(2):309-16.
221. Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, et al. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol.* oct 2004;85(Pt 10):2821-7.

DOCUMENTS ANNEXES

#	Sexe	Age	Hémopathie	Conditionnement	Protocole	Greffe	GVH aigue	Clinique	Délai post-greffe	Virus associés
3	M	49	LAL B	TBI + Fludarabine	Allégé	CSP	Non	Asymptomatique	NA	X
4	M	64	Myélodysplasie	TBF	NR	MO	Non	Cystite	61	X
5	F	37	LAM	Busulfan + Cyclophosphamide + SAL	Myéloablatif	CSP	Oui	Cystite	43	CMV urine
6	M	61	LAM	TBF	NR	CSP	Oui	Cystite	10	HHV6 sang
7	M	24	LAM	FB2S	Allégé	CSP	Oui	Cystite	60	X
8	M	15	LAM	Cyclophosphamide + SAL	NR	USP	Non	BKPyV-CH	15	HHV6 sang
9	M	67	LAM	FB2S	Allégé	CSP	Oui	BKPyV-CH	408	X
10	M	18	LMC	Busulfan + Cyclophosphamide + SAL	NR	MO	Non	Cystite	58	X
11	F	67	Syndrome frontière	Autre	NR	CSP	Oui	Cystite	33	X
12	F	56	Myélodysplasie	TBF	NR	CSP	Non	Cystite	19	X
13	F	21	LAL B	TBI + Cyclophosphamide + SAL	Myéloablatif	CSP	Oui	BKPyV-CH	39	HHV6 sang
14	M	60	LAM	TBF	Allégé	CSP	Non	BKPyV-CH	18	X
15	F	50	LAM	TBF	Myéloablatif	SC	Oui	BKPyV-CH	15	HHV6 sang
16	M	66	LMMC	FB2S	Allégé	CSP	Oui	BKPyV-CH	35	X
17	M	36	LAM	TBF	Allégé	CSP	Non	Cystite	10	X
18	M	27	Myélodysplasie	FB4S	Myéloablatif	CSP	Oui	Cystite	180	X
19	M	57	Sarcome	TBF	Myéloablatif	CSP	Oui	Cystite	48	X
20	M	38	LAM	TBF	Allégé	CSP	Non	BKPyV-CH	159	CMV urine

Annexe 1. Caractéristiques des patients.

(TBI) : irradiation corporelle totale ; (TBF) : Thiothépa Busulfan Fludarabine ; (FB2S/FB4S) : Fludarabine Busulfan Sérum anti-lymphocytaire ; (SAL) : Sérum anti-lymphocytaire ; (CSP) : cellules souches périphériques ; (MO) : Moëlle osseuse ; (USP) : Unité de sang placentaire ; (SC) : sang de cordon ; (NR) : Non renseigné ; (LAL B) : Leucémie aigüe lymphoblastique B ; (LAM) Leucémie aigüe myéloïde ; (LMC) : Leucémie myéloïde chronique ; (LMMC) : Leucémie myélo-monocytaire chronique

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

Revue de la bibliographie sur la région non codante du BK virus. Illustration par l'étude de la région non codante du BK virus chez 18 patients bordelais

Résumé : Le BK virus (BKPyV) est un virus à ADN de la famille des *Polyomaviridae* découvert en 1971. C'est un virus ubiquitaire, strictement humain dont le réservoir s'établit après la primo-infection dans le rein et le tractus urinaire. La primo-infection et les réactivations sont habituellement asymptomatiques mais constituent cependant une menace pour la santé des patients immunodéprimés en contexte de greffe rénale ou de greffe de cellules souches hématopoïétiques.

La région non codante du BKPyV, remarquable par sa plasticité, peut se présenter sous forme sauvage dite « archétype » ou réarrangée comportant des duplications et délétions en bloc. Par son interaction avec des facteurs de transcription cellulaire, elle orchestre la réplication de l'ADN viral ainsi que la transcription de gènes viraux précoces et tardifs. L'origine et la signification des réarrangements est incertaine. Des données expérimentales suggèrent que les souches de BKPyV arborant des réarrangements seraient associées à une pathogénicité plus importante, un tropisme cellulaire élargi ou encore un pouvoir transformant accru. Ces caractéristiques peinent toutefois à être confirmées *in vivo*.

Afin d'illustrer ces problématiques, nous avons séquencé puis analysé la structure de la région non codante du BKPyV répliquant à haut niveau dans les urines de 18 patients en situation de greffe de cellules souches hématopoïétiques entre le 01/04/2019 et le 31/03/2020 au CHU de Bordeaux. L'ensemble des régions non codantes du BKPyV séquencées était de conformation archétype. Les réarrangements de la région non codante semblent donc être un évènement rare et non associé à une réplication intense ainsi qu'à la survenue de cystite hémorragique liée au BKPyV. Un polymorphisme de plusieurs nucléotides a par ailleurs été mis en évidence et pourrait affecter la distribution des sites de liaison aux facteurs de transcription selon notre analyse prédictive. L'influence de ces variations de séquence sur transcription des gènes viraux reste néanmoins à être précisée.

Mot clés : BK virus, cycle biologique, région non codante, réarrangements, séquençage, transcription, facteurs de transcription, néphropathie à BK virus, cystite hémorragique

BK polyomavirus non coding control region. A review. Characterisation of 18 patient derived BK polyomavirus non-coding control regions in Bordeaux University Hospital

Abstract: *BK Virus (BKpyV) is a DNA virus discovered in 1971 which belongs to the Polyomaviridae family. This virus is restricted to humans and widely spread within the population. After primary infection the virus establishes latency in kidneys and the urinary tract. Primary infection and reactivation are usually asymptomatic but may turn into a severe threat for immunocompromised patients who have undergone renal transplantation or hematopoietic stem cell transplantations.*

BKPyV non coding control region is remarkable for its plasticity. It can be found in wild-type conformation, called "archetype", or rearranged conformation which harbors block duplications and/or deletions. Through its interaction with cellular transcription factors, it orchestrates the replication of viral DNA as well as the transcription of early and late viral genes. The source and significance of such rearrangements remain unclear. Experimental data suggest that rearranged BKPyV could be associated with increased pathogenicity, enlarged cellular tropism or oncogenic properties. However, these features need to be confirmed in vivo.

In our study, we have sequenced then analyzed the non-coding control region of BKPyV found to replicate at high level in the urine of 18 patients after hematopoietic stem cell transplantation between 04/01/2019 and 03/31/2020 at University hospital of Bordeaux in France. All of the sequenced BKPyV non-coding control regions harbored archetype conformation. Thus, rearrangements of the non-coding control region seem to be rare in this context and not associated with high level replication of the BKPyV and BKPyV hemorrhagic cystitis. Besides, our archetype sequences revealed nucleotide polymorphism. A predictive analysis showed that those variations could affect transcription factor binding sites distribution among the non-coding control region. Whether such variations influence BKPyV gene transcription remains to be clarified in further studies.

Keywords: BK polyomavirus, biology, non-coding control region, rearrangements, sequencing, transcription, transcription factors, BK polyomavirus nephropathy, haemorrhagic cystitis

Discipline : Biologie Médicale

U.F.R des Sciences Médicales de l'Université de Bordeaux

146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cedex