UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

ÉQUIPE Virologie et Immunologie Moléculaires

THÈSE présentée par :

Jérôme NICOL

soutenue le : **20 juin 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline / Spécialité : Sciences de la Vie et de la Terre / Virologie

Nouveaux polyomavirus : Epidemiologie et partenaires cellulaires des protéines mineures de capside du polyomavirus à cellules de Merkel

THÈSE dirigée par :

Monsieur TOUZE Antoine	Professeur, Université François – Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Madame DEMERET Caroline	Docteur, Institut Pasteur Paris
Monsieur FOULONGNE Vincent	Docteur, Université de Montpellier 1

JURY :

Monsieur GESSAIN Antoine	Professeur, Institut Pasteur Paris
Monsieur ROINGEARD Philippe	Professeur, Université François – Rabelais de Tours

INVITE :

Monsieur COURSAGET Pierre	Docteur, Université François – Rabelais de Tours

Résumé

Les polyomavirus sont des virus très prévalents dans la population générale. Chez les sujets immunodéprimés, quatre polyomavirus sont associés à des pathologies. Parmi ces virus, le MCPyV est quant à lui responsable du carcinome à cellules de Merkel. Son implication dans un cancer humain a conduit à un regain d'intérêt pour la famille des *Polyomaviridae*.

Au cours de ma thèse, nous nous somme intéressés à l'épidémiologie de six nouveaux polyomavirus humains (MCPyV, HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9 et MWPyV). Ces études ont montré que ces virus sont très répandus dans la population générale et que les infections surviennent dès l'enfance.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés aux réactivités croisées entre polyomavirus humains et simiens phylogénétiquement proches. Nous avons montré qu'il existe des cross-réactions entre le LPyV et l'HPyV9, entre le MCPyV et deux virus de chimpanzé (PtvPyV1 et PtvPyV2). Ces polyomavirus simiens ne circulent donc pas chez l'Homme.

D'autre part, afin de mieux comprendre le cycle du MCPyV, nous avons initié l'identification des partenaires cellulaires de l'ensemble de ses protéines. Ce travail a tout d'abord été réalisé sur les protéines mineures de capside VP2/VP3. Des cribles en double hybride en levure ont permis d'identifier les partenaires cellulaires des VP2/3. L'interaction effective entre les protéines virales et cellulaires a ensuite été validée en cellules de mammifères par une approche de complémentation de la luciférase *Gaussia princeps*. Les partenaires cellulaires des protéines VP2/VP3 identifiés sont impliqués dans les voies de prolifération cellulaire, d'apoptose, NFκB et dans le transport intracellulaire du virus.

Mots-clés : *Polyomaviridae*, MCPyV, HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9, MWPyV, Séro-épidémiologie, Interactomique, Double hybride en levure, *Protein complementation assay*

Table des matières

Résumé 2
Table des matières 3
Liste des tableaux 6
Liste des figures 7
Liste des annexes 12
Liste des abréviations 13
INTRODUCTION 15
I. Les polyomavirus : historique 16
II. Taxonomie des polyomavirus 21
III. Organisation génomique des polyomavirus 22
III.1. Région précoce 22
III.2. Région de contrôle non codante 24
III.3. Région tardive 24
IV. Structure de la particule virale 26
IV.1. Protéine majeure de capside, VP1 26
IV.2. Protéines mineures de capside, VP2 et VP3 27
IV.3. Pseudo-particules virales 28
V. Domaines fonctionnels des oncoprotréines 29
V.1. Antigène grand T 29
V.2. Antigène petit T 30
VI. Cycle des polyomavirus 31
VI.1. Entrée du virus 31
VI.1.1. Attachement aux récepteurs cellulaires 31
VI.1.2. Trafic intracellulaire 32
VI.2. Expression des protéines précoces et réplication du génome viral 35
VI.3. Expression des protéines tardives, encapsidation et libérations des particules virales 36
VI.4. Régulation post-transcriptionnelle par les Micro-ARN viraux 38
VII. Pouvoir oncogène des polyomavirus 39
VII.1. Pouvoir oncogène des polyomavirus *in vivo* et *in vitro* 39

VII.2. Modèle SV40 39
VII.2.1. Inhibition de suppresseurs de tumeurs 41
VII.2.1.1. pRB 41
VII.2.1.2. p53 42
VII.2.1.3. PP2A 44
VII.2.2. Autres partenaires cellulaires 44
VIII. Pouvoir pathogène des polyomavirus chez l'animal 46
VIII.1. Les Polyomavirus aviaires 46
VIII.2. Les Polyomavirus de mammifères 47
VIII.2.1. AelPyV-1 et fibrome chez l'éléphant 47
VIII.2.2. EPyV, uvéite et néphropathie chez le cheval 48
VIII.2.3. RacPyV et tumeur cérébrale chez le raton laveur 48
VIII.3. Pouvoir pathogène chez l'Homme 49
VIII.3.1. Néphropathie à BKPyV 49
VIII.3.2. Leuco-encéphalopathie multifocale progressive à JCPyV 50
VIII.3.3. Carcinome à cellules de Merkel et MCPyV 51
VIII.3.3.1. Carcinome à cellules de Merkel 51
VIII.3.3.2. Découverte du polyomavirus à cellules de Merkel 53
VIII.3.3.3. Prévalence du MCPyV dans le CCM 53
VIII.3.3.4. Signature moléculaire du MCPyV dans le CCM 53
VIII.3.3.5. Expression des antigènes viraux dans le CCM 55
VIII.3.3.6. Marqueurs sérologiques chez les patients atteints de CCM 55
VIII.3.4. Trichodysplasie spinuleuse et TSPyV 56
VIII.3.4.1. *Trichodysplasia spinulosa* 56
VIII.3.4.2. Découverte du TSPyV 57
IX. Epidémiologie des polyomavirus 58
IX.1. Prévalence et séroprévalence des polyomavirus 58
IX.2. Mode transmission des polyomavirus 59
IX.3. Réactivités croisées entre le SV40, le BKPyV et le JCPyV 60
ARTICLES DE REVUE 62
I. Prevalence of polyomaviruses and links with human diseases 63
II. Human Merkel cell polyomavirus: virological background and clinical implications 75
OBJECTIFS 76

RESULTATS 78
I. Séro-épidémiologie des nouveaux polyomavirus humains 79
I.1. Article 1 : Age-Specific Seroprevalences of Merkel Cell Polyomavirus, Human Polyomaviruses 6, 7, and 9, and Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus 83
I.2. Article 2 : Seroprevalence of Human Malawi Polyomavirus 90
I.3. Article 3 : Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings 94
II. Réactivités croisées entre polyomavirus humain et simiens proches 95
II.1. Article 4 : Seroprevalence and Cross-reactivity of Human Polyomavirus 9 97
II.2. Article 5 : Serological cross-reactivity between Merkel Cell polyomavirus and two closely related chimpanzee polyomaviruses 104
III. Partenaires cellulaires des protéines mineures de capside VP2 et VP3 105
III.1. Identification des partenaires cellulaires par double hybride en levures 106
III.2. Vérification des partenaires cellulaires par HT-GPCA 110
CONCLUSIONS 112
Résumé 150
Résumé en anglais 150

Liste des tableaux

Tableau I : Polyomavirus connus en 2014 17
Tableau II : Récepteurs cellulaires des polyomavirus 31
Tableau III : Séquences codant les protéines VP1 utilisées pour la construction des baculovirus 79
Tableau IV : Occurrence des interactants majoritaires des protéines mineures VP2/VP3 identifiées par double hybride en levure 109

Liste des figures

Figure 1 : Relation phylogénétique entre les polyomavirus basée sur le génome complet (2014) 20

Figure 2 : Organisation génomique des *Polyomaviridae*. Le génome est un ADN bicaténaire circulaire, d'environ 5000pb, divisé en trois régions. La région de contrôle non codante (NCCR) contient l'origine de réplication (Ori) et les promoteurs des régions précoce et tardive. La région précoce code l'antigène grand T (LT), l'antigène petit T (ST) issus d'un épissage alternatif. Les polyomavirus SV40, BKPyV, JCPyV et MCPyV codent un ou plusieurs antigènes LT additionnels (LT') obtenus avec d'autres épissages alternatifs. La région tardive code les protéines de capside, majeure (VP1) et mineures (VP2, VP3 et VP4). Les cadres de lecture des protéines VP2, 3 et 4 sont identiques mais la traduction est initiée sur des codons alternatifs. La VP4 n'est décrite que pour le SV40. Pour le SV40, le BKPyV et le JCPyV un transcrit tardif additionnel, code l'agnoprotéine (Agno), qui n'est pas retrouvée dans la particule virale. Chez certains polyomavirus, la région 3' non codante du messager tardif code des micro-ARN (miRNA). Adapté de (DeCaprio & Garcea, 2013). 22

Figure 3 : Epissage des messagers antigènes T. Les rectangles symbolisent les séquences codantes et les lignes en pointillés indiquent les séquences épissées. Les différentes couleurs représentent les différents cadres de lecture après les évènements d'épissage. Les antigènes LT et ST sont communs à tout les polyomavirus. Certains polyomavirus codent pour des antigènes T accessoires dont la partie C-terminale correspond à des fragments de l'antigène LT. Le MPyV et le MCPyV codent chacun un antigène T supplémentaire dont la partie C-terminale n'a pas de communauté de séquence avec le LT. Adapté de (Gjoerup & Chang, 2010). 23

Figure 4 : Structure de la capside des polyomavirus. (A) Visualisation au microscope électronique de particules du BKPyV purifiées à partir de l'urine d'un patient ayant subit une greffe de rein (Photographie du Pr Pierre Lebon, laboratoire de virologie, hôpital Saint Vincent de Paul). (B) Reconstitution 3D d'une pseudo-particule virale de SV40 après analyse par cryo-microscopie électronique (d'après l'ICTV, http://ictvonline.org). (C) Organisation de la particule virale avec les protéines VP1, VP2 et VP3. L'ADN

double brin est enroulé autour d'histones cellulaires, (D'après Swiss Institute of Bioinformatic, http://expasy.org). 26
Figure 5 : Structure de la protéine majeure de capside du SV40. (A) Structure de la protéine VP1 obtenue en cristallographie et (B) d'un capsomère constitué d'un pentamère de VP1 (Adapté de (Chen *et al.*, 2000)). 27
Figure 6 : Pseudo-particules virales (VLP) du BKPyV. Observation en microscopie électronique à transmission de VLP obtenues par expression du gène VP1 du BKPyV en système baculovirus/cellules d'insecte. La barre représente d'échelle représente 100nm (D'après (Touzé *et al.*, 2001)). 28
Figure 7 : Représentation schématique des domaines fonctionnels des antigènes T des polyomavirus. 29
Figure 8 : Transport intracellulaire des polyomavirus. Le SV40 et le BKPyV (en vert) sont endocytés dans des vésicules à cavéole. Ces vésicules sont transportées vers le cavéosome avec lequel elles fusionnent. Les particules virales, dans de nouvelles vésicules, sont ensuite dirigées vers le RE. Le MPyV (en bleu) est aussi endocyté dans des vésicules à cavéoles. Les particules sont transportées vers les endosomes précoces, puis vers le cavéome et enfin vers le RE. Les vésicules contenant le MPyV peuvent aussi utiliser une voie alternative, où, après leur passage dans les endosomes précoces les particules sont dirigées directement vers le RE sans passer par le cavéosome. Le JCPyV (en rouge) est endocyté dans des vésicules à manteau de clathrine qui sont dirigées vers les endosomes précoces, puis le cavéosome et enfin vers le RE. Adapté de (Sapp & Day, 2009) 33
Figure 9 : Réplication du génome des polyomavirus. 34
Figure 10 : Partenaires cellulaires des oncogènes LT et ST. D'après (DeCaprio & Garcea, 2013) 40
Figure 11 : Inactivation des supresseurs de tumeurs de la famille pRB par l'antigène LT. 40
Figure 12 : Inactivation de la p53 par l'antigène LT. En condition de stress (dommages à l'ADN), la p53 devient stable et transactive des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. La p21 est un inhibiteur de cycline qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire. En cas de dommages à l'ADN irréversibles, la p53 continue à s'accumuler et conduit aussi à l'expression de la protéine pro-apotototique Bax (Bcl2 associated protein X). (Adapté de (Topalis *et al.*, 2013)). 42
Figure 13 : Activation de la voie de signalisation PI3K-Akt par les oncogènes viraux. 43

Figure 14 : Lésions associées au AelPyV-1 sur la trompe d'éléphants (Stevens *et al.*, 2013). (A) Lésion nodulaire sur la trompe d'un éléphant (indiquée par une flèche) ; la photographie est représentative de trois animaux. (B) Fibrome proéminant et ulcéré pouvant mesurer jusqu'à 7 cm de diamètre. 47
Figure 15 : Observation en microscopie électronique à transmission d'une cellule infectée par le BKPyV. (A) Le noyau présente des structures virales pseudo-cristallines, les flèches indiquent l'enveloppe nucléaire (Grossissement x15000). (B) Particules virales observées à fort grossissement (x47000). (Adapté de (Roingeard *et al.*, 1999)). 50
Figure 16 : Aspect clinique du carcinome à cellules de Merkel. Nodule violacé et luisant de 3cm de diamètre localisé sur la mandibule gauche d'une femme de 82 ans. La lésion est est apparue 2 mois avant la prise de la photographie (Laureano *et al.*, 2014). 52
Figure 17 : Diagnostic histologique et Immunohistochimique du carnicome à cellules de Merkel. (A) En coloration Hematoxyline-eosine, la tumeur est constituée d'un amas de cellules arrondies (MO X200). (B) Les cellules expriment le marqueur CK20 (MO X400). (C) Les cellules expriment le marqueur neuroendocrine chromogranine A (MO X400). (D) Les cellules expriment le marqueur neuroendocrine synaptophysine (MO X400). (E) Les cellules n'expriment pas le TTF-1 (MO X400) (D'après (Koljonen, 2006)). 52
Figure 18 : Mutation de la région précoce des séquences de MCPyV intégrée dans le cas de CCM. 54
Figure 19 : Lésions caractéristiques de la trichodysplasie spinuleuse. (A) Le patient présente des papules sur l'ensemble du visage qui s'accompagnent d'une alopécie au niveau des sourcils ainsi que (B) des spicules kératosiques localisés essentiellement sur le nez (van der Meijden *et al.*, 2010). 57
Figure 20 : Observation en microscopie électronique à transmission d'une cellule épithéliale de papule folliculaire chez un cas de trichodysplasie spinuleuse. Le noyau contient des réseaux paracristallins constitués de particules virales ; les particules mesurent environ 46 nm de diamètre (Wyatt *et al.*, 2005). 57
Figure 21 : Relation phylogénétique entre les polyomavirus basée sur la protéine majeure de capside VP1. (D'après (Nicol & Touzé, 2011)). 60
Figure 22 : Séro-épidémiologie de six nouveaux polyomavirus humains. Les séroprévalences sont indiquées en pourcentage et les classes d'âge sont en années. Les effectifs (n) et les intervalles de confiance sont donnés pour chaque classe d'âge. 82

Figure 23 : Relation phylogénétique entre polyomavirus humains et simiens basée sur la protéine majeure capside VP1. Les polyomavirus humains sont écrits en noir et les polyomavirus simiens en gris. L'ellipse rouge entoure les polyomavirus pour lesquels des réactivités croisées sont décrites. Les ellipses vertes désignent des réactivités croisées potentielles (Adapté de refmoi). 95

Figure 24 : Principe du double hybride en levure. Les protéines cellulaires (proies) sont fusionnées au domaine d'activation (AD) du facteur de transcription Gal4. Les protéines virales (appâts) sont quant à elles fusionnées à la deuxième partie de Gal4, le domaine de fixation à l'ADN (DBD). Dans le cas A, il n'y a pas d'interaction entre l'appât et la proie. Par conséquent, le gène rapporteur *his3* n'est pas exprimé. Dans le cas B, l'interaction appât-proie rapproche physiquement les deux domaines de Gal4. La fonction du facteur de transcription est restaurée et les levures sont capables de cultiver sur milieu dépourvu en histidine. 106

Figure 25 : Constructions des fusions Gal4DBD/appâts viraux VP2/VP3. (A) Les protéines entières VP2 et VP3 correspondent aux protéines virales natives. La VP3 est une VP2 tronquée de ses 45 aa N-terminaux. La construction VP2Nt correspond à la partie N-terminale de la VP2 et la construction VP2Ct correspond à la partie C-terminale de la VP2. La matrice utilisée pour réaliser ces constructions est le plasmide pH2M. (B) Les quatre fragments ont générés par PCR puis cloné dans le plasmide pDONR207 par BP clonase. Les inserts contenus dans les plasmides d'entrée ont ensuite été clonés en phase avec de le domaine DBD de Gal4 au cours d'une réaction LR clonase avec le plasmide de destination pGBK. 107

Figure 26 : Double hybride en levure. Les différents plasmides pGBK contenant les appâts viraux fusionnés au domaine DBD de Gal4 sont introduits dans des levures AH109 (-H, -W, -L, mat a). Les levures transformées cultivent sur milieu dépourvu en tryptophane (-W). La concentration en 3 amino-triazole (3-AT) nécessaire pour inhiber l'auto-activation du gène his3 est déterminée sur milieu dépourvu en tryptophane et leucine (-W -L) et contenant des doses croissantes de 3-AT. La banque ORFeome est contenue dans des levures Y187 (-H, -W, -L, mat α). Après croisement entre les levures AH109 et Y187, les levures diploïdes sont sélectionnées, repiquées, lysées puis une PCR est réalisée pour amplifier les proies cellulaires interagissant avec les appâts viraux. Les proies cellulaires sont enfin identifiées par séquençage. 107

Figure 27 : Principe de l'HT-GPCA. (A) Les protéines A et B sont chacunes fusionnées à une des deux parties de la luciférase Gaussia princeps (GL). Lorsque les protéines A et B interagissent, l'activité luciférase est restaurée et peut être mesurée. (B) L'intensité de l'interaction entre les protéines A et B est évalué par le rapport entre la luminescence obtenue pour le couple et la somme de la luminescence obtenue pour chacun des partenaires testé avec l'autre fragment GL non fusionné (D'après (Cassonnet *et al.*, 2011)). 110

Figure 28 : Interactions entre les proies cellulaires et les appâts viraux en HT-GPCA. La restauration de la luminescence a été mesurée pour chacun des couples proie cellulaire / appât viral ainsi que pour les conctrôles. Les NLR ont été calculés selon la formule suivante : NLR=(Luminescence (Gluc1Proie X Gluc2Appât))/(Luminescence ((Gluc1Proie X Gluc2) +(Gluc1 X Gluc2Appât))). 111

Liste des annexes

Pour générer la liste des annexes, veuillez suivre la procédure suivante :
1. Ouvrir le menu "Insertion" – "Tables et index..." – "Table des illustrations"
2. Choisir "Options" et le style "3|Ann_titre1" pour construire la table, puis faire OK
3. Pour faire une mise à jour, cliquez dans la table et appuyez sur la touche "F9"

N’oubliez pas d’effacer ce texte quand vous n’en aurez plus besoin.

Liste des abréviations

ADN :	
Ag-LT :	Antigène grand T (ou *Large T-antigen*)
Ag-ST :	Antigène petit T (ou *Small T-antigen*)
aa :	Acide aminé
ARN :	
BKPyV :	Polyomavirus BK
CCM :	Carcinome à cellules de Merkel
DTS :	
EBV :	Virus Epstein Barr
HHV-8 :	Herpesvirus humain 8
HPV :	Papillomavirus humain (ou *Human papillomavirus*)
HPyV :	Polyomavirus humain
ICTV :	Comité international de taxonomie des virus
JCPyV :	Polyomavirus JC
KIPyV :	Polyomavirus du Karolinska Institut (ou *Karolinska Institute polyomavirus*)
LEMP :	Leuco-encéphalopathie multifocale progressive
MCPyV:	Polyomavirus à cellules de Merkel (ou *Merkel cell polyomavirus*)
MWPyV :	Polyomavirus Malawi
pb :	paire de bases
PCR :	Réaction de polymérisation en chaine (ou *Polymerase chain reaction*)
PyV :	Polyomavirus
RCA :	Amplification par cercle roulant (ou *Rolling circle amplification*)
STLPyV :	Polyomavirus Saint-Louis
SV40 :	Virus simien 40 (ou *Simian virus 40*)
TS :	Trichodysplasie spinuleuse (ou *Trichodysplasia spinulosa*)
TSPyV :	Polyomavirus associé à la Trichodysplasie spinuleuse
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VP :	Protéine virale
WUPyV :	Polyomavirus de l'université de Washington (*Washington University PyV*)
VLP :	Pseudo-particule virale (ou *Virus like particle*)

ORI : Origine de réplication

OBD : Domaine de liaison à l'origine de réplication (ou *Origin binding domain*)

TTF-1 :

NLS : Signal de localisation nucléaire

mi-ARN : Micro-ARN

vmi-ARN : Micro-ARN viral

SIDA :

NLS :

pRB

RE :

INTRODUCTION

I. Les polyomavirus : historique

Le premier polyomavirus a été découvert par hasard, en 1953, par Ludwik Gross qui travaillait alors sur un autre virus cancérigène chez la souris, le rétrovirus de la leucémie murine (MuLV). Lorsque des extraits filtrés, préparés à partir d'organes de souris Ak leucémiques, ont été inoculés à des souriceaux de la lignée C3H, certaines souris ont développé des tumeurs des glandes salivaires plutôt que des leucémies (Gross, 1953). Par ailleurs, Gross montra des propriétés physico-chimiques différentes entre les deux « pouvoirs cancérigènes ». Seule la capacité des extraits, à induire des leucémies était inactivée par la chaleur, contrairement à la capacité à induire des tumeurs des glandes salivaires. Gross montra aussi que le nouvel agent infectieux était endémique et non pathogène chez les souris Ak mais oncogène chez les souris C3H. Gross démontra ainsi qu'il avait isolé un nouveau virus cancérigène : le virus murin du cancer de la parotide (Gross, 1953). Les travaux initiaux de Gross furent poursuivis par Sarah Stewart et Bernice Eddy qui démontrèrent qu'en plus des tumeurs des glandes salivaires, les souris développaient aussi des tumeurs rénales, sous-cutanées et des glandes mammaires et que des hamsters et des rats nouveaux nés développaient aussi de nombreuses tumeurs suite à l'inoculation du virus (Eddy *et al.*, 1958, 1959; Stewart *et al.*, 1957). Le terme Polyomavirus, du grec ancien -*poly* (plusieurs) et -*oma* (tumeur) fut ainsi adopté.

En 1960, un second polyomavirus, a été découvert par Sweet et Hilleman (Sweet & Hilleman, 1960). Il s'agit du virus simien 40 (SV40), responsable d'infections persistantes mais asymptomatiques chez le singe rhésus (Minor *et al.*, 2003; Sweet & Hilleman, 1960). Ce virus, à l'effet cytopathogène vacuolisant, a initialement été trouvé dans des cultures cellulaires de rein de singe rhésus, ces cultures servant à la production du vaccin inactivé anti-poliomyélite (vaccin Salk). Entre 1955 et 1963, cent millions d'individus ont potentiellement été exposés à ce virus. La découverte du SV40 et les nombreux travaux effectués sur ce virus ont conduit à une meilleure compréhension du cycle cellulaire, de la régulation des gènes et de l'épissage. Les travaux réalisés sur un oncogène codé par le génome viral, l'antigène T, ont permis de découvrir le facteur de transcription p53 et de caractériser son rôle ainsi que celui de la protéine du rétinoblastome (pRB) dans la régulation du cycle cellulaire (An *et al.*, 2012).

Tableau I : Polyomavirus connus en 2014

Hôte	Nom	Abréviation (Nom alternatif)	Référence	Pathologie associée	Identifiant Genbank
Homme					
	BK polyomavirus	BKPyV (BK, BKV)	Gardner *et al.* (1971)	néphropathie	NC_001538
	JC polyomavirus	JCPyV (JC, JCV)	Padgett *et al.* (1971)	LEMP	NC_001699
	Karolinska Institute polyomavirus	KIPyV (KI)	Allander *et al.* (2007)	-	NC_009238
	Washington University polyomavirus	WUPyV (WU)	Gaynor *et al.* (2007)	-	NC_009539
	Merkel cell polyomavirus #	MCPyV (MCV)	Feng *et al.* (2008)	CCM	NC_010277
	Human polyomavirus 6	HPyV6	Schowalter *et al.* (2010)	-	NC_014406
	Human polyomavirus 7	HPyV7	Schowalter *et al.* (2010)	-	NC_014407
	Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus	TSPyV	van der Meijden *et al.* (2010)	trichodysplasie spinuleuse	NC_014361
	Human polyomavirus 9	HPyV9	Scuda *et al.* (2011)	-	NC_015150
	Malawi polyomavirus	MWPyV (HPyV10, MXPyV)	Siebrasse *et al.* (2012)	-	JQ898291
	Saint Louis polyomavirus	STLPyV	Lim *et al.* (2013)	-	JX463183
	Human polyomavirus 12	HPyV12	Korup *et al.* (2013)	-	JX308829
Grand singe					
Orang-outang	Bornean orang-utan polyomavirus	OraPyV1	Groenewoud *et al.* (2010)	-	NC_013439
Orang-outang	Sumatran orang-utan polyomavirus	OraPyV2	Groenewoud *et al.* (2010)	-	FN356901
Chimpanzé	Chimpanzee polyomavirus	ChPyV	Deuzing *et al.* (2010)	-	NC_014743
Chimpanzé	P. t. verus polyomaviruses	PtvPyV	Leendertz *et al.* (2011)	-	xx
Gorille	G. g. gorilla polyomavirus	GggPyV	Leendertz *et al.* (2011)	-	HQ385752
Singe					
Singe rhésus	Simian virus 40	SV40	Eddy *et al.* (1962)	-	NC_001669
Babouin	Baboon polyomavirus 1 (Simian agent 12)	SA12	Malherbe *et al.* (1963)	-	NC_007611
Singe vert	B-lymphotropic polyomavirus	LPyV	zur Hausen *et al.* (1979)	-	NC_004763
Babouin	† Baboon polyomavirus 2	PPyV	Gardner *et al.* (1989)	-	†
Singe cynomolgus	† Cynomolgus polyomavirus	CyPV	van Gorder *et al.* (1999)	-	†
Singe écureuil	Squirrel monkey polyomavirus	SqPyV	Verschoor *et al.* (2008)	-	NC_009951
Rongeurs					
Souris	Murine polyomavirus #	MPyV	Gross (1953)	tumeur	NC_001515
Souris	Murine pneumotropic virus	MPtV	Kilham *et al.* (1953)	pneumonie	NC_001505
Souris	Mastomys polyomavirus	MasPyV	Orba *et al.* (2011)	-	AB588640
Lapin	† Rabbit kidney vacuolating virus	RKV	Hartley *et al.* (1964)	-	†
Hamster	Hamster polyomavirus #	HaPyV	Graffi *et al.* (1967)	tumeur	NC_001663
Rat	† Athymic rat polyomavirus	RatPyV	Ward *et al.* (1984)	dépérissement	†
Chauve-souris	Bat polyomavirus	BatPyV	Misra *et al.* (2009)	-	NC_011310
Autres mammifères					
Boeuf	Bovine polyomavirus	BPyV	Reissig *et al.* (1976)	-	NC_001442
Otarie	California sea lion polyomavirus	SLPyV	Colegrove *et al.* (2010)	-	NC_013796
Cheval	Equine polyomavirus	EPyV	Renshaw *et al.* (2012)	cystite, uvéite	JQ412134
Raton laveur	Raccoon polyomavirus #	RacPyV	Dela Cruz *et al.* (2013)	tumeur cérébrale	JQ178241
Eléphant	African elephant polyomavirus 1	AelPyV-1	Stevens *et al.* (2013)	fibrome	KF147833
Dauphin	Dolphin polyomavirus 1	DPyV-1	Anthony *et al.* (2013)	-	KC594077
Oiseaux					
Perruche (Poulet, Passeraux)	(Budgerigar fledgling disease virus) Avian polyomavirus	(BFDV) APyV	Bozeman *et al.* (1981)	hépatite	NC_004764
Oie	Goose hemorrhagic polyomavirus	GHPyV	Guerin *et al.* (2000)	hémorragie rénale	NC_004800
Bouvreuil	Finch polyomavirus	FPyV	Johne *et al.* (2006)	mort (oisillons)	NC_007923
Corneille	Crow polyomavirus	CPyV	Johne *et al.* (2006)	mort (oisillons)	NC_007922
Canari	Canary polyomavirus	CaPyV	Halami *et al.* (2010)	hépatite hémorragique	GU345044
Cassican	Butcherbird polyomavirus	ButPyV *	Bennett *et al* (2014)	infection oculaire	KF360862

† : génome jamais séquencé, les 4 virus morphologiquement apparentés aux *Polyomaviridae* ont provisoirement été exclus de la famille
* : abréviation provisoire
- : pas de maladie associée
: virus oncogène chez l'hôte naturel
LEMP : leuco-encéphalopathie multifocale progressive
CCM : carcinome à cellules de Merkel

Les deux premiers polyomavirus humains ont été découverts en 1971. Le polyomavirus BK (BKPyV, BK : initiales du cas index) a été identifié par Gardner *et al.* dans l'urine d'un sujet ayant subi une greffe de rein (Gardner *et al.*, 1971). Le polyomavirus JC (JCPyV, JC : initiales du cas index), a quant à lui été découvert par Padgett *et al.* dans le cerveau d'un patient souffrant d'une leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP) (Padgett *et al.*, 1971). Il a été montré que ces deux virus humains ainsi que le SV40 sont capables d'immortaliser des cultures cellulaires et d'induire des tumeurs dans des modèles expérimentaux chez l'animal. Ces virus ont alors été recherchés dans de nombreux cancers humains sans jamais qu'une association causale virus/cancer ne soit établie (DeCaprio & Garcea, 2013).

Ce n'est que très récemment que de nouveaux polyomavirus humains ont été découverts. Les polyomavirus Karolinska Institute (KIPyV) et Washington University (WUPyV) ont été trouvés dans des lavages nasopharyngés de patients souffrant de maladies respiratoires aigues sans être associés à ces pathologies (Allander *et al.*, 2007; Gaynor *et al.*, 2007). En 2008, le cinquième polyomavirus humain, le polyomavirus à cellules de Merkel (MCPyV) a été identifié par Feng et *al.* dans des carcinomes à cellules de Merkel (CCM) (Feng *et al.*, 2008). Ces travaux ont aussi montré une prévalence du MCPyV dans 8/10 cas de CCM ainsi que l'intégration clonale du génome viral dans les cellules tumorales. Ces travaux, montrant pour la première fois, l'association directe entre un polyomavirus et un cancer humain ont ravivé l'intérêt pour cette famille virale en santé humaine. Le MCPyV est aujourd'hui reconnu comme un agent carcinogène de classe 2A (Bouvard *et al.*, 2012).

Depuis la découverte du MCPyV, de nouveaux polyomavirus ont été identifiés à l'aide de technologies de séquençage à haut débit ou de techniques d'amplification classique. Les polyomavirus humains 6 et 7 (HPyV6 et HPyV7), ont été isolés à partir de peau saine (Schowalter *et al.*, 2010), et le polyomavirus associé à la trichodysplasie spinuleuse (TSPyV) a été découvert chez un jeune patient immunodéprimé présentant une trichodysplasie spinuleuse. En 2011, le génome du polyomavirus humain 9 (HPyV9) a été isolé à partir du sérum d'un patient ayant subi une greffe de rein (Scuda *et al.*, 2011) et aussi sur la peau non lésionnelle d'un patient présentant un CCM (Sauvage *et al.*, 2011).

Les derniers polyomavirus humains identifiés depuis 2012 ont été isolés dans des prélèvements issus du tube digestif. La découverte du dixième polyomavirus humain reflète particulièrement l'intérêt actuel pour les *Polyomaviridae* en santé humaine. En effet, ce virus

a été découvert de manière concomitante par trois équipes différentes qui l'ont dénommé : polyomavirus Malawi (MWPyV (Siebrasse *et al.*, 2012)), polyomavirus humain 10 (HPyV10 (Buck *et al.*, 2012)) ou encore Mexico polyomavirus (MXPyV (Yu *et al.*, 2012)). Les deux derniers virus découverts dans le tube digestif humain sont : le polyomavirus Saint Louis (STLPyV) et le polyomavirus humain 12 (HPyV12) (Korup *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2013).

Depuis la découverte du MPyV en 1953, la recherche sur les polyomavirus a conduit à l'identification de plus de 38 virus, dont le génome a été entièrement séquencé (Tableau I). Ces virus infectent de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux sans être forcément associés à une pathologie chez leur hôte. Chez les mammifères, quatre sont reponsables de tumeur chez leur hôte naturel. Douze de ces virus infectent l'Homme, neuf les singes, six d'autres mammifères et six les oiseaux. Quatre autres virus appartiennent potentiellement à cette famille sur la base de leurs caractéristiques morphologiques et antigéniques. Cependant, ils n'ont pas été séquencés et ne sont pour le moment pas considérés comme appartenant à la famille (Tableau I).

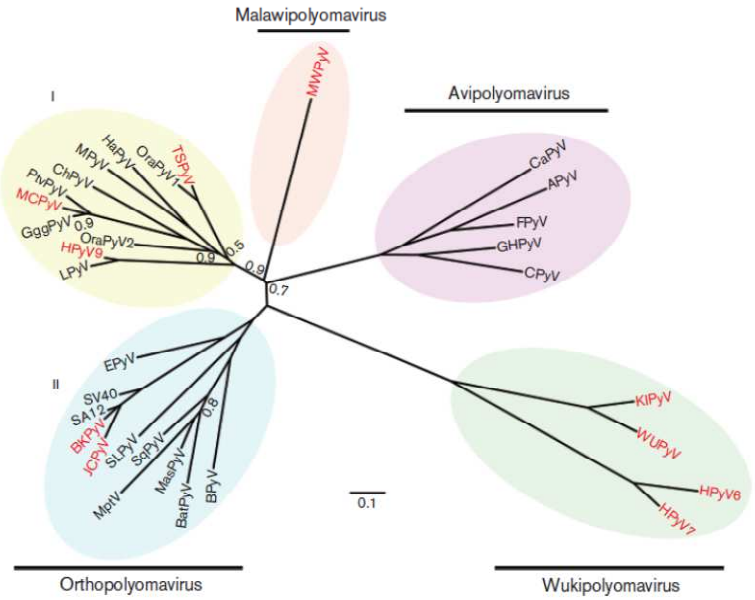


Figure 1 : Phylogénie des polyomavirus basée sur le génome complet (2014)

II. Taxonomie des polyomavirus

Jusqu'en 1999, les papillomavirus et les polyomavirus étaient regroupés dans la famille des *Papovaviridae*. Cette classification reposait sur des caractéristiques communes : petits virus nus, capside icosaédrique et un petit génome à ADN circulaire double brin. En 1999, du fait de grandes différences en termes de séquences nucléiques et d'organisation génomique, le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) a séparé l'ancienne famille des *Papovaviridae* en deux nouvelles familles : les *Papillomaviridae* et les *Polyomaviridae*. Les *Polyomaviridae* ont ensuite été divisés en trois groupes : le clade SV40, le clade murin et le clade aviaire (Pérez-Losada *et al.*, 2006).

Suite à la découverte d'un nombre croissant de polyomavirus, l'ICTV a recommandé, en 2010, d'actualiser la classification des polyomavirus. La famille a été divisée en trois genres : les *Avipolyomavirus*, les *Orthopolyomavirus* et les *Wukipolyomavirus* (Figure 1). Le genre *Avipolyomavirus* regroupent tous les polyomavirus d'oiseaux. Les *Wukipolyomavirus* regroupent quatre virus humains. Enfin, les *Orthopolyomavirus* regroupent les autres virus humains et tous les virus de mammifères (Johne *et al.*, 2011).

La classification des polyomavirus est en évolution perpétuelle du fait de l'explosion du nombre de virus découverts et les recommandations qui suggèrent de diviser les *Polyomaviridae* en trois genres semblent déjà obsolètes. A moduler avec l'arbre final En effet, les polyomavirus humains retrouvés dans le tube digestif (MWPyV, STLPyV et HPyV12) semblent appartenir à un quatrième genre. Cependant, l'ICTV n'a pas encore statué sur cette question et ce nouveau genre porte provisoirement le nom du premier virus découvert pour ce genre : *Malawipolyomavirus*.

III. Organisation génomique des polyomavirus

Le génome des polyomavirus est constitué d'un ADN double brin, circulaire, d'environ 5000 pb et associé aux histones cellulaires. Ce génome est divisé en trois régions fonctionnelles, une région régulatrice, une région codante précoce et une région codante tardive (Figure 2).

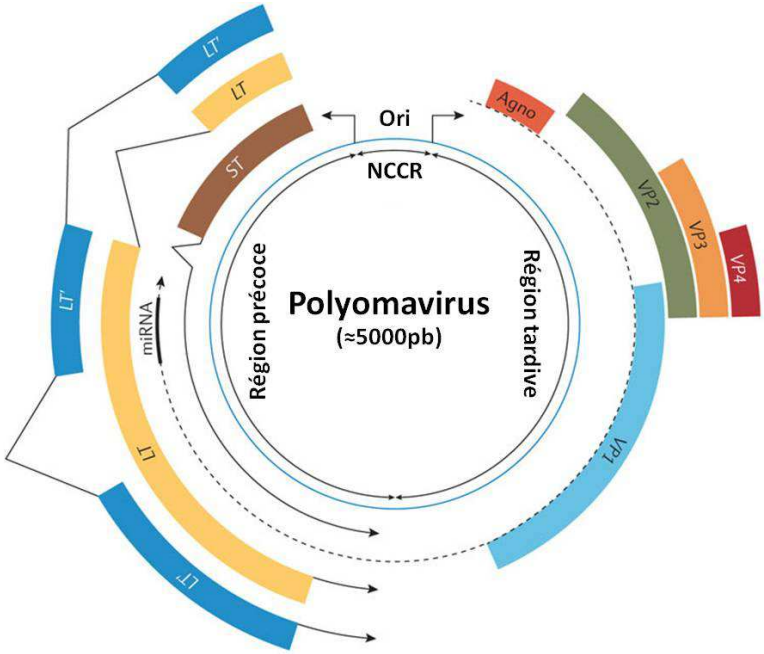


Figure 2 : Organisation génomique des *Polyomaviridae*. Le génome est un ADN bicaténaire circulaire, d'environ 5000 pb, divisé en trois régions. La région de contrôle non codante (NCCR) contient l'origine de réplication (Ori) et les promoteurs des régions précoce et tardive. La région précoce code l'antigène grand T (LT), l'antigène petit T (ST) issus d'un épissage alternatif. Les polyomavirus SV40, BKPyV, JCPyV et MCPyV codent un ou plusieurs antigènes LT additionnels (LT') obtenus avec d'autres épissages alternatifs. La région tardive code les protéines de capside, majeure (VP1) et mineures (VP2, VP3 et VP4). Les cadres de lecture des protéines VP2, 3 et 4 sont identiques mais la traduction est initiée sur des codons alternatifs. La VP4 n'est décrite que pour le SV40. Pour le SV40, le BKPyV et le JCPyV un transcrit tardif additionnel, code l'agnoprotéine (Agno), qui n'est pas retrouvée dans la particule virale. Chez certains polyomavirus, la région 3' non codante du messager tardif code des micro-ARN (miRNA). Adapté de (DeCaprio & Garcea, 2013).

III.1. Région précoce

La région précoce (early) code les oncoprotéines, les antigènes grand T (*Large T*, LT) et petit t (*Small T*, ST) (Figure 2). Ces deux antigènes, présents chez tous les polyomavirus, sont issus d'un épissage alternatif du messager précoce. L'expression de ces protéines commence avant la réplication du génome viral. Elles sont nécessaires à la réplication du génome viral, au contrôle de l'expression des gènes viraux et au contrôle du cycle cellulaire.

Les polyomavirus SV40, BKPyV, JCPyV et MCPyV codent des protéines précoces supplémentaires issues d'épissages alternatifs (Figure 3). Elles correspondent à des antigènes LT tronqués de leur partie C-terminale. Il s'agit du 17kT pour le SV40, du T-tronqué pour le BKPyV, des T'135, T'136 ou T'165 pour le JCPyV et du 57kT pour le MCPyV. Les fonctions de ces antigènes LT tronqués sont mal connues. *In vitro*, ces antigènes ne sont pas indispensables au cycle viral (Gjoerup & Chang, 2010).

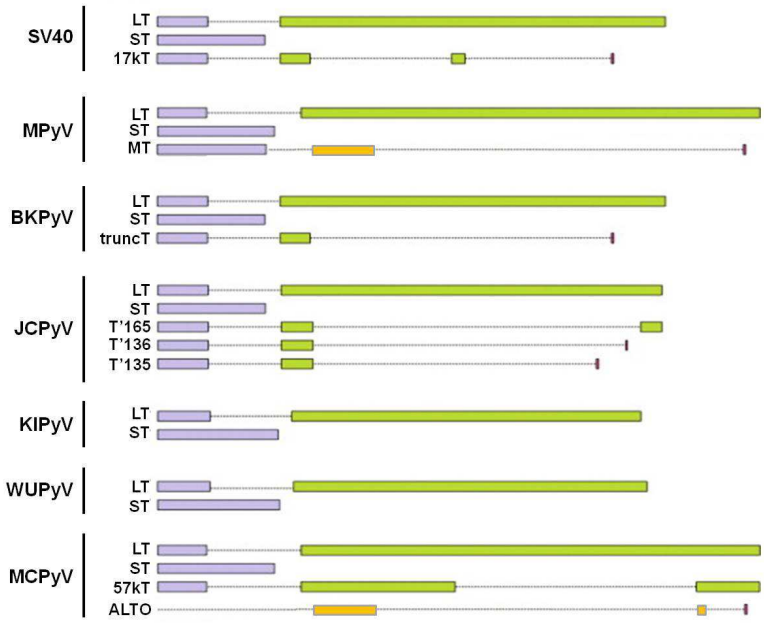


Figure 3 : Epissage des messagers antigènes T. Les rectangles symbolisent les séquences codantes et les lignes en pointillés indiquent les séquences épissées. Les différentes couleurs représentent les différents cadres de lecture après les évènements d'épissage. Les antigènes LT et ST sont communs à tous les polyomavirus. Certains polyomavirus codent pour des antigènes T accessoires dont la partie C-terminale correspond à des fragments de l'antigène LT. Le MPyV et le MCPyV codent chacun un antigène T supplémentaire dont la partie C-terminale n'a pas de communauté de séquence avec le LT. Adapté de (Gjoerup & Chang, 2010).

Les polyomavirus MPyV et HaPyV, quant à eux, codent pour un antigène supplémentaire, l'antigène moyen T (*middle T antigen* ou mT) (Figure 3). La partie N-terminale de cette protéine est commune avec l'Ag-ST, mais la partie C-terminale étant codée dans un autre cadre de lecture n'a aucune communauté de séquence avec les Ag-LT et ST. Pour ces deux virus, le mT est essentiel à la réplication virale et au contrôle du cycle cellulaire. Le MCPyV code un antigène supplémentaire, l'ALTO (*Alternate frame of the Large T Open reading frame*) dont la fonction n'a pour le moment pas été décrite (Carter *et al.*, 2013).

III.2. Région de contrôle non codante

La région de contrôle non codante (NCCR) contient l'origine de réplication virale (Ori) ainsi que les promoteurs des régions précoce et tardive. L'organisation génomique de la NCCR est très variable entre les polyomavirus.

La NCCR comprend une séquence riche en thymidine et adénosine, au niveau de laquelle est initiée la séparation des deux brins d'ADN. La NCCR comprend également de multiples copies de la séquence pentanucléotidique GAGGC ou de sa séquence reverse complémentaire GCCTC. Le nombre et la disposition de ces motifs sont variables selon les virus. Ces séquences constituent les sites de fixation pour l'antigène LT qui les reconnait grâce à son domaine de liaison à l'origine (OBD). Ces séquences sont impliquées, à la fois dans la réplication du génome viral et dans le contrôle de l'expression des protéines virales. L'origine de réplication comprend quatre copies successives de séquences pentanucléotidiques, deux en sens (GAGGC), deux autres sur le brin anti-sens.

Les promoteurs des régions précoce et tardive sont constitués d'éléments cis-activateurs *enhancer* telles que des répétitions en tandem. Le promoteur précoce contient une boîte TATA et le promoteur tardif, quant à lui, recrute en *trans* l'antigène LT.

III.3. Région tardive

La région tardive (*Late*) est exprimée après la réplication du génome. Elle code les protéines de capside, la protéine majeure de capside VP1 et les protéines mineures de capside VP2 et VP3, la protéine VP3 correspondant à une VP2 tronquée de sa partie N-terminale.

Concernant cette région, des différences sont à noter entre les polyomavirus aviaires et mammifères. La région tardive des polyomavirus de mammifères, code aussi des protéines non structurales. L'agnoprotéine est impliquée dans l'assemblage viral, la sortie du noyau cellulaire et la régulation transcriptionnelle. Une VP4 est présente chez le SV40. Elle correspond à une VP3 tronquée de sa partie N-terminale et n'est pas présente dans la particule virale. Chez les polyomavirus aviaires, la région tardive code une protéine structurale supplémentaire, la VP4 (différente de la VP4 des mammifères), qui est retrouvée au sein de la particule virale.

Pour certains polyomavirus, des micro-ARN sont codés par la région 3' non traduite des transcrits tardifs. Ces micro-ARN sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des messagers viraux (voir la partie VI.4).

IV. Structure de la particule virale

Les polyomavirus sont des petits virus à ADN, nus, avec une capside icosaédrique de 40 à 50 nm de diamètre (Figure 4A). Elle est constituée de 72 capsomères organisés selon une symétrie T=7d à l'image de la capside du SV40 (Figure 4B). Chaque capsomère est constitué d'un pentamère de la protéine majeure de capside VP1 et d'une protéine mineure de capside VP2 ou VP3 qui sont situées dans la cavité centrale du capsomère. La capside virale est donc composée de 360 protéines majeures de capside VP1 et de 72 protéines mineures de capside VP2/VP3. Dans la particule, le génome viral est associé aux histones cellulaires (H2a, H2b, H3 et H4) sous forme de chromatine super-enroulée (Figure 4C).

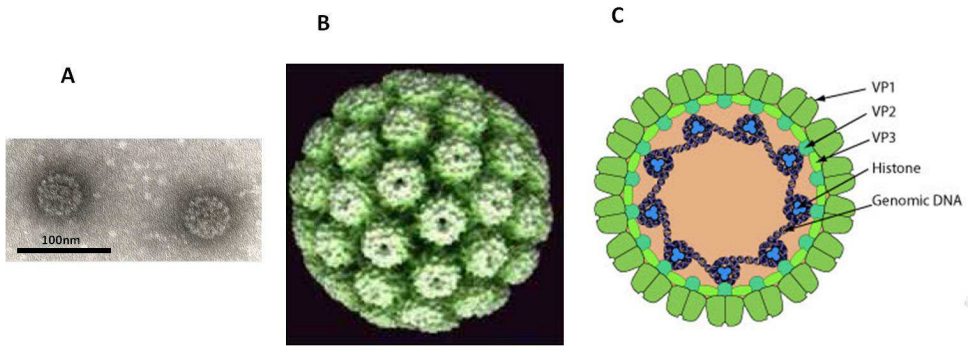


Figure 4 : Structure de la capside des polyomavirus. (A) Visualisation au microscope électronique de particules du BKPyV purifiées à partir de l'urine d'un patient ayant subi une greffe de rein (Photographie du Pr Pierre Lebon, laboratoire de virologie, hôpital Saint Vincent de Paul). **(B)** Reconstitution 3D d'une pseudo-particule virale de SV40 après analyse par cryo-microscopie électronique (d'après l'ICTV, http://ictvonline.org). **(C)** Organisation de la particule virale avec les protéines VP1, VP2 et VP3. L'ADN double brin est enroulé autour d'histones cellulaires. (D'après Swiss Institute of Bioinformatic, http://expasy.org).

IV.1. Protéine majeure de capside, VP1

Les monomères de VP1 sont constitués d'un bras N-terminal peu structuré qui contient un NLS canonique, d'une région core composée de huit feuillets β (nommés de B à I) et d'un long bras C-terminal. Les feuillets, organisés de manière antiparallèle (sandwich β), entraînent la formation des boucles BC, DE, EF et HI qui sont exposées à l'extérieur de la particule (Figure 5A). Ces boucles contiennent les épitopes majeurs inducteurs des anticorps neutralisants et présentent une grande variabilité entre les différents polyomavirus.

Au sein d'un pentamère, les monomères sont en contact au niveau de leurs feuillets β et forment un tonneau β (β-barrel) (Figure 5B). Les liaisons intercapsomériques sont assurées

par les bras C-terminaux des monomères qui envahissent la région core des capsomères voisins. Les interactions entre capsomères sont stabilisées par des liaisons ioniques coordinnées par un ion Ca^{2+} et des ponts disulfures inter-capsomères.

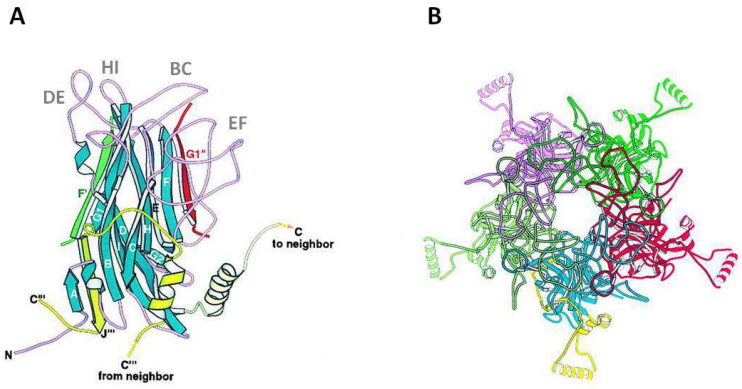


Figure 5 : Structure de la protéine majeure de capside du SV40. (A) Structure de la protéine VP1 obtenue en cristallographie et **(B)** d'un capsomère constitué d'un pentamère de VP1 (Adapté de (Chen *et al.*, 2000)).

IV.2. Protéines mineures de capside, VP2 et VP3

Le rôle des protéines VP2 et VP3 n'est pas clairement défini au cours du cycle viral. Il a été montré pour le JCPyV, que les protéines mineures de capsides sont nécessaires à l'assemblage et à l'encapsidation du génome viral (Gasparovic *et al.*, 2006). Au contraire, pour le SV40, les virions composés uniquement de la VP1 encapsident et protègent le génome aussi efficacement que les virions VP1/VP2/VP3 (Daniels *et al.*, 2006a; Nakanishi *et al.*, 2007). Les protéines mineures de capside ne sont pas impliquées dans l'attachement du virus aux cellules. L'infectiosité des virus est diminuée lorsque les VP2 et VP3 sont absentes mais le mécanisme par lequel elles participent au cycle viral n'est pas encore élucidé (Sahli *et al.*, 1993; Daniels *et al.*, 2006a; Gasparovic *et al.*, 2006; Nakanishi *et al.*, 2007).

La région N-terminale unique à la VP2 contient un motif consensus de myristoylation MGXXXS/T. La présence de cette modification post-traductionnelle a été vérifiée pour certains polyomavirus et il semble qu'elle soit impliquée dans le transport intracellulaire des particules et la lyse des cellules en fin de cycle viral (Krauzewicz *et al.*, 1990; Sahli *et al.*, 1993). De plus, l'extrémité C-terminale des VP2 et VP3 présente un domaine d'interaction avec la VP1 (Nakanishi *et al.*, 2006), un signal de localisation nucléaire (NLS) (Clever & Kasamatsu, 1991), ainsi qu'un domaine de fixation à l'ADN (Clever *et al.*, 1993).

IV.3. Pseudo-particules virales

Les protéines de structure peuvent être exprimées en systèmes d'expression eucaryotes (levure, baculovirus/cellules d'insecte, cellules de mammifères). Les protéines majeures de capside VP1, en présence ou en l'absence des VP2/VP3, sont capables de s'auto-assembler en structures appelées pseudo-particules virales (VLP) (An *et al.*, 1999; Sasnauskas *et al.*, 1999). La structure tridimensionnelle de ces particules recombinantes est similaire à celle des capsides virales natives (Figure 6).

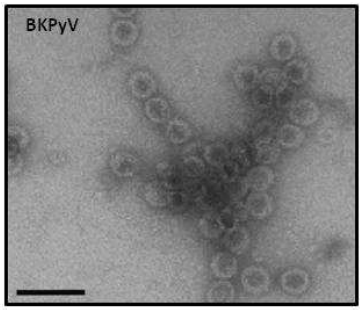


Figure 6 : Pseudo-particules virales (VLP) du BKPyV. Observation en microscopie électronique à transmission de VLP obtenues par expression du gène VP1 du BKPyV en système baculovirus/cellules d'insecte. La barre représente d'échelle représente 100nm (D'après (Touzé *et al.*, 2001)).

La réponse immune la plus forte est dirigée contre la protéine VP1 et en particulier contre les épitopes conformationnels présents sur les VLP. Ces VLP peuvent donc être utilisées pour réaliser des études séro-épidémiologiques. Ces VLP peuvent aussi se substituer aux virions pour étudier l'entrée des polyomavirus dans les cellules. En cellules de mammifères, la capacité des VP1 à s'auto-assembler en VLP peut être utilisée pour générer des pseudovirions par co-transfection de plasmides codant les protéines de structure et d'un plasmide rapporteur qui est encapsidé. Ces pseudovirions peuvent être utilisés pour étudier la capacité des anticorps à neutraliser les virus (Pastrana *et al.*, 2009).

De manière alternative, il est possible de produire, en système procaryote *(Escherichia coli)*, la VP1 fusionnée à la glutathione-S-tranferase (GST). Les VP1-GST purifiées par chromatographié d'affinité s'assemblent seulement en capsomères pentamériques et non en VLP. Les VP1 produites dans ce système portent aussi les boucles antigéniques et peuvent être utilisées pour réaliser des études séro-épidémiologiques (Kean *et al.*, 2009).

V. Domaines fonctionnels des oncoprotréines

V.1. Antigène grand T

L'antigène LT est une protéine nucléaire multifonctionnelle qui joue un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN viral et la transformation cellulaire. Historiquement, cette protéine tient son nom d'expérience réalisée par Rapp *et al.*, qui ont observé que des cellules de hamster transformées par le SV40 exprimaient un nouvel antigène : l'antigène de tumeur ou l'antigène T.

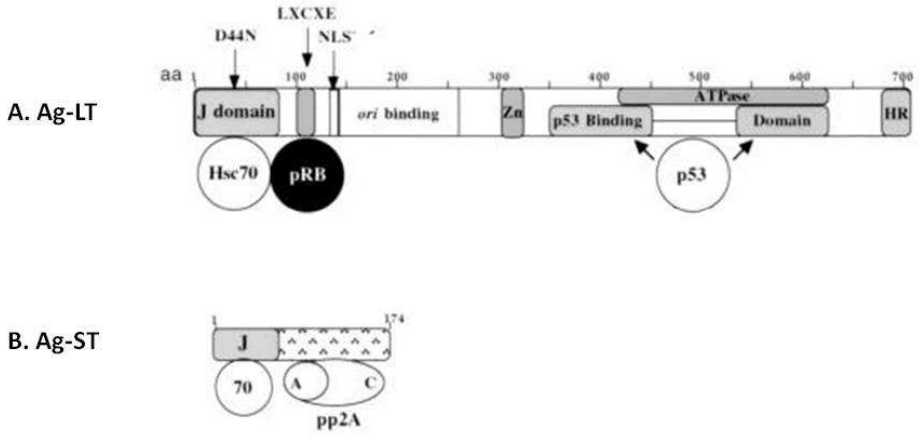


Figure 7 : Représentation schématique des domaines fonctionnels des antigènes T des polyomavirus.
(A) Domaines fonctionnels de l'antigène LT. Le domaine DnaJ fixe Hsc70 et le motif LXCXE fixe les protéines de la famille pRB. NLS : signal de localisation nucléaire, Zn : doigt de zinc. Les domaines hélicase ATPase et OBD sont nécessaires à la réplication virale. Le domaine de liaison à p53 est bipartite.
(B) Domaines fonctionnels de l'antigène ST. L'antigène ST présente le domaine DnaJ et un domaine de fixation à la phosphatase cellulaire 2 A (PP2A).
(D'après (Sullivan & Pipas, 2002))

Les domaines fonctionnels de l'Ag-LT sont conservés entre les polyomavirus de mammifères (Figure 7). La mise en évidence des propriétés de cet antigène est essentiellement basée sur des travaux portant sur le SV40. Les domaines fonctionnels du LT sont en N-terminal : un domaine DnaJ, un domaine de liaison à la pRb, un signal de localisation nucléaire (NLS), et en C-terminal : un domaine de liaison de l'origine de réplication (OBD), un domaine à doigt de zinc, un domaine hélicase-ATPase et un domaine de liaison à la p53 (Moens *et al.*, 2011).

V.2. Antigène petit T

La partie N-terminale étant commune entre les deux antigènes T, l'Ag-ST possède aussi le domaine DnaJ. La région unique à l'Ag-ST contient deux domaines à doigt de zinc qui sont impliqués dans la liaison à la protéine phosphatase cellulaire 2A (PP2A). Ces deux régions sont séparées par 30 à 40 aa qui sont très divergeants entre les différents polyomavirus. Cette région n'est pour le moment pas caractérisée et ses interactions avec des protéines cellulaires restent à établir. L'Ag-ST ne présente pas de NLS et sa localisation est à la fois nucléaire et cytoplasmique (Moens *et al.*, 2011).

VI. Cycle des polyomavirus

Les connaissances sur le cycle des polyomavirus proviennent de travaux portant essentiellement sur le SV40, le MPyV, le BKPyV et le JCPyV. Après son attachement à la cellule, le virus entre par des vésicules d'endocytose qui sont transportées vers le noyau grâce au cytosquelette. Une fois arrivées dans le noyau, les protéines précoces sont produites et le génome est répliqué. Au cours de la phase tardive, les protéines de structure sont exprimées, le génome est encapsidé et les nouveaux virions sont libérés (Sapp & Day, 2009).

VI.1. Entrée du virus

VI.1.1. Attachement aux récepteurs cellulaires

Les polyomavirus étant nus, c'est la protéine majeure de capside VP1, la seule protéine exposée à la surface de la particule virale, qui est impliquée dans l'attachement à la membrane plasmique.

Les polyomavirus s'attachent à la membrane cellulaire en reconnaissent des acides sialiques présents sur les gangliosides (Tableau II).

Tableau II : Récepteurs cellulaires des polyomavirus

Polyomavirus	*Récepteur ganglioside*	*Autre récepteur*
MPyV	Acide sialique lié en α2,3 des gangliosides GD1a et GT1b	
SV40	GM1	CMH de classe I
BKPyV	Acide sialique lié en α2,8 des gangliosides GD1b et GT1b	
JCPyV	Acide sialique lié en α2,3 du ganglioside GT1b	5HT2A
MCPyV	Acides sialiques lié en α2,3 et α2,8 du ganglioside GT1b	

Biochimiquement, les gangliosides sont des glycolipides constitués d'un domaine céramide enchâssé dans la membrane plasmique et de chaines oligosaccharidiques terminées par des acides sialiques. Au niveau de la membrane plasmique, ces gangliosides sont concentrés au niveau de radeaux lipidiques. Le SV40 reconnaît le ganglioside GM1 et le MPyV, les gangliosides GD1a et GT1b (Tsai, 2003). Le BKPyV se fixe aux gangliosides GT1b et GD1b (Low *et al.*, 2006). Les virus JCPyV et le MCPyV reconnaissent le

ganglioside GT1b (Erickson *et al.*, 2009; Komagome *et al.*, 2002) (Tableau II). Des études de co-cristallisation ont montré que les gangliosides se fixent dans une poche formée par les boucles BC, DE et HI grâce à des liaisons hydrogènes et salines (Neu *et al.*, 2008, 2012).

En dehors des gangliosides, il a aussi été montré que le BKPyV et le JCPyV peuvent fixer des acides sialiques présents sur des protéines N-glycosylées (Dugan *et al.*, 2005, 2007). Plus particulièrement, le JCPyV se fixe sur le récepteur à la sérotonine 5HT2A, une protéine exprimée exclusivement dans le tissu cérébral ce qui pourrait expliquer le tropisme de ce virus associé à la LEMP (Elphick *et al.*, 2004).

VI.1.2. Trafic intracellulaire

Une fois fixés sur leur récepteur, les Polyomavirus utilisent majoritairement la voie d'endocytose cavéole-dépendante pour entrer dans les cellules (Figure 8). Cette voie nécessite le recrutement des particules virales au niveau de radeaux lipidiques qui sont recouverts de cavéoline. Les interactions protéines-lipides induisent une cascade de transduction de signal qui aboutit à l'internalisation des particules dans de petites vésicules non hérissées de pH neutre dont la membrane contient de la cavéoline. Ces vésicules, transportées par des filaments d'actines gagnent ensuite le cavéosome avec lequel elles fusionnent. Cette voie est utilisée par le SV40, le BKPyV et le MPyV (Figure 8). Cependant, le MPyV transite par les endosomes précoces avant de rejoindre le cavéosome (Eash *et al.*, 2004; Gilbert & Benjamin, 2004; Kartenbeck *et al.*, 1989; Pelkmans *et al.*, 2001).

Le JCPyV, quant à lui, utilise une voie d'endocytose dépendante de la clathrine pour entrer dans les cellules (Pho *et al.*, 2000) (Figure 8). Après interaction avec son récepteur, la particule virale est internalisée dans des vésicules fusionnant avec des endosomes précoces à pH acide puis les vésicules sont transportées vers le cavéosome le long des microtubules (Querbes *et al.*, 2004, 2006). Le transport du JCPyV par le cavéosome est atypique. En effet, les virus qui transitent par les endosomes précoces rejoignent généralement le RE via des endosomes tardifs (Sapp & Day, 2009).

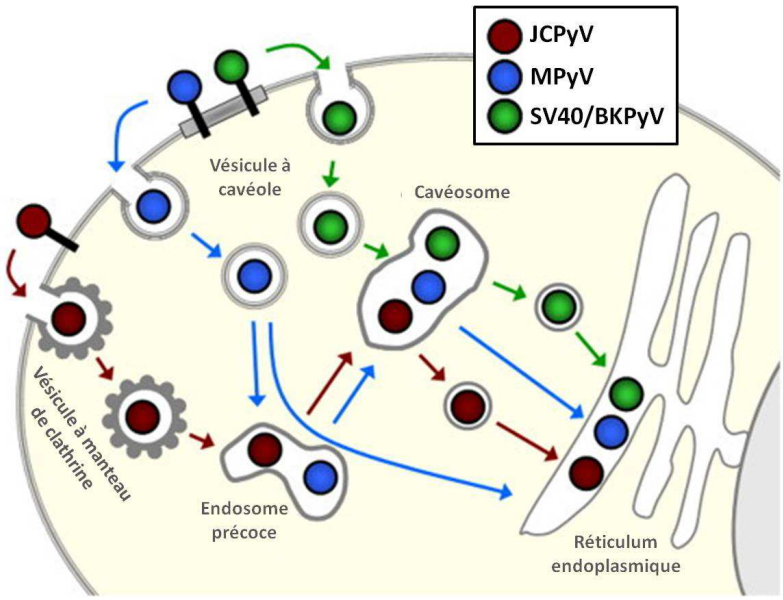


Figure 8 : Transport intracellulaire des polyomavirus. Le SV40 et le BKPyV (en vert) sont endocytés dans des vésicules à cavéole. Ces vésicules sont transportées vers le cavéosome avec lequel elles fusionnent. Les particules virales, dans de nouvelles vésicules, sont ensuite dirigées vers le RE. Le MPyV (en bleu) est aussi endocyté dans des vésicules à cavéoles. Les particules sont transportées vers les endosomes précoces, puis vers le cavéome et enfin vers le RE. Les vésicules contenant le MPyV peuvent aussi utiliser une voie alternative, où, après leur passage dans les endosomes précoces, les particules sont dirigées directement vers le RE sans passer par le cavéosome. Le JCPyV (en rouge) est endocyté dans des vésicules à manteau de clathrine qui sont dirigées vers les endosomes précoces, puis le cavéosome et enfin vers le RE. Adapté de (Sapp & Day, 2009).

Les particules virales quittent le cavéosome dans de nouvelles vésicules qui sont transportées vers le RE grâce aux microtubules (Gilbert & Benjamin, 2004; Gilbert *et al.*, 2003; Pelkmans *et al.*, 2001; Querbes *et al.*, 2006) (Figure 8). Le processus précis par lequel le génome seul ou la particule entière gagne le noyau reste largement mal connu. Il a été montré que la VP2 n'est pas accessible aux anticorps au sein de la particule native alors que celle-ci devient détectable dans le RE. Il semble donc que le virus serait décapsidé dans le RE.

Le rôle des protéines mineures dans le transport intracellulaire du virus n'est pas encore clairement défini. La VP2 étant myristoylée, elle déstabiliserait la membrane du RE ce qui suggère qu'elle pourrait permettre au virus de sortir de celui-ci (Daniels *et al.*, 2006a, b).

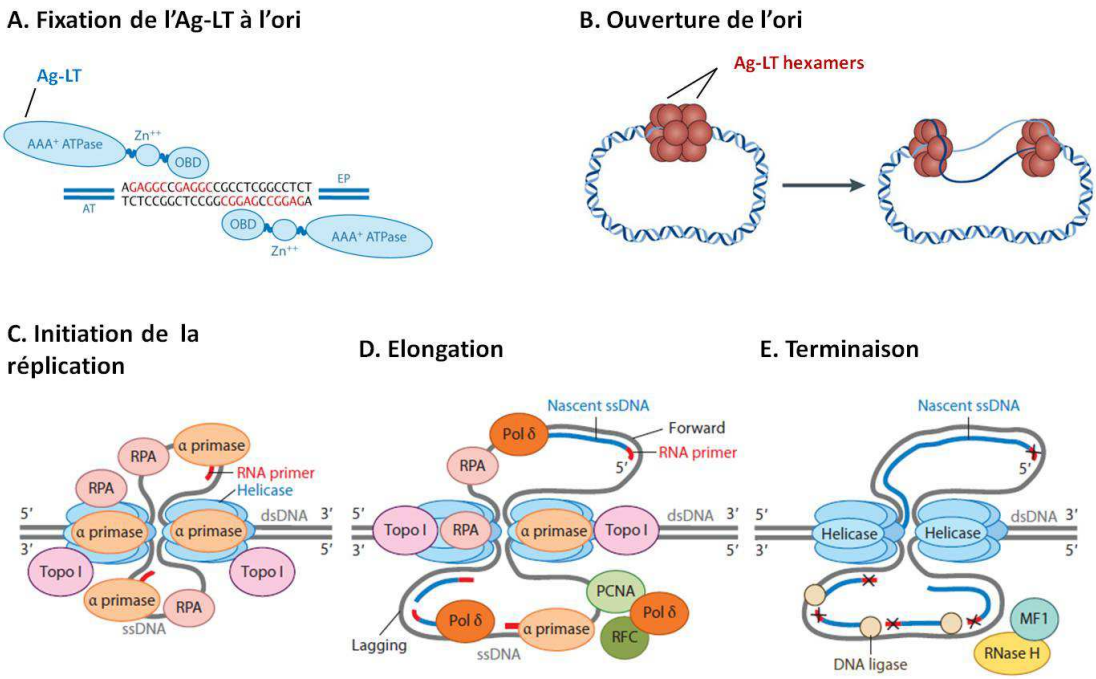


Figure 9 : Réplication du génome des polyomavirus.
(A) Les monomères d'Ag-LT reconnaissent les motifs pentamériques de l'origine de réplication ori (ori).
(B) Deux hexamères d'Ag-LT s'organisent face à face sur l'ori. L'activité hélicase de l'Ag-LT permet d'ouvrir l'ADN bicaténaire pour initier une fourche de réplication bidirectionnelle.
(C) Les hexamères d'Ag-LT (en bleu) recrutent les facteurs cellulaires nécessaires à l'initiation de la réplication du génome viral, la topoisomérase I (Topo I), la protéine de réplication A (RPA) qui fixe et stabilise l'ADN simple brin, et l'ADN polymérase α (α primase) qui synthétise les amorces ARN (en rouge).
(D) L'élongation de la fourche de réplication continue grâce à l'activité hélicase de l'Ag-LT et au recrutement de la Topo I, de la RPA et de l' α primase. Le facteur de réplication C (RCF) et l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) facilitent le recrutement de l'ADN polymérase δ (Pol δ) qui synthétise le nouveau brin d'ADN (en bleu) à partir des amorces ARN.
(E) Lors de l'étape de terminaison de la synthèse de l'ADN, la RNase H et le facteur de maturation 1 (MF1) éliminent les amorces. Les lacunes sont comblées par la pol δ et les cassures sont réparées par la ligase.
(Adapté de (DeCaprio & Garcea, 2013; An *et al.*, 2012))

VI.2. Expression des protéines précoces et réplication du génome viral

L'expression des protéines précoces commence avant la réplication du génome viral. Cette transcription nécessite des éléments *cis* activateurs viraux, promoteur et *enhancer* ainsi que des facteurs *trans* activateurs cellulaires. La présence de la boîte TATA permet de recruter les facteurs de transcription et l'ARN polymérase II (Benoist & Chambon, 1981). L'épissage alternatif de l'unique ARN messager précoce est à l'origine des différents messagers antigènes T. L'antigène LT est le pilier du contrôle de la réplication du génome viral et de la prise de contrôle du cycle cellulaire.

Les antigènes LT néo-synthétisés dans le cytoplasme sont dirigés vers le noyau grâce à la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS). L'antigène T, par l'intermédiaire de son domaine OBD, se fixe sur l'ORI au niveau des séquences pentamériques. Après leur fixation sur l'ORI, les monomères d'Ag-LT s'organisent en deux hexamères. Cette hexamérisation nécessite (i) la fixation des monomères sur l'ORI, (ii) des interactions protéine-protéine médiées par les domaines à doigt de zinc ainsi que (iii) de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Figure 9A et B). De par leurs activités hélicase et ATPses, les complexes Ag-LT séparent les deux brins d'ADN et la réplication du génome s'organise autour d'une fourche de réplication bidirectionnelle. L'antigène T est capable de recruter l'ADN polymérase primase α, la topoisomérase et la protéine de réplication A nécessaires à la réplication du génome viral (Figure 9C). La progression de la fourche de réplication aboutit à la formation de deux génomes viraux néo-synthétisés (Figure 9D et E) (DeCaprio & Garcea, 2013; An *et al.*, 2012).

L'antigène T, de par sa capacité de liaison à l'ADN, effectue un rétrocontrôle négatif sur la transcription des messagers précoces. En effet, sa fixation à l'ORI, dans la région enhancer des messagers précoces empêche la formation du complexe d'initiation de la transcription (Rio & Tjian, 1983; Das & Salzman, 1985).

La réplication du génome des polyomavirus repose sur l'utilisation d'enzymes cellulaires et de cofacteurs, protéines qui sont exprimées lors de la phase S du cycle cellulaire. L'antigène LT, en plus de ses fonctions indispensables à la réplication du génome est capable de moduler les voies de signalisation cellulaire pour induire le passage des cellules

quiescentes en phase S. L'antigène LT fait progresser le cycle cellulaire grâce à sa capacité à se lier à plusieurs protéines cellulaires qui sont impliquées dans des voies de transduction du signal qui contrôlent la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. Le rôle de l'antigène ST lors de cette phase précoce de l'infection est moins caractérisé. Cependant, tout comme l'Ag-LT, l'Ag-ST est capable de moduler le cycle cellulaire pour favoriser la réplication du génome viral (Moens *et al.*, 2011; An *et al.*, 2012).

VI.3. Expression des protéines tardives, encapsidation et libération des particules virales

La transcription de la région tardive nécessite en *cis* le promoteur et en *trans* des facteurs cellulaires mais aussi un facteur viral, l'antigène LT. Contrairement à la région précoce, le promoteur tardif ne présente pas de boîte TATA. Ce promoteur requiert la présence de l'antigène LT pour être actif, ce qui explique le contrôle temporel des transcriptions précoce et tardive. De plus, après la réplication du génome viral, l'Ag-LT réprime sa propre expression et les complexes nécessaires à la transcription sont déplacés en faveur de la région tardive (White *et al.*, 2009).

Les protéines tardives sont produites à partir d'un même ARN pré-messager polycistronique qui subit un épissage alternatif. Le messager épissé permet de produire la protéine majeure de capside VP1. Les protéines mineures de capside VP2 et VP3 sont produites à partir du même messager non épissé, dans la même phase de lecture, mais avec des codons d'initiation différents. Une fois produits, les monomères de VP1 s'organisent en capsomères dans le cytoplasme tout en incorporant VP2 ou VP3. Les capsomères sont ensuite dirigés vers le noyau où ils s'auto-assemblent en virions en encapsidant les génomes viraux associés aux histones cellulaires (Ishii *et al.*, 1994; Nakanishi *et al.*, 2006).

Le génome viral ne semble pas comprendre de séquence d'encapsidation spécifiquement reconnue par les protéines de structure. L'encapsidation du génome repose plutôt sur une concentration nucléaire élevée en génome viral (Spanielová *et al.*, 2014). Du point de vue de la VP1, les 12 aa N-terminaux, chargés positivement, sont indispensables à l'interaction protéine-ADN. Cependant, cette interaction n'est pas spécifique d'une séquence d'ADN précise (Ou *et al.*, 2001; Spanielová *et al.*, 2014). Si le rôle de la VP1 est évident en

ce qui concerne l'encapsidation du génome viral, le rôle des VP2 et VP3 est moins clair. Les protéines mineures pourraient apporter de la spécificité dans l'encapsidation du génome viral. Cette hypothèse est soutenue par le fait que, VP2 et VP3 interagissent avec le facteur de transcription Sp1, qui interagit lui même avec le génome. L'interaction VP1-VP2/3-Sp1-ADN, permettrait d'apporter une certaine spécificité dans l'encapsidation du génome viral. Sp1 est ensuite éliminé de la particule virale par un mécanisme inconnu (Gordon-Shaag *et al.*, 2002; Roitman-Shemer *et al.*, 2007). Par ailleurs, les protéines mineures ont peut être un rôle dans la maturation conformationnelle des particules. En effet, en présence de VP2 ou VP3, les particules sont plus régulières (Kawano *et al.*, 2006).

La libération des virions se produit par lyse ou apoptose de la cellule infectée. Des travaux récents réalisés sur les VP2, VP3 et VP4 du SV40 montrent que ces protéines semblent agir comme des viroporines grâce à un domaine hydrophobe qui leur permet de s'insérer dans les membranes et former des pores (Giorda *et al.*, 2013; Raghava *et al.*, 2011). Une fois encore, la VP2, de par son groupement myristyle, déstabilise les membranes cellulaires et pourrait induire la lyse de la cellule hôte (Daniels *et al.*, 2006b).

Certains polyomavirus de mammifères codent des protéines tardives additionnelles. La région tardive du SV40, du BKPyV et du JCPyV code une agnoprotéine. Le rôle de ces protéines n'est pas encore clairement défini. Elles ne sont pas retrouvées dans la particule virale et participeraient à la maturation et à la libération des virions (Gerits & Moens, 2012).

Les polyomavirus aviaires, en plus des VP1, 2 et 3, codent une VP4. Malgré son nom, elle ne présente aucune homologie de séquence avec la VP4 du SV40. L'ORF de cette protéine, aussi appelée agnoprotéine 1a, est localisée au niveau des agnoprotéines des virus mammifères sans pour autant présenter d'homologies avec celles-ci. Il a été montré pour l'APyV que la VP4 fait partie intégrante de la particule virale. Elle participe à l'encapsidation du génome et induit l'apoptose des cellules infectées à la fin du cycle viral (Johne *et al.*, 2000; Johne & Müller, 2001; Johne *et al.*, 2007).

VI.4. Régulation post-transcriptionnelle par les Micro-ARN viraux

La présence de micro-ARN viraux (vmi-ARN) a été mise en évidence pour le SV40, le MPyV, le BKPyV, le JCPyV et le MCPyV (Bauman *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2009; Sullivan *et al.*, 2005, 2009). Bien que les séquences de ces vmi-ARN ne soient pas homologues, leur fonction est conservée entre ces différents virus. Ces vmi-ARN, étant codés par la partie 3' non codante du transcrit tardif, ils sont complémentaires des ARN messagers précoces (Figure 2). Le ciblage des transcrits précoces provoque ainsi leur clivage et donc la diminution du niveau d'expression des antigènes LT et ST. A la fin du cycle viral, les vmi-ARN participent ainsi à la régulation négative de l'expression des protéines précoces. L'Ag-LT étant nécessaire à la transcription des gènes tardifs, ces vmi-ARN participent aussi au rétro contrôle négatif de l'expression des protéines tardives. Il a été suggéré que l'extinction de l'expression de l'ensemble des messagers viraux pourrait permettre aux virus d'échapper au système immunitaire. Il a aussi été suggéré que les vmi-ARN pourraient participer activement à cet échappement en ciblant des transcrits cellulaires (Bauman *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2009; Sullivan *et al.*, 2005).

VII. Pouvoir oncogène des polyomavirus

VII.1. Pouvoir oncogène des polyomavirus *in vivo* et *in vitro*

Suite à la découverte des premiers polyomavirus, leur rôle dans l'oncogenèse viro-induite a rapidement été établi. En effet, le MPyV et le HaPyV induisent des tumeurs chez leur hôte naturel. Par la suite, il a été montré que l'inoculation du SV40 à des hamsters induisait le développement de cancers tels que des leucémies, des lymphomes, des ostéosarcomes et des mésotéliomes (Cicala *et al.*, 1993; Diamandopoulos, 1972). De plus, l'antigène LT est capable de transformer des lignées primaires humaines *in vitro* (Todaro & Takemoto, 1969). Le SV40 s'est alors imposé comme modèle dans l'étude des propriétés oncogéniques des antigènes LT et ST des polyomavirus. Après la découverte des premiers polyomavirus humains, le potentiel oncogène du BKPyV et du JCPyV a aussi été confirmé chez les rongeurs (White & Khalili, 2004).

VII.2. Modèle SV40

L'antigène LT opère des modifications majeures sur les cellules, modifications qui sont directement liées à l'oncogenèse viro-induite. En effet, les polyomavirus sont dépendants de la machinerie cellulaire pour répliquer leur génome. Cependant, ces virus infectent généralement des cellules quiescentes qui ne produisent naturellement pas les enzymes et les cofacteurs nécessaires à la multiplication cellulaire. Les polyomavirus sont capables, grâce à leur antigène LT, de forcer les cellules à entrer en phase S, et ainsi pouvoir disposer de la machinerie cellulaire nécessaire à la réplication du génome viral. L'antigène ST participe lui aussi à la transformation cellulaire même si son rôle est moins important que celui du LT. Les polyomavirus via leurs antigènes LT et ST interagissent avec les protéines cellulaires piliers du contrôle cellulaire (Figure 10).

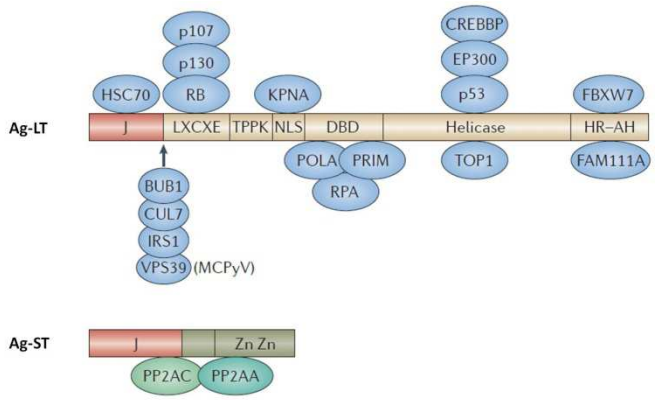


Figure 10 : Partenaires cellulaires des oncogènes LT et ST. D'après (DeCaprio & Garcea, 2013)

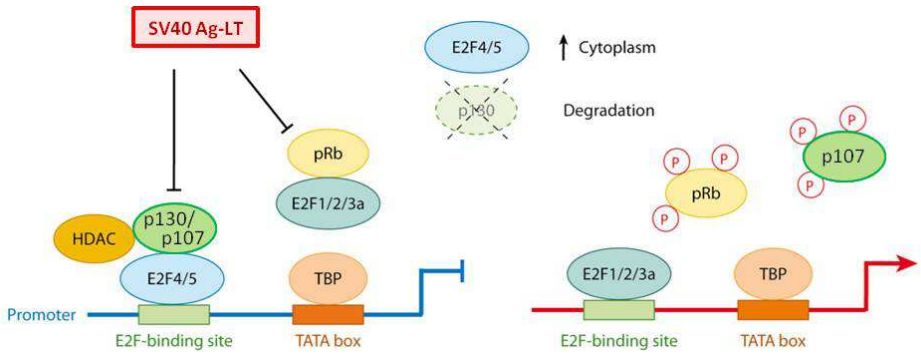


Figure 11 : Inactivation des suppresseurs de tumeurs de la famille pRB par l'antigène LT.
Les protéines de la famille pRB (pRB, p107 et p130) empêche la progression du cycle cellulaire. La pRB sous forme hypophosphorylée séquestre les facteurs de transcription E2F1, E2F2, E2F3a nécessaires à la transcription des gènes impliqués dans la transition de la phase G1 à la phase S. Les p107 et p130 complexées avec les E2F4 ou 5 agissent comme des répresseurs de la transcription en bloquant les promoteurs dépendant des E2F. Ce complexe recrute aussi des histones deactylases (HDAC) qui contribuent au blocage de la transcription. Les pRB bloquent ainsi le cycle cellulaire en phase G1. En présence de stimuli de croissance cellulaire, les cyclines dépendantes de kinase phosphorylent la pRB libérant ainsi les E2F activateurs (E2F1-E2F3a). La phosphorylation des p107 et p130 rompt les complexes qu'elles forment avec les E2F répresseurs (E2F4-E2F5). Les E2F1-3 active ensuite la transcription des gènes nécessaires à l'entrée en phase S.
L'Ag-LT du SV40, grâce à son motif LXCXE, fixe les pRB. De part son domaine DnaJ, l'Ag-LT recrute la Hsc70 qui phosphoryle les pRB. Les complexes répresseurs sont rompus et les E2F activateurs induisent la progression en phase S.
(Adapté de (An *et al.*, 2012))

VII.2.1. Inhibition de suppresseurs de tumeurs

VII.2.1.1. pRB

L'antigène LT est capable de lier et d'abolir les fonctions des protéines de la famille des suppresseurs de tumeur du rétinoblastome pRB, p107 et p130. Le rôle de cette famille de protéines est de réguler négativement le cycle cellulaire en interagissant avec les facteurs de transcription de la famille E2F (E2F1-E2F8). Ces facteurs de transcription contrôlent la transactivation des gènes nécessaires à l'entrée des cellules en phase S et à la synthèse des facteurs impliqués dans la réplication du génome cellulaire. Les E2F activateurs (E2F1, E2F2 et E2F3a) sont séquestrés par la pRB. Les E2F4 et E2F5 ont quant à eux, un rôle répresseur de la transcription lorsqu'ils sont associés à la p107 ou la p130. L'activité des pRB est conditionnée par leur niveau de phosphorylation. En présence de stimuli de croissance cellulaire, la pRB passe de sa forme hypo- à hyper-phosphorylée sous l'action des cyclines, libérant ainsi les E2F (Figure 11). La libération des E2F conduit à la production des facteurs impliqués dans la progression du cycle cellulaire (cyclines A et E et kinase dépendante de cyclines 2), dans la réplication du génome (ADN polymérase α) et des proto-oncogènes c-myc et c-fos.

L'antigène LT, de part son motif LXCXE est capable de fixer les différentes pRB au niveau de leur domaine de liaison aux E2F, dissociant ainsi les complexe pRB-E2F (Figure 11). L'inactivation des pRB, ne repose pas uniquement sur leur séquestration par l'antigène LT mais aussi sur la modification de leur niveau de phosphorylation. Le domaine J de l'antigène LT est capable de recruter la protéine cellulaire HSC70 qui phosphoryle les pRB en hydrolysant de l'ATP. Ces formes hyper-phosporylées sont inactives et les facteurs de transcription E2F1-E2F3a libérés peuvent alors promouvoir l'entrée des cellules en phase S (An *et al.*, 2012).

VII.2.1.2. p53

La p53, est un facteur de transcription pro-apoptotique qui induit l'arrêt du cycle cellulaire, empêche la synthèse de l'ADN et provoque l'apoptose. La p53 est ubiquitaire, son niveau d'expression dans une cellule normale est faible et sa demi-vie est très brève. La dégradation de p53 est pilotée par l'E3 ubiquitine ligase Mdm2. En condition de stress (irradiation, dommages à l'ADN, infection virale), Mdm2 est inactivée, la p53 devient stable et sa concentration intracellulaire augmente. La p53 conduit entre autre à l'expression de la p21 (inhibiteur de cycline dépendante de kinase), de Bax et de Mdm2 (Figure 12).

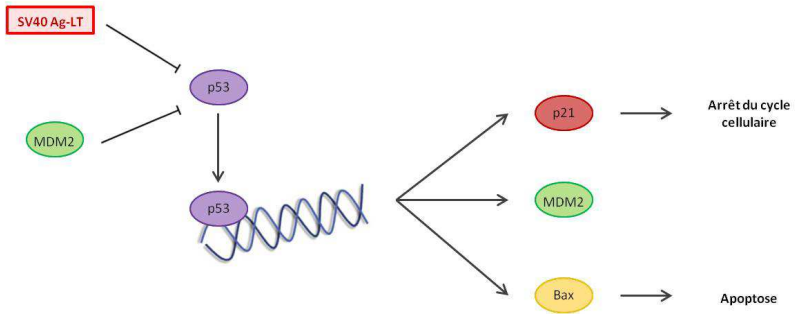


Figure 12 : Inactivation de la p53 par l'antigène LT. En condition de stress (dommages à l'ADN), la p53 devient stable et transactive des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. La p21 est un inhibiteur de cycline qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire. En cas de dommages à l'ADN irréversibles, la p53 continue à s'accumuler et conduit aussi à l'expression de la protéine pro-apotototique Bax (Bcl2 associated protein X). (Adapté de (Topalis *et al.*, 2013)).

L'antigène LT du SV40, grâce à son domaine de fixation à la p53 est capable de la séquestrer et donc de bloquer ses fonctions transactivatrices pro-apoptotiques (Figure 12) (Topalis *et al.*, 2013). L'Ag-LT est donc capable de stimuler la croissance cellulaire tout en supprimant les voies essentielles de contrôle de l'intégrité cellulaire et d'induction de l'apoptose.

Via son interaction avec p53, l'Ag-LT interagit aussi les p300 et CBP qui sont des co-activateurs impliqués entre autre dans la transcription p53 dépendante. L'interaction avec les p300 et CBP pourrait ainsi conduire à renforcer le rôle anti-apoptotique de l'Ag-LT. Il a aussi été montré que cette interaction conduit à l'acétylation de l'Ag-LT. Concernant le SV40, le rôle de cette acétylation reste à déterminer. Par ailleurs, pour le MPyV, l'acétylation de l'Ag-LT est nécessaire à la réplication du génome viral (DeCaprio & Garcea, 2013).

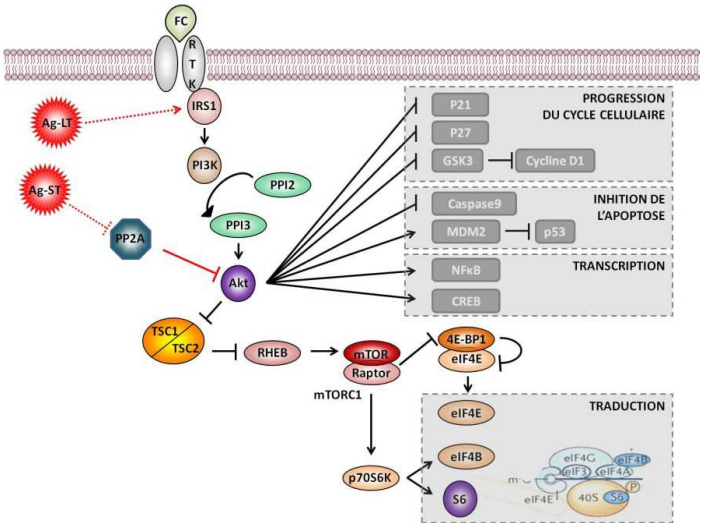


Figure 13 : Activation de la voie de signalisation PI3K-Akt par les oncogènes viraux.
L'activation, par exemple par des facteurs de croissance, passe par des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (RTK), qui mènent séquentiellement à l'activation de la PI3K puis de Akt. La protéine Akt phosphorylée inhibe le complexe TSC1/2, ce qui permet de lever sa répression sur la Rheb-GTPase, qui active le complexe mTOR/Raptor (mTORC1). Les 2 substrats de mTORC1 sont 4E-BP1 (qui à l'état non phosphorylée séquestre eIF4E) et p70S6K. La p70S6K activée, active à son tour eIF4B et la S6 de la sous-unité ribosomale 40S. L'activation de mTORC1 permet alors la formation d'un complexe d'initiation de la traduction complet cap dépendant.
Akt activée est aussi capable de promouvoir la progression du cycle cellulaire et de bloquer l'apoptose. La PP2A est une phosphatase essentielle à la régulation négative de la voie Akt car elle déphosphoryle Akt.
Les oncogènes viraux activent la voie de signalisation Akt-mTOR. En déstabilisant le complexe PP2A, l'Ag-ST est capable de lever le contrôle négatif que celui-ci exerce sur Akt. L'Ag-LT, quant à lui peut activer la voie PI3K-Akt en interagissant avec l'adaptateur cytoplasmique IRS1.

RTK	: récepteur tyrosine kinase	PI3K	: phosphoinositide 3 kinase
PIP2	: phosphatidyl 4,5 inositol diphosphate	PIP3	: phosphatidyl 3,4,5 inositol triphosphate
TSC	: Tuberous Sclerosis Complex	mTOR	: mammalian target of Rapamycine
4E-BP1	: eIF4E- binding protein	S6K1	: ribosomal protein S6 kinase 1
eIF	: eukaryotic initiation translation factor	p21, p27	: inhibiteur de cycline
IRS 1	: Insuline receptor substrate 1	FC	: facteur de croissance

VII.2.1.3. PP2A

La serine / thréonine protéine phosphatase A (PP2A) est la cible majeure de l'antigène ST. Cette phosphatase est un acteur majeur de la régulation négative des voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire et la traduction. En réalité, la PP2A est un complexe enzymatique hétéro-trimérique constitué de sous-unités structurales A, catalytiques C et régulatrices B. Il existe une très grande diversité des sous-unités régulatrices B et celles-ci sont responsables de la spécificité de substrat. La PP2A, de par sa diversité de substrat contrôle de nombreuses voies de signalisation et est considérée comme un suppresseur de tumeurs. A titre d'exemple, la PP2A exerce un contrôle négatif sur la voie Akt, une voie dérégulée dans de nombreux cancers et par de nombreux virus.

L'antigène ST est capable de fixer indépendamment les sous-unités A et B ce qui prévient la formation du complexe enzymatique PP2A. Par l'inactivation de la PP2A, l'antigène ST active différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire. Par exemple, l'inactivation de PP2A lève la répression de la voie Akt (Figure 13). L'activation de cette voie conduit à la libération des facteurs de traduction nécessaires à la synthèse des protéines et à la progression du cycle cellulaire. Par ailleurs, il a été observé que l'Ag-LT interagit avec l'adaptateur cytoplasmique IRS1 qui est impliqué dans la boucle de rétrocontrôle négatif de la voie PI3K-Akt. Il a été postulé que le complexe Ag-LT/IRS1 pourrait induire la transduction du signal de la voie PI3K-Akt et/ou inhiber le rétrocontrôle négatif exercé par IRS1.

VII.2.2. Autres partenaires cellulaires

L'Ag-LT du SV40 interagit avec Cul7, un membre du complexe E3 Ubiquitine ligase SCF (Skp1, culine, F-box). La cycline D1 ainsi que l'adaptateur IRS1 de la voie PI3K-Akt sont des cibles de la dégradation médié par Cul7. A l'heure actuelle, la fonction apportée par cette interaction Ag-LT/Cul7 demeure hypothétique. Il est possible que cette interaction conduise simplement à une séquestration de Cul7 et donc à la stabilité des cibles. Il a aussi été suggéré que l'Ag-LT puisse rediriger l'action du complexe ubiquitine ligase sur d'autres substrats.

L'Ag-LT du SV40 interagit aussi avec Bub1 et Nsb1 qui sont impliquées dans les voies de contrôle et de réparation des dommages à l'ADN. En cas de dommages à l'ADN, ces

protéines sont capables de stopper la progression du cycle cellulaire et de conduire à l'apoptose. La séquestration de Nsb1 et Bub1 par l'Ag-LT pourrait contribuer à la prolifération cellulaire sans surveillance des dommages à l'ADN et cela, au profit de la réplication virale.

VIII. Pouvoir pathogène des polyomavirus chez l'animal

VIII.1. Les Polyomavirus aviaires

Six polyomavirus sont actuellement décrits chez les oiseaux. Contrairement à ce qui est rapporté pour les polyomavirus de mammifères, les primo-infections chez les oiseaux sont des infections symptomatiques aigues souvent mortelles chez les oisillons.

Le *Budgerigar fledgling disease virus* (BFDV) est responsable de mort foudroyante chez les jeunes perruches. Les symptômes sont caractérisés par une hépatite, une ascite et un hydropéricarde (Bozeman *et al.*, 1981). Initialement décrit chez la perruche, ce polyomavirus a aussi été isolé chez d'autres oiseaux, comme le poulet (Stoll *et al.*, 1993), différentes espèces de passereaux, la buse (*Buteo buteo*) et le faucon (*Falco tinnunculus*) (Rossi *et al.*, 2005)(Johne & Müller, 1998). Les différents isolats, appartenant au même génotype et au même sérotype, le terme plus générique d'*Avian polyomavirus* (APyV) a été adopté.

Chez l'oie cendrée (*Anser anser*), le *Goose hemorragic polyomavirus* (GHPyV) a été identifié comme étant l'agent infectieux responsable d'hémorragies rénales, sous-cutanées et entériques chez les oisillons de 4 à 10 semaines. Ces infections sont épisodiques dans les élevages avec un fort taux de mortalité chez les oisons (Guerin *et al.*, 2000). Le GHPyV a récemment été isolé chez le canard sans que celui-ci ne présente aucun signe clinique (Corrand *et al.*, 2011). Cela suggère, que le canard pourrait être le réservoir du GHPyV, et qu'il pourrait y avoir une transmission inter-espèces du virus (Corrand *et al.*, 2011).

Chez le canari (*Serinus canaria*), des hépatites hémorragiques et des splénomégalies sont causées par le *Canary polyomavirus* (CaPyV) aboutissant à 50% de mortalité des oisillons en moins de 40 jours (Halami *et al.*, 2010). Ce virus est aussi suspecté de réduire la fertilité et le taux d'éclosion des œufs.

Deux autres polyomavirus ont été identifiés chez des oisillons morts subitement, le *Finch polyomavirus* chez le bouvreuil (*Pyrrhula pyrrhula)* et le *Crow polyomavirus* chez la corneille (*Corvus monedula*) (Johne *et al.*, 2006).

Le *Butcherbird polyomavirus* a quant à lui été isolé dans des lésions cutanées péri-oculaires chez le Cassican à collier (*Cracticus torquatus*) (Bennett & Gillett, 2014).

VIII.2. Les Polyomavirus de mammifères

Actuellement, une quinzaine de polyomavirus ont été découverts chez les mammifères en dehors de l'Homme (Tableau I). Généralement, les travaux sur ces virus se limitent aux articles *princeps* relatant leur découverte. Même si certains de ces virus ont été découverts chez des animaux malades, les associations entre le virus et les pathologies associées restent souvent à vérifier.

VIII.2.1. AelPyV-1 et fibrome chez l'éléphant

En 2013, un polyomavirus a été identifié dans des lésions, extrêmement rares, présentes sur la trompe d'un éléphant d'Afrique (*Loxodonta africana*). L'*African elephant polyomavirus 1* (AelPyV-1 (Stevens *et al.*, 2013)) semble être responsable de nodules sous cutanés qui se transforment, en plusieurs mois, en fibrome proéminent (Figure 14).

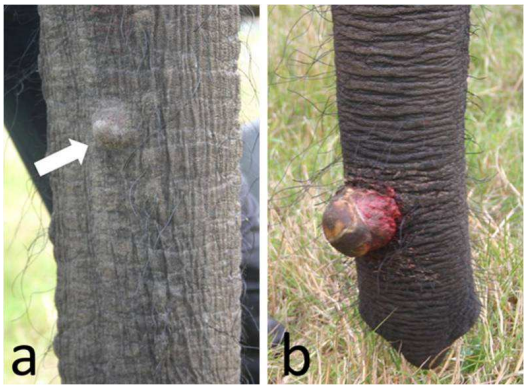


Figure 14 : Lésions associées au AelPyV-1 sur la trompe d'éléphants (Stevens *et al.*, 2013). (A) Lésion nodulaire sur la trompe d'un éléphant (indiquée par une flèche) ; la photographie est représentative de trois animaux. **(B)** Fibrome proéminent et ulcéré pouvant mesurer jusqu'à 7 cm de diamètre.

L'origine infectieuse de ces nodules sous-cutanés est soutenue par le fait que les trois animaux pour lesquels ces lésions ont été décrites sont en contact étroit dans un même cirque et qu'ils ont tous les trois développé les nodules sur une courte période.

VIII.2.2. EPyV, uvéite et néphropathie chez le cheval

L'*Equine polyomavirus* (EPyV) a initialement été découvert chez des chevaux ayant des uvéites dont l'étiologie est inconnue (Renshaw *et al.*, 2012) puis a été retrouvé chez deux chevaux souffrant de néphropathie (Jennings *et al.*, 2013). Ce nouveau virus a été découvert récemment et son association avec les pathologies observées chez l'animal reste à confirmer.

VIII.2.3. RacPyV et tumeur cérébrale chez le raton laveur

Le *Raccoon polyomavirus* (RacPyV) a été isolé, en 2013, à partir du cerveau de ratons laveurs morts de tumeur du cerveau qui pour certains animaux s'étend à la cavité olfactive (Dela Cruz *et al.*, 2013). Cette première étude révèle une association très forte entre le RacPyV et les glioblastomes observés chez les ratons laveurs. En effet, le génome du RacPyV est présent, sous forme épisomale, dans 100% des tumeurs cérébrales et n'est jamais détecté dans les tissus contrôles. Des travaux complémentaires montrent en immunohistochimie que l'antigène LT est exprimé dans le noyau des cellules tumorales (Dela Cruz *et al.*, 2013; Giannitti *et al.*, 2013).

VIII.3. Pouvoir pathogène chez l'Homme

Au contraire de ce qui est décrit pour les polyomavirus aviaires, chez l'Homme, les primo-infections par les polyomavirus sont asymptomatiques. Après l'infection, qui survient dans l'enfance, il semble que ces virus restent latents. Chez les individus immunocompétents, ces infections sont contrôlées par le système immunitaire. Les maladies associées à des polyomavirus sont exclusivement retrouvées chez des sujets immunodéprimés chez qui les virus se réactivent. A ce jour, seulement le BKPyV, le JCPyV, le MCPyV et TSPyV ont un pouvoir pathogène reconnu chez l'Homme.

VIII.3.1. Néphropathie à BKPyV

Après la primo-infection, le BKPyV reste latent dans les cellules épithéliales du rein. Chez des sujets immunodéprimés, le BKPyV peut être réactivé dans les cellules épithéliales tubulaires du rein et reprendre son cycle lytique, provoquant ainsi une nécrose qui progresse vers une atrophie tubulaire. Le BKPyV est détecté dans le sang de 80% des greffés de rein et 5 à 10% de ces patients progressent vers une néphropathie. Des particules virales sont présentes dans l'urine ainsi que dans le noyau des cellules épithéliales tubulaires (Figure 15) (Roingeard *et al.*, 1999). La réactivation du BKPyV survient rapidement après la transplantation et le virus est détecté chez 30 à 50% des transplantés de reins 3 mois après la transplantation (Bressollette-Bodin *et al.*, 2005). Après cette réactivation, des changements asymptomatiques de la fonction rénale, comme une néphrite tubulo-interstitielle et une sténose de l'uretère, peuvent se produire. La néphropathie à BKPyV est généralement observée 10 à 13 mois après la transplantation et le taux de perte du greffon peut atteindre 50 à 80% (Egli *et al.*, 2007).

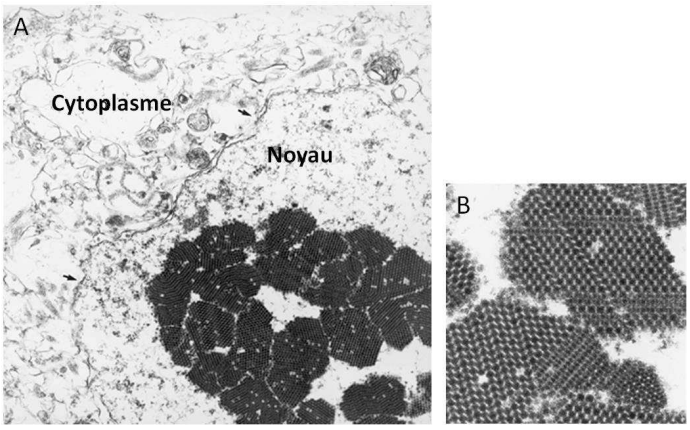


Figure 15 : Observation en microscopie électronique à transmission d'une cellule infectée par le BKPyV. (A) Le noyau présente des structures virales pseudo-cristallines, les flèches indiquent l'enveloppe nucléaire (Grossissement x15000). **(B)** Particules virales observées à fort grossissement (x47000). (Adapté de (Roingeard *et al.*, 1999)).

La virémie et la virurie sont utilisées comme marqueurs pronostiques dans l'identification des patients à risque de néphropathie. Des anticorps dirigés contre l'Ag-LT peuvent refléter l'émergence de contrôle immunitaire BKPyV spécifique (Bodaghi *et al.*, 2009). En première intention, le contrôle de la réactivation du virus passe par une diminution du traitement immunosuppresseur (Hirsch *et al.*, 2002) qui peut être combinée à un traitement antiviral. Il a été montré sur de petites séries que l'utilisation du cidofovir permet de réduire la charge virale et d'améliorer les paramètres cliniques des patients et éviter la perte du greffon (Lamoth *et al.*, 2008).

Au contraire de ce qui est décrit pour les autres polyomavirus humains, quatre génotypes sont décrits pour le BKPyV. L'existence de sérotypes différents entre les différents génotypes est peu documentée. Cependant, dans un modèle murin, il a été montré que les anticorps neutralisant le génotype I ne neutralisent pas le génotype IV et vice versa. Ces travaux suggèrent de mettre en place une vaccination prophylactique quadrivalente pour prévenir le rejet de greffe (Pastrana *et al.*, 2012b).

VIII.3.2. Leuco-encéphalopathie multifocale progressive à JCPyV

Le polyomavirus JCPyV est responsable de la leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP) chez 3 à 7 % des patients infectés par le VIH et en stade SIDA. Cependant, l'incidence de la LEMP est en baisse grâce à l'utilisation des multithérapies antirétrovirales (Khalili & White, 2006; Weber & Major, 1997). Des cas de LEMP à JCPyV

ont aussi été reportées chez des patients ayant subi une greffe et sous traitement immunosuppresseur (Shitrit *et al.*, 2005) ainsi que chez des patients souffrant de désordre immunitaire ou de cancer sous traitement avec le natalizumab (Van Assche *et al.*, 2005; Kleinschmidt-DeMasters & Tyler, 2005; Langer-Gould *et al.*, 2005; Major, 2010).

Après la primo-infection, le virus reste latent dans les organes lymphoïdes, les précurseurs hématopoïétiques et les reins. Chez des sujets immunodéprimés, le JCPyV peut se réactiver, des particules libres ou des lymphocytes B infectés peuvent atteindre le système nerveux central où le JCPyV reprend un cycle lytique dans les oligodendrocytes (Richardson-Burns *et al.*, 2002). La gaine de myéline est alors progressivement détruite en s'accompagnant de troubles neurologiques. Les signes cliniques de la LEMP sont la confusion, l'ataxie, l'hémiparésie et des troubles de la vision. La LEMP conduit au décès du sujet dans la grande majorité des cas (Khalili & White, 2006).

VIII.3.3. Carcinome à cellules de Merkel et MCPyV

VIII.3.3.1. Carcinome à cellules de Merkel

Le carcinome à cellules de Merkel (CCM), initialement décrit par Toker *et al*. en 1972, est une tumeur neuro-endocrine cutanée rare mais très agressive, qui se manifeste chez des sujets âgés et chez des sujets ayant une immunodépression iatrogène ou infectieuse.

Cliniquement, cette tumeur de la peau est généralement d'apparence bénigne. Il s'agit d'un nodule rouge/violacé, de croissance rapide et à fort potentiel métastatique (Figure 16). Le CCM est principalement retrouvé sur les zones photo-exposées du corps; principalement au niveau de la tête et du cou; souvent sur les membres et rarement sur le tronc. La prise en charge thérapeutique du CCM consiste en une chirurgie à marges larges parfois complétée d'une radiothérapie adjuvante.



Figure 16 : Aspect clinique du carcinome à cellules de Merkel. Nodule violacé et luisant de 3cm de diamètre localisé sur la mandibule gauche d'une femme de 82 ans. La lésion est apparue 2 mois avant la prise de la photographie (Laureano *et al.*, 2014).

Histologiquement, la tumeur est constituée de cellules basophiles, monomorphes, arrondies, à noyaux volumineux, hyperchromatiques et souvent mitotiques. Le diagnostic du CCM repose sur la mise en évidence, par immuno-histochimie, de marqueurs épithéliaux (cytokératine 20) et neuro-endocrines (chromogranine A, synaptophysine, énolase). Ces marqueurs, qui soulignent la double différenciation épithéliale et neuroendocrine des cellules de Merkel, permet de différencier le CCM d'autres tumeurs cutanées d'aspect histologique similaire. L'absence du facteur de transcription de la thyroïde 1 (TTF-1), permet de distinguer le CCM des métastases cutanées de carcinome neuro-endrocrine à petites cellules du poumon (Figure 17).

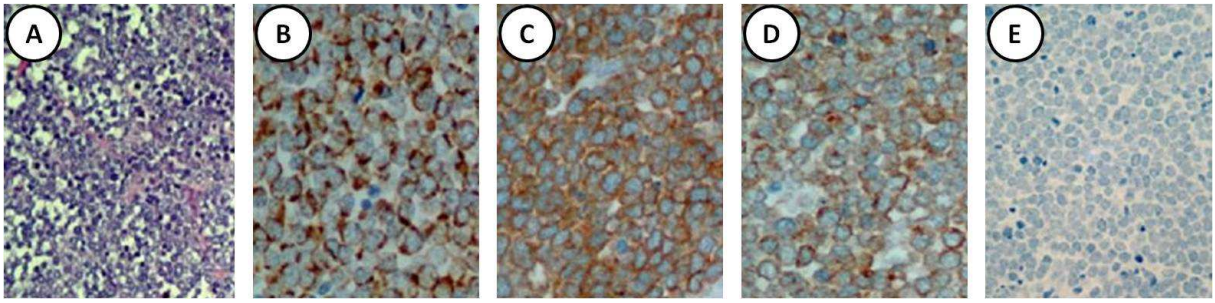


Figure 17 : Diagnostic histologique et immunohistochimique du carcinome à cellules de Merkel. (A) En coloration hematoxyline-éosine, la tumeur est constituée d'un amas de cellules arrondies (MO X200). **(B)** Les cellules expriment le marqueur CK20 (MO X400). **(C)** Les cellules expriment le marqueur neuroendocrine chromogranine A (MO X400). **(D)** Les cellules expriment le marqueur neuroendocrine synaptophysine (MO X400). **(E)** Les cellules n'expriment pas le TTF-1 (MO X400) (D'après (Koljonen, 2006)).

Le CCM, étant une tumeur rare, peu de données sont disponibles sur son épidémiologie. En 2006, son incidence était de 0,6 pour 100 000 aux Etats-Unis et cette incidence a été multipliée par trois au cours des vingt dernières années (Albores-Saavedra *et al.*, 2010; Hodgson, 2005). Le CCM touche préférentiellement les caucasiens de plus de 65 ans (Agelli & Clegg, 2003). L'immunodépression est un facteur de prédisposition comme en témoigne l'incidence plus élevée du CCM chez les transplantés et chez les sujets infectés par le VIH (Engels *et al.*, 2002; Lanoy *et al.*, 2010). En effet, les sujets séropositifs présentent un

risque 13 fois plus important de développer un CCM que la population générale (Agelli *et al.*, 2010).

A l'image de ce qui est observé pour certains virus oncogènes, comme l'HHV-8 dans sarcome de Kaposi, l'EBV dans certains lymphomes et des papillomavirus à haut risque dans le cancer du col, dont les incidences sont augmentées chez les individus immunodéprimés, l'hypothèse d'une étiologie infectieuse du CCM a été envisagée.

VIII.3.3.2. Découverte du polyomavirus à cellules de Merkel

Le rôle favorisant de l'immunodépression sur l'apparition du CCM a permis de suspecter l'intervention d'un virus oncogène (Engels *et al.*, 2002; Lanoy *et al.*, 2010). Cette possibilité a motivé la recherche des papillomavirus et de l'EBV dans le CCM. Cependant, ces recherches se sont révélées négatives (Kanitakis *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2006).

Feng *et al*. ont développé une nouvelle technologie à haut débit qui permet de mettre en évidence des transcrits de pathogènes dans un échantillon donné : la DTS pour *Digital Transcriptome Subtraction* (Feng *et al.*, 2007). En 2008, grâce à cette technologie Feng *et al*. ont découvert, dans des biopsies de CCM, un transcrit inconnu et phylogénétiquement proche du polyomavirus LPyV. Un nouveau polyomavirus, le MCPyV, a ensuite été complètement séquencé (Feng *et al.*, 2008). Le génome identifié mesure 5387 pb et son organisation est classique de la famille des *Polyomaviridae*. Au cours de cette étude, le génome du MCPyV a été retrouvé, sur une petite série, dans 80% des CCM contre 16% dans des cancers cutanés divers.

VIII.3.3.3. Prévalence du MCPyV dans le CCM

Les premiers résultats de Feng *et al*. ont ensuite été confirmés par les travaux d'autres équipes. Dans ces études, le génome du MCPyV est détecté dans 60 à 100% des biopsies de CCM (Feng *et al.*, 2008; Paulson *et al.*, 2009; Touzé *et al.*, 2009) alors qu'il est détecté dans 10 à 30% dans des tissus non CCM (Dworkin *et al.*, 2009; Garneski *et al.*, 2009).

VIII.3.3.4. Signature moléculaire du MCPyV dans le CCM

La présence du MCPyV, dans les CCM, ne constitue pas une preuve suffisante pour définir ce nouveau virus comme l'agent étiologique des CCM. Les travaux de Feng *et al*. font

état de l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire pour 6/8 cas de CCM. De plus, l'intégration de l'ADN viral est clonale entre la tumeur primaire et les métastases à distance ce qui suggère que l'intégration du virus précède l'expansion de la tumeur et des métastases Ces résultats suggèrent fortement la responsabilité du MCPyV dans le développement de CCM (Feng *et al.*, 2008).

L'intégration du génome viral dans les CCM a ensuite été confirmée par plusieurs équipes. Ces travaux montrent qu'il n'y a pas de site d'intégration spécifique dans le génome humain. Au niveau du génome viral, l'intégration survient dans une large zone située entre la fin de l'ORF VP1 et la fin de la région précoce. (Feng *et al.*, 2008; Laude *et al.*, 2010; Martel-Jantin *et al.*, 2012; Sastre-Garau *et al.*, 2009). Toutes les séquences publiées mettent en évidence la présence de mutations ponctuelles ou de délétions dans la région précoce qui aboutissent à l'apparition de codons STOP prématurés et à l'expression d'antigènes LT et 57kt tronqués (Figure 18).

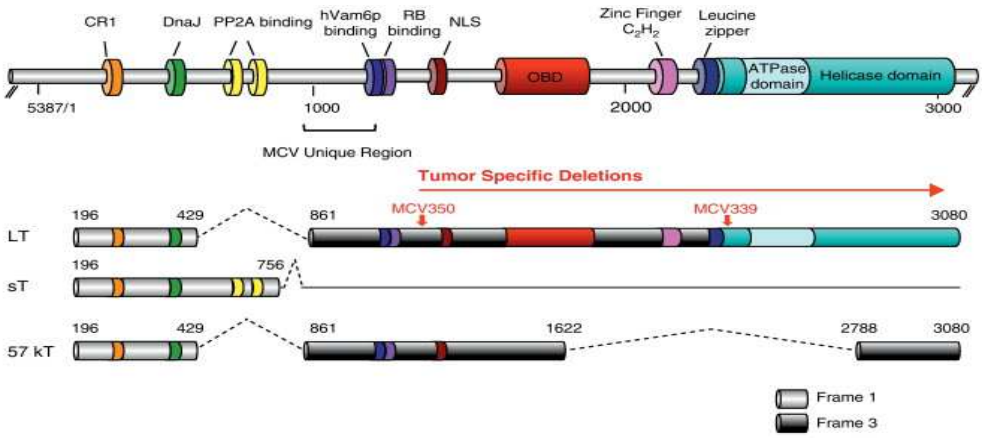


Figure 18 : Mutations de la région précoce dans les séquences virales intégrées.
(D'après (Arora et al., 2012))

L'antigène ST, quant à lui, n'est pas affecté par ces mutations. Les antigènes LT tronqués conservent le motif de liaison à la pRb mais perdent leurs domaines OBD et hélicase (Figure 18). La forme virale intégrée perd ainsi sa capacité de répliquer le génome épisomal tout en conservant ses propriétés oncogéniques. Des mutations dans la région non codante (Kwun *et al.*, 2009) et des délétions dans la VP1 (Kassem *et al.*, 2008) ont aussi été décrites. L'ensemble de ces données démontrent que le cycle viral lytique est aboli dans les cellules

tumorales ce qui est observé pour les papillomavirus à haut risque dans le cancer du col de l'utérus (Moore & Chang, 2010).

VIII.3.3.5. Expression des antigènes viraux dans le CCM

En immuno-histochimie, la protéine majeure de capside VP1, n'est pas détectée dans les biopsies de CCM ce qui est en faveur de l'absence de cycle viral productif dans les cellules tumorales (Shuda *et al.*, 2008; Pastrana *et al.*, 2009; Touzé *et al.*, 2011). Au contraire, les oncoprotéines sont détectées dans le noyau des cellules tumorales. Lors d'une étude portant sur les deux oncoprotéines, l'antigène LT est détecté dans 75% des CCM et l'antigène ST dans 92% des CCM (Shuda *et al.*, 2011). Le taux de CCM positifs pour l'antigène LT est variable selon les études, il est compris entre 60 et 96%. Cependant, toutes ces études montrent que l'expression de l'antigène LT est corrélée avec la présence du génome viral (Coursaget *et al.*, 2013; Kuwamoto *et al.*, 2011).

VIII.3.3.6. Marqueurs sérologiques chez les patients atteints de CCM

Les anticorps anti-VP1 sont détectés chez 88 à 100% des sujets atteins de CCM (Carter *et al.*, 2009; Pastrana *et al.*, 2009; Touzé *et al.*, 2011; Viscidi *et al.*, 2011). Cette séroprévalence est proche de celle de populations contrôles. Néanmoins, le titre en anticorps anti-VP1 est plus élevé pour les cas de CCM que dans la population générale. En effet, ce titre en anticorps anti-VP1 est 14 à 59 fois plus élevé dans les cas de CCM (Pastrana *et al.*, 2009; Touzé *et al.*, 2011). Les forts titres, observés pour les patients ayant un CCM, suggèrent que chez ces individus, le système immunitaire n'a pas réussi à contrôler la multiplication du virus ce qui a eu pour conséquence la recombinaison du génome de viral avec le génome cellulaire. Cette hypothèse est supportée par le fait que, dans la population générale, les forts titres en anticorps anti-VP1 sont corrélés à de fortes charges virales cutanées (Faust *et al.*, 2011; Pastrana *et al.*, 2012a).

Les anticorps anti-Ag-LT sont rarement détectés dans la population générale mais chez 40% des sujets ayant un CCM. De plus, les anticorps anti-Ag-LT semblent être un bon marqueur dans le suivi des patients. En effet, les anticorps anti-Ag-LT disparaissent, après

l'exérèse de la tumeur et chez les patients en rémission. En revanche, ces anticorps réapparaissent chez les patients en récidive (Paulson *et al.*, 2010).

VIII.3.4. Trichodysplasie spinuleuse et TSPyV

VIII.3.4.1. *Trichodysplasia spinulosa*

La trichodysplasie spinuleuse (TS) ou *Trichodysplasia spinulosa* est une maladie cutanée très rare qui survient uniquement chez des patients immunodéprimés. Cette maladie a été observée pour la première fois en 1995, chez un transplanté rénal (Izakovic *et al.*, 1995) puis complètement décrite en 1999 par Haycox *et al.*, chez un homme de 44 ans ayant subi une transplantation rein/pancréas (Haycox *et al.*, 1999). Actuellement, une trentaine de cas ont été recensés à travers le monde, la plupart du temps, chez des patients sous immunosuppresseur après une allogreffe et occasionnellement, chez des patients souffrant de leucémie (Osswald *et al.*, 2007).

Cette maladie est caractérisée par l'apparition de papules folliculaires indurées et de spicules de kératine mesurant 1 à 3 mm de long. Ces lésions sont principalement localisées au niveau du visage et des oreilles et plus rarement au niveau du cuir chevelu, du tronc et des membres. Les sujets atteints de TS sont progressivement défigurés et leur apparence est qualifiée de « féline ». Ces lésions s'accompagnent dans la plupart des cas d'une alopécie progressive au niveau des sourcils, des cils et parfois même au niveau du cuir chevelu (Figure 19). Les caractéristiques histologiques de la TS sont assez spécifiques avec (i) une maturation/expansion anormale des follicules pileux, (ii) des infundibulums hyperkératosiques, et (iii) une hyperprolifération des cellules épithéliales de la gaine interne du poil contenant de gros granules de kératohyaline.

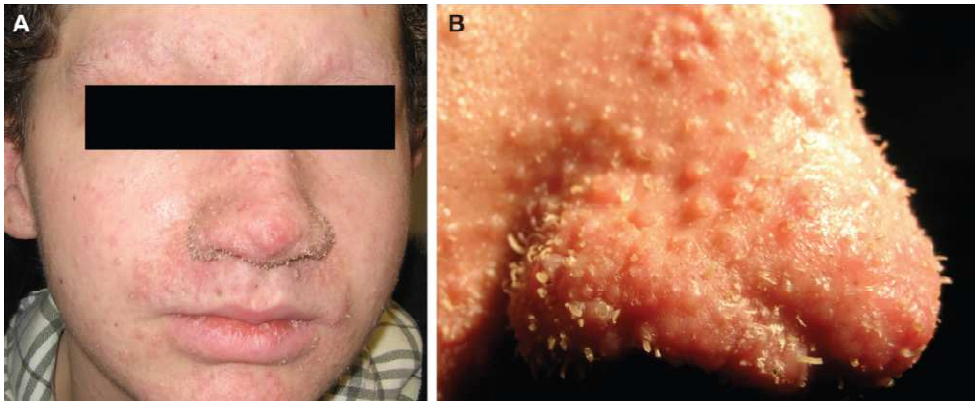


Figure 19 : Lésions caractéristiques de la trichodysplasie spinuleuse. (A) Le patient présente des papules sur l'ensemble du visage qui s'accompagnent d'une alopécie au niveau des sourcils ainsi que **(B)** des spicules kératosiques localisés essentiellement sur le nez (van der Meijden *et al.*, 2010).

VIII.3.4.2. Découverte du TSPyV

Depuis la première description de cette maladie, une étiologie virale a toujours été suspectée. En effet, des particules virales ont souvent été observées dans des prélèvements issus de TS (Haycox *et al.*, 1999; Osswald *et al.*, 2007; Sadler *et al.*, 2007; Sperling *et al.*, 2004; Wyatt *et al.*, 2005) ce qui a valu à cette maladie le nom de « viral-associated trichodysplasia spinulosa ». Les particules virales observées, non enveloppées, d'environ 38-46 nm de diamètre, font penser à un membre des *Papillomaviridae* ou des *Polyomaviridae* (Figure 20). Cependant, depuis 1999, la recherche par PCR de papillomavirus et de polyomavirus connus, s'est révélée infructueuse (Chastain & Millikan, 2000; Haycox *et al.*, 1999; Holzer & Hughey, 2009; Sadler *et al.*, 2007). Ce n'est que récemment, en 2010, que le génome d'un nouveau polyomavirus, le TSPyV a été identifié par *rolling circle amplification* (RCA), dans des lésions d'un garçon de 15 ans souffrant de TS après avoir subi une greffe de cœur (van der Meijden *et al.*, 2010). Chez ce sujet, l'application locale de cidofovir pendant trois mois a permis de faire diminuer la charge virale et de voir disparaitre papules, spicules et alopécie. La présence du génome du TSPyV a ensuite été vérifiée chez quatre nouveaux cas de TS (Elaba *et al.*, 2012; Matthews *et al.*, 2011) (Communication personnelle du Pr Antoine Touzé).

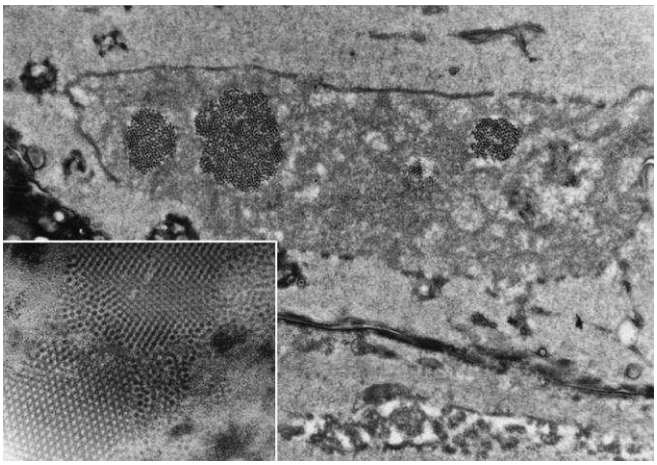


Figure 20 : Observation en microscopie électronique à transmission d'une cellule épithéliale de papule folliculaire chez un cas de trichodysplasie spinuleuse. Le noyau contient des réseaux paracristallins constitués de particules virales ; les particules mesurent environ 46 nm de diamètre (Wyatt *et al.*, 2005).

IX. Epidémiologie des polyomavirus

IX.1. Prévalence et séroprévalence des polyomavirus

Les études séro-épidémiologiques réalisées sur les polyomavirus reposent sur la détection des anticorps dirigés contre la protéine majeure de capside VP1. Ces études utilisent soit des pseudo-particules virales générées en cellules d'insecte ou de mammifères, soit des capsomères produits en *E. coli*.

L'épidémiologie des infections à BKPyV et JCPyV est assez bien documentée. Du fait de leur découverte récente, les études portant sur les infections par les nouveaux polyomavirus découverts depuis les années 2000 sont plus rares.

Les infections à BKPyV et JCPyV sont largement répandues dans la population générale. Les séroconversions surviennent très tôt dans l'enfance pour le BKPyV (3-4 ans) et un peu plus tard pour le JCPyV (10-14 ans). Chez l'adulte, la séroprévalence atteint 82% pour le BKPyV et 58% pour le JCPyV avec des séroprévalences dépassant 50% chez l'adulte (Kean *et al.*, 2009). Il a aussi été montré, dans la population générale que ces virus sont éliminés de manière asymptomatique dans l'urine. En effet, la prévalence du JCPyV est de 19% et celle du BKPyV est de 7% dans des échantillons d'urine (Egli *et al.*, 2009).

Pour les virus KIPyV et WUPyV, les séroprévalences à l'âge adulte sont respectivement de 55-70% et 69-80% et ces infections surviennent dès l'âge de 1-5ans (Kean *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009). Initialement retrouvés dans des prélèvements respiratoires (Allander *et al.*, 2007; Gaynor *et al.*, 2007), ces virus ont essentiellement été recherchés dans des lavages nasopharyngés et broncho-alvéolaires chez des enfants atteints d'affections respiratoires aigues. Les prévalences observées vont de 0,5 à 5% pour le KIPyV et 0,4 à 9% pour le WUPyV (Dalianis *et al.*, 2009).

Au vu de l'implication du MCPyV en santé humaine ce virus, bien que récemment découvert, a déjà fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques. Ce virus, comme les autres polyomavirus, est largement répandu dans la population générale. La séroconversion débute avant 5 ans et les différentes études décrivent des séroprévalences allant de 46 à 88% chez l'adulte (Carter *et al.*, 2009; Kean *et al.*, 2009; Tolstov *et al.*, 2009; Touzé *et al.*, 2010). Il a aussi été montré que le titre en anticorps anti-VP1 est corrélé à la charge virale cutanée

(Faust *et al.*, 2011; Pastrana *et al.*, 2012a) et que beaucoup d'adultes portent le virus sur leur peau (Foulongne *et al.*, 2010; Loyo *et al.*, 2010).

Les polyomavirus HPyV6 et HPyV7 ont initialement été découverts sur la peau (Schowalter *et al.*, 2010). Cette première publication décrit des séroprévalences sur une population de taille réduite (N= 95). A l'âge adulte, la séroprévalence est élevée pour l'HPyV6 (61%) et beaucoup plus faible pour l'HPyV7 (35%).

IX.2. Mode de transmission des polyomavirus

Les modes de transmission des *Polyomaviridae* ne sont pas encore clairement établis. Cependant, la présence de ces virus dans différents sites anatomiques et dans l'environnement permet de suspecter des transmissions par voies féco-orale, orale, respiratoire ou cutanée.

Concernant les polyomavirus BKPyV et JCPyV une transmission féco-orale est suspectée. Cette hypothèse repose sur le fait que ces virus sont fréquemment détectés dans les eaux fluviales et résiduaires urbaines et qu'ils sont excrétés de manière asymptomatique dans l'urine (Egli *et al.*, 2009). Une transmission par voie respiratoire a aussi été envisagée pour le BKPyV car il a été montré que la séroconversion est associée à des infections des voies respiratoires supérieures (Goudsmit *et al.*, 1982) et que le virus est présent au niveau du nasopharynx (Sundsfjord *et al.*, 1994) et dans la salive (Jeffers *et al.*, 2009).

Pour les polyomavirus WUPyV et KIPyV, la détection fréquente de ces virus dans le tractus respiratoire fait penser à une contamination par voie respiratoire (Dalianis *et al.*, 2009).

Le génome viral du MCPyV est fréquemment retrouvé sur la peau ainsi que sur des surfaces environnementales en contact avec la peau. Ces éléments sont en faveur d'une transmission par contact cutané direct ou à partir de l'environnement (69, 70, 74).

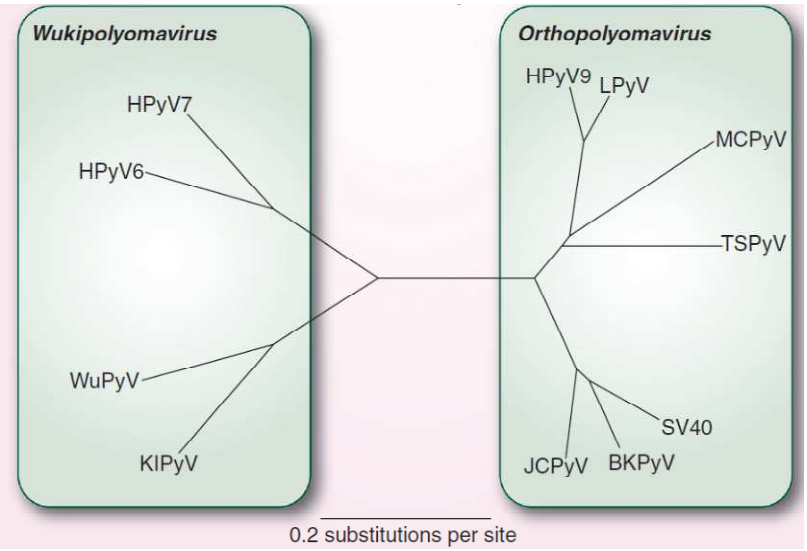


Figure 21 : Relation phylogénétique entre les polyomavirus basée sur la protéine majeure de capside VP1. (D'après (Nicol & Touzé, 2011)).

IX.3. Réactivités croisées entre polyomavirus

Le SV40 a initialement été découvert comme un contaminant du vaccin inactivé anti-poliomyélite Salk. Entre 1955 et 1963, potentiellement 100 millions d'individus ont été contaminés par le SV40 au cours de la vaccination (souches vaccinales Salk et Sabin). Au vu des propriétés oncogéniques du SV40, son implication dans divers cancers chez l'homme est évaluée depuis 1960 et cette question porte toujours à controverse.

Différentes études réalisées à partir de 1963 ont montré que la séroprévalence du SV40 chez l'Homme est comprise entre 3 et 5% suggérant une possible circulation du virus simien chez l'Homme (de Sanjose *et al.*, 2003). En 1971, les BKPyV et JCPyV ont été découverts et il s'est avéré que ces deux virus sont phylogénétiquement très proches du SV40 (Figure 21). Etant donnée la proximité de ces trois virus, des études ont été réalisées pour savoir si les anticorps élicités par les deux virus humains sont cross-réactifs vis-à-vis du SV40. Les sujets séropositifs pour le SV40 se sont révélés systématiquement séropositifs pour le BKPyV et/ou le JCPyV, avec des réactivités plus importantes pour les virus humains que pour le virus simien. A l'inverse, les macaques naturellement infectés par le SV40 se sont révélés être séropositifs pour le BKPyV et le JCPyV, mais à des niveaux plus faibles que pour le SV40 (Viscidi & Clayman, 2006; Viscidi *et al.*, 2003). Chez l'Homme, la séropositivité vis-à-vis du SV40 est inhibée par pré-incubation des sérums avec des VLP du BKPyV et du JCPyV (Carter *et al.*, 2003; Viscidi & Clayman, 2006; Viscidi *et al.*, 2003). Ainsi, la séropositivité de certains prélèvements humains pour le SV40 s'explique par des anticorps anti-BKPyV ou anti-JCPyV qui cross-réagissent avec le SV40.

Par ailleurs, différentes études montrent que 15 à 30% des humains sont séropositifs pour le LPyV (Takemoto *et al.*, 1982; Kean *et al.*, 2009). Cependant, le génome de ce polyomavirus simien n'a jamais été retrouvé chez l'Homme (Costa *et al.*, 2011; Focosi *et al.*, 2009).

ARTICLES DE REVUE

I. Prevalence of polyomaviruses and links with human diseases

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Prevalence of polyomaviruses and links with human diseases

Jérôme TJ Nicol[1] & Antoine Touzé[†1]
[1]Université François Rabelais, INSERM U618 Equipe Vecteurs, Virus, Vaccins. Faculté des Sciences Pharmaceutiques Philippe Maupas, 31 avenue Monge, 37200 TOURS, France
[†]Author for correspondence: antoine.touze@univ-tours.fr

The simian virus 40 and murine polyomaviruses were shown to be DNA tumor viruses in their natural hosts and/or heterologous experimental hosts in the mid-20th Century. The first two human polyomaviruses, the BK polyomavirus and JC polyomavirus, were discovered in 1971 and were shown to induce severe disease in immunocompromised patients, but their involvement in human cancers is still a matter for debate. The discovery of a polyomavirus associated with Merkel cell carcinoma (Merkel cell polyomavirus) in 2008 resulted in a renewed interest in the Polyomaviridae family, leading to the discovery of new human polyomaviruses. This review addresses the involvement of the nine human polyomaviruses and simian virus 40 in human diseases, with a particular focus on their prevalence and the humoral response directed against structural antigens in the general population and in subjects presenting specific diseases.

Review
Future Virology

Approximately 30 polyomaviruses have been identified to date (reviewed in Table 1). The first polyomavirus discovered was the murine polyomavirus, which was demonstrated to induce salivary gland tumors in mice [1]. The second polyomavirus identified was simian virus 40 (SV40), which causes persistent but asymptomatic infection in the kidneys of the rhesus monkey [2,3].

To date, nine human polyomaviruses have been described. The first two human polyomaviruses were described in 1971. The BK polyomavirus (BKPyV) was discovered by Gardner *et al.* in the urine of a renal transplant patient [4] and the JC polyomavirus (JCPyV) by Padgett *et al.* in the brain of a patient with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) [5]. BKPyV and JCPyV were screened for association with various human diseases, and particularly for malignancies. Seven new polyomaviruses have been described in humans since 2007. The WU and KI polyomaviruses (WUPyV, KIPyV) were found in respiratory samples from patients with acute respiratory symptoms [6,7]. Merkel cell polyomavirus (MCPyV) was identified in 2008 by Feng *et al.* in Merkel cell carcinoma (MCC) using a high-throughput transcriptome method [8]. Moreover, the clonal integration of the viral genome in carcinoma cells clearly established for the first time the relationship between a polyomavirus and a human cancer.

This discovery renewed interest in polyomaviruses. Since the discovery of MCPyV, new polyomaviruses have been investigated in a wide range of samples with high throughput or more classical amplification methods. Human polyomaviruses 6 and 7 (HPyV6, HPyV7) were isolated from healthy skin in 2010 [9], and *Trichodysplasia spinulosa* (TS) polyomavirus (TSPyV) was found in an immunocompromised patient suffering from TS [10]. In early 2011, the most recently discovered human polyomavirus, HPyV9, was identified in the serum of a kidney transplant recipient [11].

Polyomaviridae are nonenveloped DNA viruses of 40–45 nm. Their icosahedral T = 7 capsid is assembled from 360 copies of the major capsid protein, VP1, organized in 72 pentameric capsomers. Each VP1 pentamer contains one minor VP2 or VP3 capsid protein. The capsid encloses a 5 kbp circular double-stranded DNA genome divided into three functional regions: an early region encoding the small and large T antigen (LT antigen), a late region encoding the structural proteins VP1, VP2 and VP3 and a noncoding regulatory region containing the origin of replication and the early and late region promoters. The genome of avian polyomaviruses encodes a fourth structural protein, VP4, whereas mammalian polyomaviruses encode an additional not fully characterized protein called agnoprotein (Figure 1).

In order to match the growing numbers of polyomaviruses discovered, the International Committee on Taxonomy of Viruses has recently proposed a novel classification of *Polyomaviridae* (Figure 2A) [12]. The Polyomaviridae family is now divided into three genera, *Orthopolyomavirus* and *Wukipolyomavirus* comprising mammalian viruses and *Avipolyomavirus* including all avian viruses. Human polyomaviruses are distributed

Keywords
■ BKPyV ■ HPyV6 ■ HPyV7 ■ HPyV9 ■ immunosuppression ■ JCPyV ■ KIPyV ■ MCPyV ■ Merkel cell carcinoma ■ *Polyomaviridae* ■ seroepidemiology ■ SV40 ■ TSPyV ■ WUPyV

future medicine part of fsg

Table 1. Polyomavirus designations, abbreviations, natural hosts and Genbank IDs.

Virus designation	Virus abbreviation	Host species	Genome accession number ID
Baboon polyomavirus 1/simian agent 12	SA12	Vervet monkey, chacma monkey	NC_007611
Baboon polyomavirus 2	PPyV	Baboon	†
Bat polyomavirus	BatPyV	Bat	NC_011310
B-lymphotropic polyomavirus	LPyV	African green monkey	NC_004763
BK polyomavirus	BKPyV	Human	NC_001538
Bornean orang-utan polyomavirus	OraPyV1	Orang-utan	NC_013439
Bovine polyomavirus	BPyV	Cattle	NC_001442
California sea lion polyomavirus	SLPyV	Sea lion	NC_013796
G. g. gorilla polyomavirus 5766	GggPyV1	Gorilla	HQ385752
P. t. verus polyomaviruses 6520	PtvPyV1b	Chimpanzee	HQ385747
P. t. verus polyomaviruses 6512	PtvPyV2a	Chimpanzee	HQ385748
Hamster polyomavirus	HaPyV	Hamster	NC_001663, AJ006015
JC polyomavirus	JCPyV	Human	NC_001699
Merkel cell polyomavirus	MCPyV	Human	NC_010277
Murine pneumotropic virus/Kilham virus	MPtV	Mouse	NC_001505.2
Murine polyomavirus	MPyV	Mouse	NC_001515
Simian virus 40	SV40	Rhesus Monkey	NC_001669
Squirrel monkey polyomavirus	SqPyV	Monkey	NC_009951
Sumatran orang-utan polyomavirus	OraPyV2	Orang-utan	FN356901
Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus	TSPyV	Human	NC_014361
Chimpanzee polyomavirus	ChPyV	Chimpanzee	AY691168†
Human polyomavirus 6	HPyV6	Human	NC_014406
Human polyomavirus 7	HPyV7	Human	NC_014407
Human polyomavirus 9	HPyV9	Human	HQ696595
KI polyomavirus	KIPyV	Human	NC_009238
WU polyomavirus	WUPyV	Human	NC_009539
Budgerigar fledgling polyomavirus/ avian polyomavirus	APyV	Parrot, birds	NC_004764.2
Canary polyomavirus	CaPyV	Canary	GU345044
Crow polyomavirus	CPyV	Crow, jackdaw	NC_007922
Finch polyomavirus	FPyV	Bullfinch	NC_007923
Goose hemorrhagic polyomavirus	GHPyV	Goose	NC_004800
Athymic rat polyomavirus	RatPyV	Rat	†
Cynomolgus polyomavirus	CyPV	Monkey	†
Rabbit kidney vacuolating virus	RKV	Rabbit	†

†*Genome not fully sequenced.*

in the two mammalian genera. Polyomaviruses associated with diseases in humans are grouped in the *Orthopolyomavirus* genus, whereas the *Wukipolyomavirus* genus contains only human polyomaviruses that are not associated with human disease.

SV40: a human pathogen?

Since its identification, SV40 has been extensively investigated as a model to determine the viral life-cycle of *Polyomaviridae*. The oncogenic properties of T antigens based on interactions with cellular tumor suppressors have been demonstrated in the SV40 model. Moreover, a number of important discoveries concerning eukaryotic replication, transcription and nuclear location have been made using the SV40 model system [13].

In 1960, SV40 was found to be a contaminant of the poliovirus vaccine [2]. Between 1955 and 1963, rhesus monkey kidney cell cultures used for the production of the commercial Salk inactivated poliovirus vaccine were contaminated with indigenous SV40, and 100 million individuals were potentially in contact with this virus.

Since inoculation of hamsters with SV40 induced leukemia, lymphoma, osteosarcoma and mesotheliomas [14,15], and the experimental demonstration that the SV40 LT antigen is able to transform the human primary cell line [16],

the ability of SV40 to induce tumors in heterologous hosts and the oncogenic activity of SV40 LT antigen has supported the hypothesis that SV40 may be involved in human cancers.

Several studies have reported the PCR detection of the SV40 genome in human tumors such as mesothelioma, osteosarcoma, brain tumors and non-Hodgkin lymphomas [17–21]. In most of these studies, viral copy number and expression of the LT antigen was not investigated. Other studies did not confirm the presence of SV40 in these human tumors using different tissue fixation, extraction and amplification/detection techniques [22–25]. Moreover, epidemiological studies on recipients of the SV40-contaminated vaccines did not demonstrate a particular risk for the development of such cancers [26].

The first sero-epidemiologic studies conducted after 1963 evidenced antiSV40 antibodies, suggesting potential exposure of humans to SV40. However, the seroprevalence of SV40 in human sera is 3–5%, with very low titers, and is unrelated to exposure to contaminated vaccines. Nevertheless, the discovery in the early 1970s of BKPyV and JCPyV ruled out the previously accepted idea of circulation of SV40. BKPyV and JCPyV VP1 sequences were found to be closely related to SV40 VP1 (Figure 2B). In fact, the reactivity against SV40 observed was reduced or totally inhibited by the preincubation of SV40- positive sera with BKPyV or JCPyV VLPs. Thus the reactivity against SV40 was mainly owing to cross-reactivity with these closely related polyomaviruses [27,28].

BK & JC polyomaviruses in human diseases

BK polyomavirus was isolated in 1971 by Gardner *et al.* in the urine of a kidney transplant recipient (the initials of the index case were BK) presenting stenosis of the ureter. BKPyV infection has emerged as a significant cause of kidney transplant graft loss, a condition known as BK nephropathy [4].

In the same year, JCPyV was discovered by Padgett *et al.* (the initials of the index case were JC) in the brain of a patient with Hodgkin's lymphoma suffering from progressive PML, a degenerative, demyelinating disease [5]

BKPyV infection is acquired in early childhood (3–4 years), whereas JCPyV infection appears later (10–14 years old) with asymptomatic primary infection. The seroprevalence in the adult population is 82% for BKPyV and 58% for JCPyV. Asymptomatic shedding of JCPyV and BKPyV in the urine occurs in 19 and 7% of healthy subjects, respectively [29]. The mode of transmission of these viruses has not been fully established. The respiratory route is speculated for BKPyV since seroconversion has been associated with upper respiratory tract infection and BKPyV genome has been detected in nasopharyngeal aspirates [30,31]. These two viruses are frequently detected in sewage, which is compatible with probable fecal–oral transmission. Moreover, detection of these polyomaviruses has been proposed as an indicator of water quality [32].

After primary infection in early life, BKPyV remains latent in the epithelial cells of the kidney. During immunosuppression, BKPyV may become reactivated in the epithelial cells of the renal tubule, causing necrosis which, in a multistep process, leads to tubular atrophy. BKPyV viruria has been reported in up to 80% of renal transplant recipients, and 5–10% progress to BK nephropathy. Very large numbers of BKPyV virions can be observed in the nucleus of tubular epithelial cells present in the urine (Figure 3) [33]. Viral reactivation is initiated rapidly after transplantation and is seen in 30–50% of patients by 3 months post-transplantation [34]. When the virus is reactivated, asymptomatic changes in renal function, tubulo–interstitial nephritis and stenosis of the ureter can occur. BKPyV nephropathy is typically observed 10–13 months

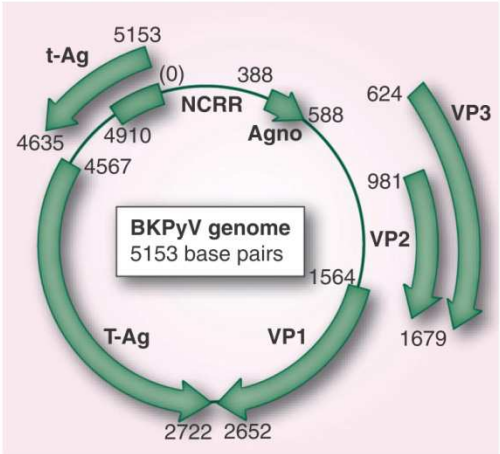


Figure 1. Genome organization of polyomaviruses. All polyomaviruses display a similar genome organization, as exemplified by BKPyV (Genbank ID NC_001538.1). Numbering refers to the first nucleotide of the noncoding regulatory region. Regulatory elements and replication origin are contained in the NCRR. This region controls the expression of early proteins (t-Ag and T-Ag) and late proteins (VP1–3 and agnoprotein). These proteins are obtained by differential splicing and internal translation. Ag; Antigen; BKPyV: BK polyomavirus; NCRR: Noncoding regulatory region.

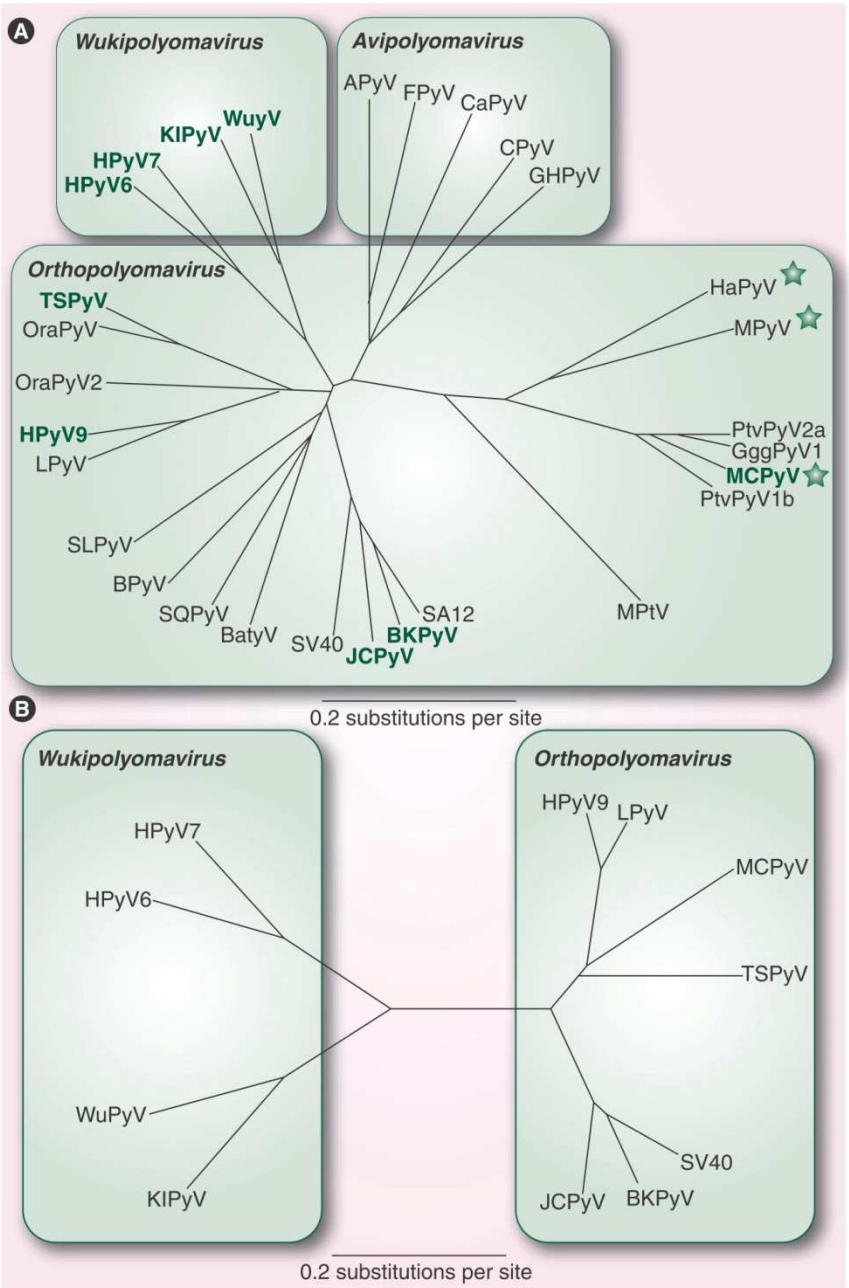


Figure 2. Phylogenetic relationships between polyomaviruses.
(A) Phylogenetic relationships between polyomaviruses based on the whole genome sequence. The 29 sequence IDs are summarized in Table 1 (bold: human polyomaviruses; starred: oncogenic polyomaviruses). **(B)** Phylogenetic relationships between human and closely related simian polyomaviruses based on major capsid VP1 protein. In both analyses, sequences were aligned using ClustalW [101]. Trees were obtained by neighbor-joining using ClustalW2 phylogeny [102]. FigTree was used for graphic display.

post-transplantation, and graft failure rates can reach 50–80% [35]. Monitoring of the BKPyV viral load in the plasma could be used as a prognostic marker to identify patients at risk of nephropathy. Reduction of the immunosuppressive treatment is the first-line approach to reducing BKPyV nephropathy [36]. Combination with antiviral treatment, such as the acyclic analog of cytosine, cidofovir, has been shown in small patient series to reduce viral load dramatically and improve clinical parameters in transplant patients, although other studies have shown no benefit regarding the outcome in terms of graft loss [37]. Antibodies directed against BKPyV LT antigen may reflect the emergence of BKPyV-specific immune control [38].

JC polyomavirus causes PML in 3–7% of AIDS patients, but the incidence is diminishing with treatment using HAART [39,40]. Some case reports have indicated that JCPyV-associated PML is also observed in transplant recipients under immunosuppressive treatment [41], and in patients suffering from immune disorder or malignancies treated with monoclonal antibody such as natalizumab [42–45]. The virus remains latent in lymphoid organs, hematopoietic progenitors and kidneys after the initial infection and is reactivated during immunusuppression. The virus may reach the CNS as free particles or via infected B-lymphocytes, where it causes lytic destruction of oligodendrocytes, which produce myelin [46]. The subsequent clinical symptoms of PML are confusion, ataxia and focal neurological disorders such as hemiparesis and visual changes, and lead to death in a large majority of cases [40].

In an experimental model, BKPyV and JCPyV induced tumors after inoculation in rats and hamsters (and nonhuman primates for JCPyV) [47]. These findings have stimulated research on these viruses in different human tumor types. JCPyV has been investigated in CNS and colorectal tumors and BKPyV in urinary tract tumors and prostate cancer, but the results have failed to clearly demonstrate the involvement of these viruses in human cancer [48–51].

Discovery of new polyomaviruses: commensal and/or oncogenic agents?

KI & WU polyomaviruses

A total of 36 years after the discovery of the first two human polyomaviruses, KIPyV and WUPyV were discovered simultaneously in clinical respiratory tract samples, the former by random PCR using viral DNA protected from DNase treatment as template at the Karolinska Institute (Sweden) [6] and the latter by using high-throughput sequencing at Washington University (WA, USA) [7]. KIPyV was found in 1% of nasopharyngeal aspirates and 0.5% of feces samples. WUPyV was found in 3% of patients from Australia and 0.7% of patients from the USA, suggesting a relatively

low prevalence of this virus even in pathological samples [7]. The majority of KIPyV- and WUPyV-positive patients are 3 years old or less. The immune system closely controls KIPyV and WUPyV replication, since viremia and viruria have only been observed in immunosuppressed patients without specific disease [52].

Seroprevalence in the general population, established using VP1-recombinant capsomers, is 55% for KIPyV and 69% for WUPyV. The discrepancy between prevalence and seroprevalence findings may be owing to the fact that PCR detection represents only active infection whereas seroprevalence studies measure past and ongoing infections. As observed for other human polyomaviruses, seroconversion seems to occur during the first 5 years of life [53]. Further studies have confirmed the presence of KIPyV and WUPyV in respiratory tract secretions and evidenced these viruses in blood and feces [54–57]. The etiological role of KI and WU polyomaviruses in human illness is still unclear, since other pulmonary pathogens have been co-detected [6,58]. The involvement of these viruses in carcinogenesis has been explored, considering the potential oncogenic activity of LT antigen. The first reports on such area indicated a negative contribution of these viruses in tumors, even when KIPyV has been detected in lung and upper respiratory tract tumors [59–61].

Merkel cell polyomavirus

Merkel cell carcinoma is a rare but highly aggressive cutaneous neuroendocrine tumor that occurs in the elderly and in individuals with iatrogenic or infectious immunosuppression.

Clinically, this skin tumor is usually innocent in appearance. It consists of a red to violaceous nodule, with rapid growth and high metastatic potential. MCC are mostly found on sun-exposed areas of the body, especially on the head and neck, frequently on limbs and arms and less frequently on the trunk [62].

Retrospective analyses of MCC cases demonstrate that tumor size and carcinoma stage at the time of diagnosis are good markers for survival. In terms of size, the 10-year survival rate for tumors less than or equal to 2 cm in diameter is better (61%) than tumors larger than 2 cm (39.6%). In terms of stage, the 10-year survival rates for localized, regional, and distant tumors are 71, 47.8 and 20.1%, respectively [63].

The diagnosis of MCC is rarely suspected at the time of biopsy. It is based on the detection by immunohistochemistry of epithelial markers (cytokeratin 20), neuroendocrine markers (e.g., chromogranin A, synaptophysin and neuron-specific enolase) and the absence of TTF-1.

Treatment consists of total excision of the nodule with wide surgical margins and in some cases adjuvant radiotherapy [64].

The incidence of primary MCC in the USA in 2006 was 0.6 per 100,000 persons and has increased threefold during the past 20 years [63,65], which coincides with the increase in transplant recipients under immunosuppression and AIDS cases.

The occurrence of MCC in immunocompromised patients, and particularly the relative risk of 13.4 among AIDS patients compared with the general population, suggest a viral etiology [66]. Known oncogenic viruses such as EBV [67] and high risk human papillomavirus [68] have not been detected in MCC. Feng *et al.* have developed new high-throughput technology, known as digital transcriptome subtraction, a method developed in order to highlight pathogen transcripts in host samples [69]. Using digital transcriptome subtraction technology, in 2008 Feng *et al.* discovered unknown transcripts in MCC closely related to the green monkey lymphotropic polyomavirus (LPyV) sequence [8]. They

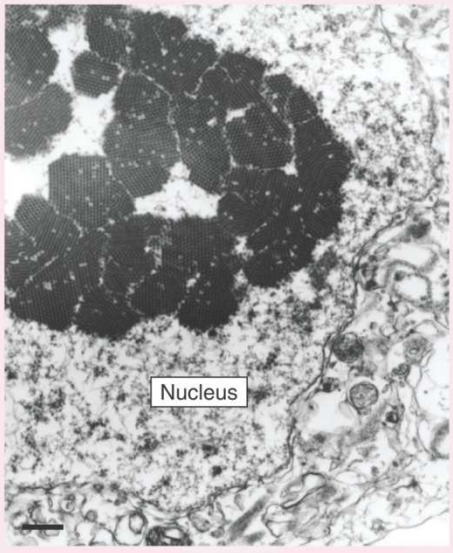


Figure 3. Transmission electron micrograph of cells of the tubular epithelium from a kidney transplant. Paracrystalline array corresponding to polyomavirus nucleocapsids of 40 nm in size can be seen in the nucleus. BK polyomavirus-specific PCR amplification confirmed microscopy observation. Scale bar represents 500 nm.
Reproduced from [33], with permission of authors and John Libbey Eurotext.

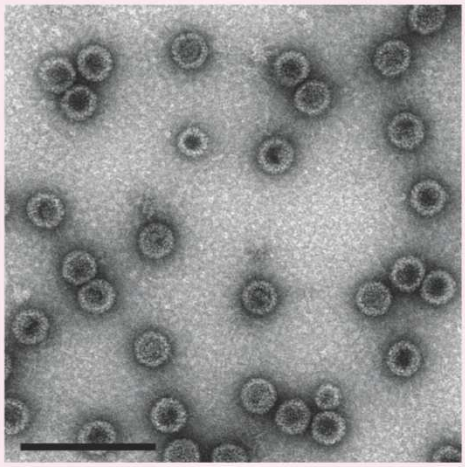


Figure 4. Electron micrograph of Merkel cell polyomavirus-like particles obtained by expression of Merkel cell polyomavirus P1 in insect cells using a recombinant baculovirus. Scale bar represents 200 nm.

subsequently sequenced the 5387-bp circular genome of MCPyV. The MCPyV genome was initially detected in eight out of ten cases (80%) of MCC, whereas four out of 25 (16%) of the control skin tissue tests were positive. Further studies detected MCPyV genome in 60–100% of MCC tissue samples [8,70,71] whereas it was detected in 10–30% of non-MCC tissue samples [72,73], although the viral load was increased 60-fold in MCC compared with other tissues. Foulongne *et al.* reported detection of the MCPyV episomal genome on healthy donor skin and on environmental surfaces in contact with human skin [74], clearly indicating the ubiquitous presence of MCPyV in the general population.

The first evidence of integration of viral DNA was obtained in six out of eight MCPyV-positive MCC samples. Moreover, integration demonstrated by Southern blotting was shown to be monoclonal in a tumor and its metastases, suggesting that viral genome integration occurred before clonal expansion of a tumor cell and development of metastases. These findings strongly suggested the involvement of this new human polyomavirus as a carcinogenic agent in MCC [8]. Sastre-Garau *et al.* confirmed the random integration of the MCPyV genome into the host cell genome in 100% of MCC using detection of integrated papilloma sequences technique [75]. In all sequences published, stop codons or deletions in the early region resulted in the expression of truncated LT antigens [8,75]. These LT antigens retained the pRb binding motifs, but lost their helicase C-terminal domain used in episomal genome replication. Thus, there is a loss of viral genome replication during integration and tumor cell proliferation but there is sustained oncogenic activity.

Serology can also be used to characterize further the association between an infectious agent with a cancer [76]. To our knowledge, culture of MCPyV is not yet available, despite the description of noninfectious virions produced *in vitro* [77]. In the meantime, virus-like particles (VLPs) can be used as surrogates for the virions. MCPyV VLPs can be obtained by expression of the *VP1* gene in insect or mammalian cells (Figure 4). These VLPs or *Escherichia coli*-expressed capsomers were used as antigens in standard ELISA and Luminex® assays. Using these assays, the seroprevalence in the general population has been estimated at between 46 and 88% in adults with antibodies against VP1 protein [53,78–80]. As observed particularly for BKPyV, seroconversion appears during childhood between 0 and 5 years of age, indicating infection early in life without identified symptomatic primary infection [53,79,81]. This strong seroprevalence corroborates molecular findings concerning the widespread circulation of MCPyV in the human population.

Despite the high seroprevalence of anti-VP1 antibodies in the population, high titers of antibodies have been shown to be associated with MCC, and these have been shown to be of positive prognostic value when considering the development of recurrence and metastases [82]. Titers of antiMCPyV VP1 were also correlated with high viral load on the skin [83,84]. Since *VP1* has not been shown to be expressed in MCC [82,85], high titers of antibodies may result from active virus replication allowed by immunosuppression before initiation of MCC and development at the level of the skin.

Antibodies to the MCPyV LT antigen were shown to be more specific to MCC than the antiVP1 antibodies, since they were detected in 40% of patients with MCC and absent in the general population. Moreover, a rise in titer was associated with disease progression [86].

The discovery of a viral etiologic oncogenic agent in MCC means that it is possible to consider a targeted therapeutic approach against the LT antigen. Such an approach may be based on the development of a therapeutic vaccine or RNA interference [87,88].

Human polyomaviruses 6 & 7

With the aim of analyzing the diversity of MCPyV shed by healthy skin using rolling circle amplification, Schowalter *et al.* fortuitously

discovered two novel human polyomaviruses, that is to say, HPyV6 and HPyV7 [9]. These were assigned to the *Wukipolyomavirus* genus. The prevalence of these new viruses and their involvement in any disease remain to be determined. Using VP1 VLPs, the seroprevalence of HPyV6 and HPyV7 was determined to be 61 and 35%, respectively [9].

Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus

Trichodysplasia spinulosa is a rare skin disease occurring exclusively in immunocompromised patients. This disease is characterized by the development of follicular papules and keratin spines known as spicules that reach 1–3 mm in length. The first case of TS was described in 1999 by Haycox *et al.* in a 44-year-old man under an immunosuppressive regimen following kidney/pancreas transplantation. Transmission electron microscopy of thin biopsy sections revealed 38-nm virus particles in cell nuclei, which were compatible with the size of the former *Papovaviridae* family virions [89,90]. Other studies have since demonstrated intracellular viral particles in different cases of TS involving a viral etiologic agent, whereas specific PCR investigations have not revealed any known *Polyomaviridae* or *Papillomaviridae* [89,91,92]. As suggested by zur Hausen [93], in the wake of the discovery of new polyomaviruses in June 2010, van der Meijden *et al.* amplified the genome of TSPyV from lesions observed in a 15-year-old male heart transplant recipient using rolling circle amplification [10]. Topical antiviral treatment with cidofovir decreased the viral load and resolved papules, spicules and alopecia in 3 months. The prevalence of this virus in immunocompromised long-term kidney transplant patients without TS was determined to be 4% [10]. Using VP1 protein in Luminex assays, TSPyV seroprevalence was recently determined to be 80% in the adult population and 10% in children less than 9 years of age [94].

Human polyomavirus 9

As it is clear that polyomaviruses are more often found in immunosuppressed patients, Scuda *et al.* performed PCR on 597 clinical samples with degenerated primers targeting *VP1* genes of known polyomaviruses. These PCR procedures were able to amplify an unknown *VP1* from a novel polyomavirus (close to the LPyV) sequence from the serum of a kidney transplant recipient receiving immunosuppressive treatment [11]. The complete genome of this new polyomavirus was determined and named HPyV9. Specific PCR targeting of the VP1 sequence of HPyV9 was subsequently able to determine the presence of HPyV9 in four additional samples (serum, plasma, whole blood and urine) from other immunocompromised patients (kidney transplant recipients, patients with leukoencephalopathy) [11]. This new virus was also detected on the skin of a patient suffering from MCC and from healthy donors [95], but was not associated with any specific human disease.

Cross-reactivity between polyomaviruses infecting different hosts has already been observed between BKPyV, JCPyV and SV40. In view of the proximity between HPyV9 and LPyV VP1 proteins (Figure 2B), seroepidemiological studies would probably explain that human reactivity to LPyV is due to HPyV9 [96].

Conclusion

The discovery of a new polyomavirus after more than 50 years of intensive research in this family is of particular interest, especially since MCPyV has been shown to be clearly associated with MCC. The involvement of other new polyomaviruses in specific diseases or cancers has yet to be determined. The development of high-throughput sequencing and also of degenerated and random amplification techniques will allow the identification of new polyomaviruses in humans and in animals. Screening of human cancers without established etiology (and diseases occurring in immunocompromised patients) is obviously the most important target.

Future perspective

In our opinion, research into polyomavirus might evolve around different axes.

As performed in the last 3 years, high-throughput and classic molecular amplification techniques will certainly lead to the discovery of new polyomaviruses in animals and in humans. The most promising and relevant research for human health would be to concentrate on diseases or cancers without associated etiology in immunocompromised subjects.

Regarding the newly discovered polyomaviruses in humans and animals, it would be relevant to determine the circulation of these polyomaviruses, particularly those described in primates. Prevalence studies have to be continued to achieve this goal. Cross-reactivity between viruses must be clearly identified for this purpose.

Concerning MCPyV, at the basic scientific level, understanding of the virus–cell interaction would be valuable to propose therapeutic

strategies. At the clinical level, study of virological and cellular parameters would certainly allow identification of prognostic markers to improve patient follow-up and therapy. It might now be considered that therapeutic vaccination targeting the LT antigen can be a means of controlling MCC progression since prophylactic vaccination using VLPs is not the solution when considering the virus epidemiology and the cost of such vaccination.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

Simian virus 40: a human pathogen? (discovery 1960)

- Simian virus 40 (SV40) was found to be a contaminant of poliovaccine in 1960 and potentially infected millions of humans.
- Detection of the SV40 genome in different human cancers remains controversial and seroepidemiologic studies have not demonstrated SV40 circulation in the general population.

Involvement of BK & JC polyomaviruses in human diseases (discovery 1971)

- Sero-epidemiologic studies had shown that this virus is fairly ubiquitous in the general population.
- BK polyomavirus and JC polyomavirus induce nephropathy and progressive multifocal leukoencephalopathy in immunocompromised patients, respectively.
- No tumor has ever been clearly associated with these two viruses.

Discovery of new polyomaviruses: commensal and/or oncogenic agents?

- KI & WU polyomaviruses (discovery 2007):
  - KI and WU polyomaviruses were found in respiratory tract, blood and feces.
  - Coinfection with other pathogens makes it difficult to establish the relationship between these viruses and respiratory disorders.
- Merkel cell polyomavirus (discovery 2008):
  - Merkel cell polyomavirus induced Merkel cell carcinoma in elderly and immunocompromised patients.
  - This virus is the only polyomavirus clearly involved in human cancer.
  - Seroprevalence and molecular studies indicate that Merkel cell polyomavirus is widespread in the general population without associated symptomatic primary infection.
- Human polyomaviruses 6 & 7 (discovery 2010):
  - These two viruses were discovered on the skin of healthy donors but are not associated with any disease.
- *Trichodysplasia spinulosa*-associated polyomavirus (discovery 2010):
  - *Tricgodysplasia spinulosa* polyomavirus induced *Trichodysplasia spinulosa*, a rare complication in transplant recipients.
- Human polyomavirus 9 (discovery 2011):
  - This recently discovered polyomavirus was found in an immunocompromised patient without any associated disease.
  - Recent serologic findings indicated widespread distribution.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:
- ▪ of interest
- ▪▪ of considerable interest

1. Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83, 414–421 (1953).
2. Sweet BH, Hilleman MR. The vacuolating virus, SV40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105, 420–427 (1960).
3. Minor P, Pipkin PA, Cutler K, Dunn G. Natural infection and transmission of SV40. *Virology* 314, 403–409 (2003).
4. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1(7712), 1253–1257 (1971).
5. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1, 1257–1260 (1971).
6. Allander T, Andreasson K, Gupta S *et al.* Identification of a third human polyomavirus. *J. Virol.* 81, 4130–4136 (2007).
7. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM *et al.* Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* 3, E64 (2007).
8. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319, 1096–1100 (2008).

▪▪ **Discovery of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) and first evidence of clonal integration of a polyomavirus genome in a human cancer.**

9. Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 7, 509–515 (2010).
10. van der Meijden E, Janssens RWA, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MCW. Discovery of a new human polyomavirus associated with *Trichodysplasia spinulosa* in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog.* 6, E1001024 (2010).

▪▪ **Trichodysplasia spinulosa polyomavirus is the etiologic agent of *Trichodysplasia spinulosa*.**

11. Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S *et al.* A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J. Virol.* 85, 4586–4590 (2011).
12. Johne R, Buck CB, Allander T *et al.* Taxonomical developments in the family *Polyomaviridae*. *Arch. Virol.* 156(9), 1627–1634 (2011).
13. Gjoerup O, Chang Y. Update on human polyomaviruses and cancer. *Adv. Cancer Res.* 106, 1–51 (2010).
14. Diamandopoulos GT. Leukemia, lymphoma, and osteosarcoma induced in the Syrian golden hamster by simian virus 40. *Science* 176, 173–175 (1972).
15. Cicala C, Pompetti F, Carbone M. SV40 induces mesotheliomas in hamsters. *Am. J. Pathol.* 142, 1524–1533 (1993).
16. Todaro GJ, Takemoto KK. 'Rescued' SV40: increased transforming efficiency in mouse and human cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 62, 1031–1037 (1969).
17. Carbone M, Pass HI, Rizzo P, Marinetti M *et al.* Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma. *Oncogene* 9, 1781–1790 (1994).
18. Lednicky JA, Stewart AR, Jenkins JJ 3rd, Finegold MJ, Butel JS. SV40 DNA in human osteosarcomas shows sequence variation among T-antigen genes. *Int. J. Cancer* 72, 791–800 (1997).
19. Martini F, Iaccheri L, Lazzarin L *et al.* SV40 early region and large T antigen in human brain tumors, peripheral blood cells, and sperm fluids from healthy individuals. *Cancer Res.* 56, 4820–4825 (1996).
20. Vilchez RA, Madden CR, Kozinetz CA *et al.* Association between simian virus 40 and non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 359, 817–823 (2002).
21. Butel JS, Lednicky JA. Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J. Natl Cancer Inst.* 91, 119–134 (1999).
22. Lopez-Rios F, Illei PB, Rusch V, Ladanyi M. Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plas-mids. *Lancet* 364, 1157–1166 (2004).
23. Rollison DE, Utaipat U, Ryschkewitsch C *et al.* Investigation of human brain tumors for the presence of polyomavirus genome sequences by two independent laboratories. *Int. J. Cancer* 113, 769–774 (2005).
24. Rizzo P, Carbone M, Fisher SG *et al.* Simian virus 40 is present in most United States human mesotheliomas, but it is rarely present in non-Hodgkin's lymphoma. *Chest* 116, 470S–473S (1999).
25. Shah KV. SV40 and human cancer: a review of recent data. *Int. J. Cancer* 120, 215–223 (2007).

▪ **Objective review on involvement of simian virus 40 in human cancers.**

26. Engels EA, Katki HA, Nielsen NM *et al.* Cancer incidence in Denmark following exposure to poliovirus vaccine contaminated with simian virus 40. *J. Natl Cancer Inst.* 95, 532–539 (2003).
27. Sanjose S de, Shah KV, Domingo-Domenech E *et al.* Lack of serological evidence for an association between simian virus 40 and lymphoma. International journal of cancer *Int. J. Cancer* 104, 522–524 (2003).
28. Carter JJ, Madeleine MM, Wipf GC *et al.* Lack of serologic evidence for prevalent simian virus 40 infection in humans. *J. Natl Cancer Inst.* 95, 1522–1530 (2003).
29. Egli A, Infanti L, Dumoulin A *et al.* Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J. Infect. Dis* 199, 837–846 (2009).
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.* 10, 91–99 (1982).
31. 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.* 32, 1390–1394 (1994).
32. Ahmed W, Wan C, Goonetilleke A GT. Evaluating sewage-associated JCV and BKV polyomaviruses for sourcing human fecal pollution in a coastal river in Southeast Queensland, Australia. *J. Environ. Qual.* 39, 1743–1750 (2010).
33. Roingeard P, Al-Najjar A, Buchler M, Goudeau A, Lebranchu Y. Infection par le virus BK chez un transplanté rénal (Cas-image). *Virologie* 3, 418–419 (1999).
34. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 8, 1926–1933 (2005).
35. Egli A, Binggeli S, Bodaghi S *et al.* Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22, VIII72–VIII82 (2007).
36. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M *et al.* Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 347, 488–496 (2002).
37. Lamoth F, Pascual M, Erard V, Venetz JP, Nseir G, Meylan P. Low-dose cidofovir for the treatment of polyomavirus-associated nephropathy: two case reports and review of the literature. *Antivir. Ther.* 13, 1001–1009 (2008).
38. Bodaghi S, Comoli P, Bösch R, Azzi A *et al.* Antibody responses to recombinant polyomavirus BK large T and VP1 proteins in young kidney transplant patients. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2577–2585 (2009).
39. Weber T, Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact. *Intervirology* 40, 98–111 (1997).
40. Khalili K, White MK. Human demyelinating disease and the polyomavirus JCV. *Mult. Scler.* 12, 133–142 (2006).
41. Shitrit D, Lev N, Bar-Gil-Shitrit A, Kramer MR. Progressive multifocal leukoencephalopathy in transplant recipients. *Transpl. Int.* 17, 658–665 (2005).
42. Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon β-1a for multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 353, 369–374 (2005).
43. Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, Bollen AW, Pelletier D. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N. Engl. J. Med.* 353, 375–381 (2005).
44. Van Assche G, Van Ranst M, Sciot R *et al.* Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 353, 362–368 (2005).
45. Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu. Rev. Med.* 61, 35–47 (2010).
46. Richardson-Burns SM, Kleinschmidt-DeMasters BK, DeBiasi RL, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy and apoptosis of infected oligodendrocytes in the central nervous system of patients with and without AIDS. *Arch. Neurol.* 59, 1930–1936 (2002).
47. Zu Rheim GM, Varakis JN. Perinatal induction of medulloblastomas in Syrian golden hamster by a human polyomavirus (JC). *Natl Cancer Inst. Monogr.* 51, 205–208 (1979).
48. Das D, Wojno K, Imperiale MJ. BK virus as a cofactor in the etiology of prostate cancer in its early stages. *J. Virol.* 82, 2705–2714 (2008).

49. Casini B, Borgese L, Del Nonno F *et al.* Presence and incidence of DNA sequences of human polyomaviruses BKV and JCV in colorectal tumor tissues. *AntiCancer Res.* 25, 1079–1085 (2005).
50. Maginnis MS, Atwood WJ. JC virus: an oncogenic virus in animals and humans? *Semin. Cancer Biol.* 19, 261–269 (2009).
51. Fioriti D, Videtta M, Mischitelli M *et al.* The human polyomavirus BK: potential role in cancer. *J. Cell. Physiol.* 204, 402–406 (2005).
52. Csoma E, Mészáros B, Asztalos L, Kónya J, Gergely L. Prevalence of WU and KI polyomaviruses in plasma, urine, and respiratory samples from renal transplant patients. *J. Med. Virol.* 83, 1275–1278 (2011).
53. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathol.* 5, E1000363 (2009).
54. Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Alteri C *et al.* Excretion of the novel polyomaviruses KI and WU in the stool of patients with hematological disorders. *J. Med. Virol.* 81, 1668–1673 (2009).
55. Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Farchi F *et al.* KI and WU polyomaviruses and $CD4^+$ cell counts in HIV-1-infected patients, Italy. *Emerg. Infect. Dis* 16, 1482–1485 (2010).
56. Foulongne V, Brieu N, Jeziorski E, Chatain A, Rodière M, Segondy M. KI and WU polyomaviruses in children, France. *Emerg. Infect. Dis* 14, 523–525 (2008).
57. Mourez T, Bergeron A, Ribaud P *et al.* Polyomaviruses KI and WU in immunocompromised patients with respiratory disease. *Emerg. Infect. Dis* 15, 107–109 (2009).
58. Norja P, Ubillos I, Templeton K, Simmonds P. No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *J. Clin. Virol.* 40, 307–311 (2007).
59. Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Bonifacio D *et al.* Identification of the novel KI and WU polyomaviruses in human tonsils. *J. Clin. Virol.* 46, 75–79 (2009).
60. Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Campitelli L *et al.* Identification of the novel KI Polyomavirus in paranasal and lung tissues. *J. Med. Virol.* 81, 558–561 (2009).
61. Giraud G, Ramqvist T, Pastrana DV *et al.* DNA from KI, WU and Merkel cell polyomaviruses is not detected in childhood central nervous system tumours or neuroblastomas. *PloS One* 4, E8239 (2009).
62. Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch. Dermatol.* 105, 107–110 (1972).
63. Albores-Saavedra J, Batich K, Chable-Montero F, Sagy N, Schwartz AM, Henson DE. Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study. *J. Cutan. Pathol.* 37, 20–27 (2010).
64. Boccara O, Girard C, Mortier L, Bens G, Saiag P, Guillot B. Guidelines for the diagnosis and treatment of Merkel cell carcinoma. *Ann. Dermatol. Venereol.* 138, 475–482 (2011).
65. Hodgson NC. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J. Surg. Oncol.* 89, 1–4 (2005).
66. Agelli M, Clegg LX, Becker JC, Rollison DE. The etiology and epidemiology of merkel cell carcinoma. *Curr. Probl. Cancer* 34, 14–37 (2010).
67. Shaw M, Warren S, Groben P, Gulley ML. No evidence of Epstein-Barr virus association with Merkel cell carcinoma. *J. Cutan. Pathol.* 33, 624–628 (2006).
68. Kanitakis J, Joly MO, Chouvet B, Euvrard S, Claudy A. Merkel cell carcinoma in immunocompetent and organ-transplant recipients do not harbor HPV. *Eur. J. Dermatol.* 16, 445–6 (2006).
69. Feng H, Taylor JL, Benos PV *et al.* Human transcriptome subtraction by using short sequence tags to search for tumor viruses in conjunctival carcinoma. *J. Virol.* 81, 11332–11340 (2007).
70. Touzé A, Gaitan J, Maruani A *et al.* Merkel cell polyomavirus strains in patients with merkel cell carcinoma. *Emerg. Infect. Dis* 15, 960–962 (2009).
71. Paulson KG, Lemos BD, Feng B *et al.* Array-CGH reveals recurrent genomic changes in Merkel cell carcinoma including amplification of L-Myc. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1547–1555 (2009).
72. Dworkin AM, Tseng SY, Allain DC, Iwenofu OH, Peters SB, Toland AE. Merkel cell polyomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma of immunocompetent individuals. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2868–2874 (2009).
73. Garneski KM, Warcola AH, Feng Q, Kiviat NB, Leonard JH, Nghiem P. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J. Invest. Dermatol.* 129, 246–248 (2009).
74. Foulongne V, Courgnaud V, Champeau W, Segondy M. Detection of Merkel cell polyomavirus on environmental surfaces. *J. Med. Virol.* 83, 1435–1439 (2011).
75. Sastre-Garau X, Peter M, Avril M-F *et al.* Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J. Pathol.* 218, 48–56 (2009).

▪ **Confirmation of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) genome integration in Merkel cell carcinoma.**

76. Vaccarella S, Franceschi S, Clifford GM *et al.* Seroprevalence of antibodies against human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 in four continents: the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19, 2379–2388 (2010).
77. Feng H, Kwun HJ, Liu X *et al.* Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication. *PloS One* 6, E22468 (2011).
78. Touzé A, Gaitan J, Arnold F *et al.* Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J. Clin. Microbio.* 48, 1767–1770 (2010).
79. Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H *et al.* Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int. J. Cancer* 125, 1250–1256 (2009).
80. Carter JJ, Paulson KG, Wipf GC *et al.* Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *J. Natl Cancer Inst.* 101, 1510–1522 (2009).
81. Chen T, Hedman L, Mattila PS *et al.* Serological evidence of Merkel cell polyomavirus primary infections in childhood. *J. Clin. Virol.* 50, 125–129 (2011).
82. Touzé A, Le Bidre E, Laude H *et al.* High levels of antibodies against merkel cell polyomavirus identify a subset of patients with merkel cell carcinoma with better clinical outcome. *J. Clin. Oncol.* 29, 1612–1619 (2011).

▪ **High titers of antibodies against MCPyV VP1 are associated with recurrence-free survival.**

83. Pastrana DV, Wieland U, Silling S, Buck CB, Pfister H. Positive correlation between Merkel cell polyomavirus viral load and capsid-specific antibody titer. *Med. Microbiol. Immunol.* doi: 10.1007/s00430-011-0200-7 (2011) (Epub ahead of print).
84. Faust H, Pastrana DV, Buck CB, Dillner J, Ekström J. Antibodies to Merkel cell polyomavirus correlate to presence of viral DNA in the skin. *J. Infect. Dis* 203, 1096–1100 (2011).
85. Pastrana DV, Tolstov YL, Becker JC, Moore PS, Chang Y, Buck CB. Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathol.* 5, E1000578 (2009).
86. Paulson KG, Carter JJ, Johnson LG *et al.* Antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigen oncoproteins reflect tumor burden in merkel cell carcinoma patients. *Cancer Res.* 70, 8388–8397 (2010).

- **Antibodies against MCPyV T antigen are markers of Merkel cell carcinoma.**

87. Bain JR, Schisler JC, Takeuchi K, Newgard CB, Becker TC. An adenovirus vector for efficient RNA interference-mediated suppression of target genes in insulinoma cells and pancreatic islets of langerhans. *Diabetes* 53, 2190–2194 (2004).
88. Bousarghin L, Touze A, Gaud G *et al.* Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs. *Mol. Cancer Ther.* 8, 357–365 (2009).
89. Haycox CL, Kim S, Fleckman P *et al.* *Trichodysplasia spinulosa* – a newly described folliculocentric viral infection in an immunocompromised host. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 4, 268–271 (1999).
90. Osswald SS, Kulick KB, Tomaszewski MM, Sperling LC. Viral-associated trichodysplasia in a patient with lymphoma: a case report and review. *J. Cutan. Pathol.* 34, 721–725 (2007).
91. Chastain MA, Millikan LE. Pilomatrix dysplasia in an immunosuppressed patient. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43, 118–122 (2000).
92. Sadler GM, Halbert AR, Smith N, Rogers M. *Trichodysplasia spinulosa* associated with chemotherapy for acute lymphocytic leukaemia. *Australas. J. Dermatol.* 48, 110–114 (2007).
93. zur Hausen H. Novel human polyomaviruses – re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int. J. Cancer* 123, 247–250 (2008).
94. van der Meijden E, Kazem S, Burgers MM *et al.* Seroprevalence of *Trichodysplasia spinulosa*-associated Polyomavirus. *Emerg. Infect. Dis* 17, 1355–1363 (2011).
95. Sauvage V, Cheval J, Foulongne V *et al.* Human polyomavirus related to African green monkey lymphotropic polyomavirus. *Emerg. Infect. Dis* 17, 1364–1370 (2011).
96. Viscidi RP, Clayman B. Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 577, 73–84 (2006).

Websites

101. Multiple Sequence Alignment by ClustalW www.genome.jp/tools/clustalw
102. European Bioinformatics Institute phylogenic tree generator www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny

II. Human Merkel cell polyomavirus: virological background and clinical implications

OBJECTIFS

RESULTATS

Tableau III : Séquences codant les protéines VP1 utilisées pour la construction des baculovirus

Polyomavirus	*Matrice*	*N° d'accès*
MCPyV	Isolat MKT-21	FM864207.1
HPVyV6	Gène de synthèse (plasmide p6VP1)	HM484378.1
HPyV7	Gène de synthèse (plasmide p7VP1)	HM484377.1
TSPyV	Gène de synthèse	NC_014361.1
HPyV9	Gène de synthèse	HQ696595.1
MWPyV	Gène de synthèse	NC_018102.1
STLPyV	Gène de synthèse	NC_020106.1
HPyV12	Gène de synthèse	NC_020890.1

Tableau IV : Coefficients de corrélation Spearman entre les sero-reactivités des six nouveaux polyomavirus

	RS (*P value*)					
Virus	MCPyV	HPyV6	HPyV7	HPyV9	TSPyV	MWPyV
MCPyV	1 (0)					
HPyV6	0,047 ($<10^{-4}$)	1 (0)				
HPyV7	0,056 ($<10^{-4}$)	0,433 ($<10^{-4}$)	1 (0)			
HPyV9	0,042 ($<10^{-4}$)	0,033 ($<10^{-4}$)	0,025 ($<10^{-4}$)	1 (0)		
TSPyV	0,014 (0,001)	0,008 (0,012)	0,002 (0,163)	0,026 ($<10^{-4}$)	1 (0)	
MWPyV	0,012 (0,002)	3.10^{-5} (0.871)	6.10^{-5} (0,828)	0,024 (10^{-4})	0,027 ($<10^{-4}$)	1 (0)

I. Séro-épidémiologie des nouveaux polyomavirus humains

Plusieurs études ont été réalisées dans le but déterminer la séro-épidémiologie des nouveaux polyomavirus humains. Ces études ont été envisagées pour le MCPyV, l'HPyV6, l'HPyV7, le TSPyV, l'HPyV9, le MWPyV, le STLPyV et l'HPyV12 au fur et à mesure de leur découverte.

Pour ce faire, les VLP servant d'antigène ont été produites dans le système eucaryote baculovirus/cellules d'insecte en utilisant la technologie Bac-to-Bac® (Invitrogen). Les gènes utilisés sont, soit des séquences virales natives, soit des séquences optimisées pour l'expression en cellules eucaryote (Tableau III). Les bacmides recombinants codant les protéines majeures de capside VP1 de ces différents virus ont été générés et transfectés dans des cellules *Sf*21 (*Spodoptera frugiperda*) pour obtenir les baculovirus recombinants. Les VLP ont ensuite été produites par infection de cellules HiFive et les VLP contenues dans la fraction nucléaire purifiées sur gradient de chlorure de césium. La capacité des différentes VP1 à s'auto-assembler en VLP a été vérifiée par microscopie électronique à transmission. Les VLP nécessaires aux études ont ainsi pu être produites pour le MCPyV, l'HPyV6, l'HPyV7, l'HPyV9, le TSPyV et le MWPyV. La production des baculovirus recombinants correspondant au STLPyV et à l'HPyV12 est en cours et les capacités des protéines VP1 à s'auto-assembler en VLP restent à vérifier (Tableau III)

Les VLP ainsi produites, ont été utilisées pour déterminer par test ELISA, la séro-épidémiologie dans la population générale italienne du MCPyV, de l'HPyV6, de l'HPyV7, du TSPyV, de l'HPyV9 et du MWPyV. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Pr Mauro Tognon (Université de Ferrara, Italie). La sérothèque utilisée est constituée de 828 ou 825 prélèvements selon les études. Les individus sont âgés de 1 à 100 ans et le ratio femme/homme de la population est de 1,4. De 18 à 65 ans, les prélèvements sont issus de donneurs de sang. Pour les individus de moins de 18 ans et de plus de 65 ans les prélèvements sont issus de laboratoires d'analyse médicale après des contrôles de routine et sont assimilés à la population générale.

Les réactivitées croisées entre les différents polyomavirus humains ont été évaluées par le coefficient de corrélation de Spearman (Tableau V). Les résultats montrent l'absence de réactivités croisées entre les polyomavirus à l'exception d'une corrélation de faible niveau entre les HPyV6 et 7. Les anticorps détectés grâce aux VLP sont donc bien spécifiques de

chaque virus. Ces travaux, présentés dans deux articles (Article 1 et Article 2), ont aussi montré que les infections par ces polyomavirus surviennent dès le plus jeune âge, que ces virus circulent largement dans la population générale avec des séroprévalence chez l'adulte allant de 50% pour l'HPyV7 à 90% pour le MCPyV (Figure 22). Ces résultats suggèrent également que le MCPyV reste latent tout au long de la vie et qu'il est réactivé après 60 ans avec une augmentation des titres en anticorps. Au contraire, pour le TSPyV et le MWPyV, les titres en anticorps diminuent après 60 ans, suggérant que ces virus ne sont pas réactivés avec l'âge ou qu'ils ne restent pas latents.

Au cours d'une troisième étude, menée en collaboration avec le Pr Antoine Gessain et Claire Martel-Jantin (Unité d'Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, Institut Pasteur, Paris), nous nous sommes intéressés à la séro-épidémiologie du MCPyV au Cameroun. La première population est composée de 458 Bantou de Yaoundé dont 68% sont des enfants de moins de 12 ans. La deuximème série est composée de 584 individus du village de Ntem répartis en 65 familles composées de 2 à 25 membres et peuvent être utilisés pour étudier la transmission intra-familiales des virus. Les résultats obtenus pour ces deux séries montrent que, comme chez les caucasiens, l'infection par le MCPyV survient très tôt chez l'enfant et que la séroprévalence atteint 90% à l'âge adulte. Ces résultats, présentés dans l'Article 3 montrent aussi, qu'au sein des familles, le virus se transmet entre frères et sœurs quand les enfants sont d'âge proche.

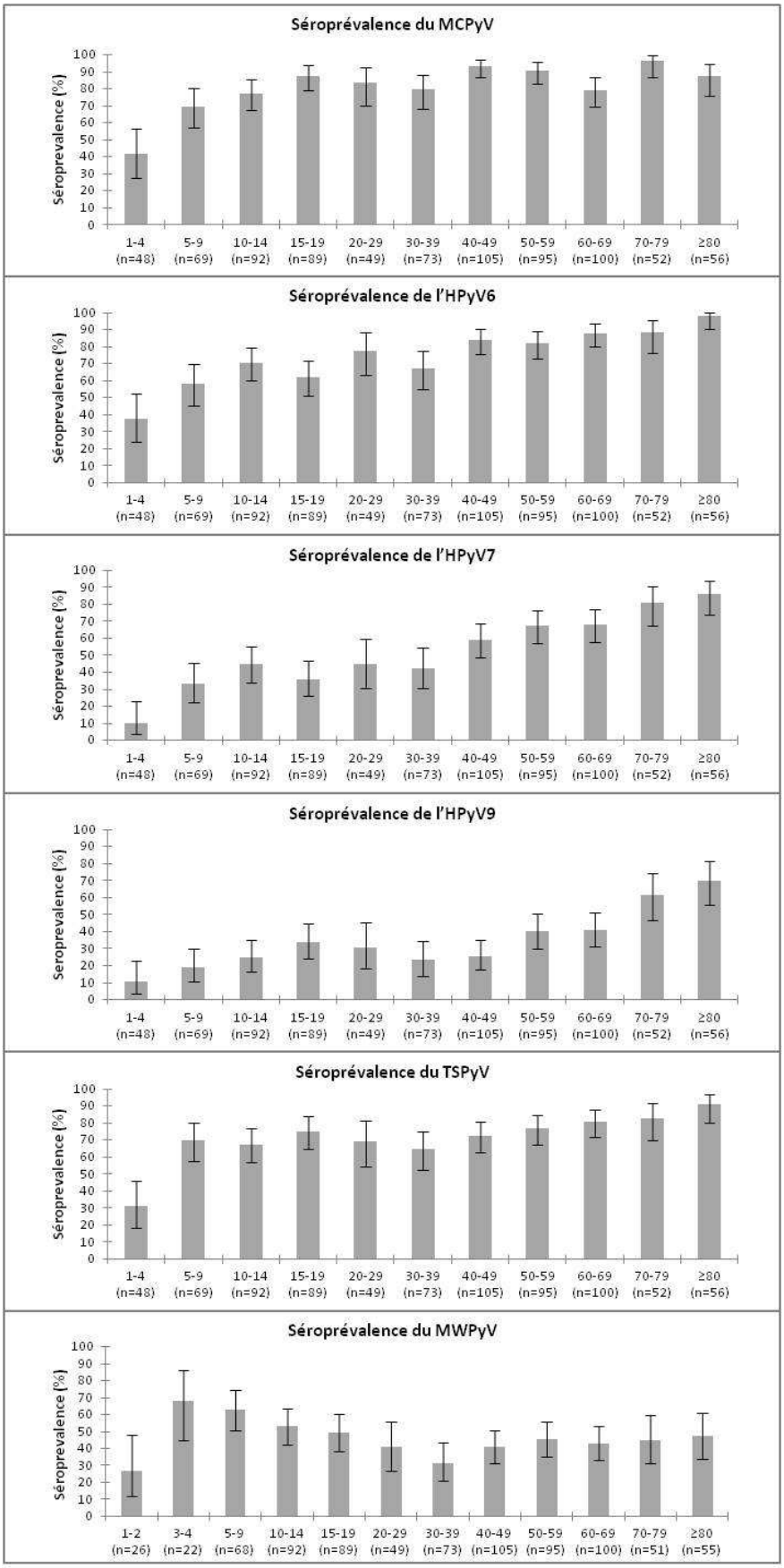


Figure 22 : Séro-épidémiologie de six nouveaux polyomavirus humains. Les séroprévalences sont indiquées en pourcentage et les classes d'âge sont en années. Les effectifs (n) et les intervalles de confiance sont donnés pour chaque classe d'âge.

I.1. Article 1 : Age-Specific Seroprevalences of Merkel Cell Polyomavirus, Human Polyomaviruses 6, 7, and 9, and Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus

CVI
Journals.ASM.org

Age-Specific Seroprevalences of Merkel Cell Polyomavirus, Human Polyomaviruses 6, 7, and 9, and Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus

Jérôme T. J. Nicol,[a,b] Rémy Robinot,[a] Audrey Carpentier,[a,b] Giovanni Carandina,[c] Elisa Mazzoni,[d] Mauro Tognon,[d] Antoine Touzé,[a,b] Pierre Coursaget[a,b]

Université François Rabelais, Laboratory of Molecular Virology and Immunology, Tours, France[a]; INRA UMR 1282, Infections and Public Health, Tours, France[b]; Clinical Laboratory Analysis, Sant'Anna Hospital, Ferrara, Italy[c]; Cell Biology and Molecular Genetics, University of Ferrara, Ferrara, Italy[d]

Six new human polyomaviruses have been identified since 2008 (Merkel cell polyomavirus [MCPyV], human polyomavirus 6 [HPyV6], HPyV7, HPyV9, trichodysplasia spinulosa polyomavirus [TSPyV], and Malawi polyomavirus [MWPyV]). The presence of specific antibodies against MCPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9, and TSPyV in 828 Italian subjects aged 1 to 100 years was investigated by virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). The findings indicate that all of these new polyomaviruses circulate widely in humans, with seroprevalences in adulthood ranging from 39.4% for HPyV9 to 87.1% for MCPyV, and that primary exposure is most intense in childhood, with the exception of HPyV7 and HPyV9, for which the seroprevalence increased throughout life. The proportion of subjects with high antibody titers was found to increase with age for MCPyV and to decrease with age for TSPyV.

Six new human polyomaviruses have been identified since 2008, including the Merkel cell polyomavirus (MCPyV), associated with Merkel cell carcinoma (1); human polyomaviruses 6, 7, and 9 (HPyV6, HPyV7, and HPyV9) (2–4), not associated with any human disease; trichodysplasia spinulosa polyomavirus (TSPyV), detected in skin lesions of patients with a rare skin disease, trichodysplasia spinulosa (5, 6); and the recently discovered Malawi polyomavirus (MWPyV), isolated from stools of a healthy child (7).

Polyomaviruses are small naked DNA viruses with a capsid composed of three proteins, VP1, VP2, and VP3. The VP1 proteins of these polyomaviruses have the capacity to self-assemble into virus-like particles (VLPs) when expressed in eukaryotic systems, allowing the development of assays to detect specific antibodies and to evaluate the seroprevalence of such infections. Little is known about the natural history of these new polyomaviruses in humans (8, 9). However, serological studies have shown that a large proportion of adults have been exposed to these viruses. The age-specific seroprevalences also indicate widespread exposure early in life to MCPyV (10–13) and TSPyV (14, 15). Assays using VLPs or GST-VP1 seem to be type specific, since no evidence of cross-reactivity has been reported between MCPyV and TSPyV (14, 15), BK polyomavirus (BKPyV) and TSPyV (15), MCPyV, BKPyV, and JC polyomavirus (JCPyV) (10–13), or MCPyV, HPyV6, and HPyV7 (3).

The aim of this study was to investigate and compare age-specific seroprevalences of 5 new human polyomaviruses. We showed that MCPyV and TSPyV are the most prevalent of these new polyomaviruses and that the differences in seroprevalence among polyomaviruses are suggestive of differences in modes of transmission and/or in the rate of persistence of the infection.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and samples. Serum samples were collected from 828 individuals from 2010 to 2012. Participants ranged in age from 1 to 100 years and included 350 males and 478 females. Subjects aged 18 to 65 years were healthy blood donors, and sera from subjects aged 1 to 17 years and those aged 66 to 100 years were obtained from discarded clinical laboratory samples, after routine analyses. The hospital records indicated that these samples were from subjects without a history of immuno-suppression/depression, organ transplantation, immunosuppressive drug treatment, or HIV infection. The County Ethics Committee of Ferrara, Italy, approved the project. Consent from participants was not requested for polyomavirus testing, and samples were therefore deidentified and analyzed anonymously, with indication of age and gender only. All serum samples were stored at −20°C until tested.

Production of VLPs. Production of HPyV9 and MCPyV VLPs in insect cells has been described previously (12, 16), and VLPs were also generated for HPyV6, HPyV7, and TSPyV. Briefly, VP1 proteins from HPyV6 and HPyV7 were PCR amplified from the p6VP1 and p7VP1 plasmids, respectively (3). The TSPyV VP1 coding sequence was obtained by total synthesis with a codon usage-adapted sequence for expression in *Spodoptera frugiperda* cells (Genscript, Piscataway, NJ) (sequences were based on those under GenBank accession no. HQ696595 and NC014361.1, respectively). After sequence verification, the different VP1 genes were cloned under the control of the polyhedrin promoter of the pFastBac Dual plasmid and further used to generate recombinant baculoviruses, using the Bac-to-Bac system (Invitrogen, FisherScientific, Illkirch, France). HiFive cells maintained in Grace medium (Invitrogen) were infected with the different recombinant baculoviruses for production of the 5 polyomavirus VLPs. VLPs were purified by ultracentrifugation (18 h at 30,000 rpm in a Beckman SW 32 rotor) in a CsCl gradient. The fraction with a density of 1.272 was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) and submitted to ultracentrifugation (3 h at 32,000 rpm in a

Received 4 September 2012 Returned for modification 28 September 2012
Accepted 23 December 2012
Published ahead of print 9 January 2013
Address correspondence to Pierre Coursaget, coursaget@univ-tours.fr.
Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/CVI.00438-12

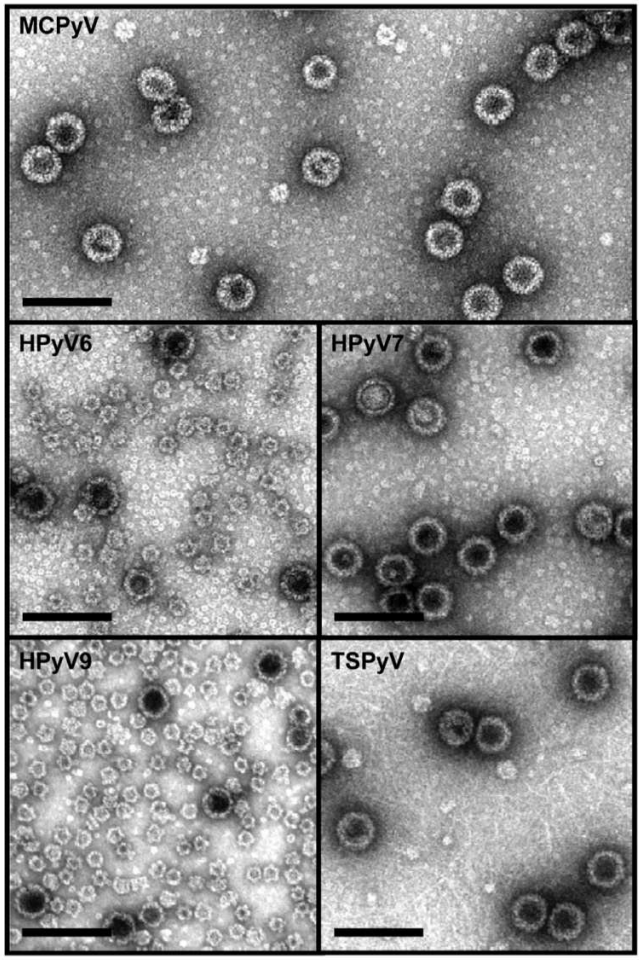


FIG 1 Electron micrographs of MCPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9, and TSPyV VLPs produced in insect cells. Bars, 100 nm.

Beckman SW 32 rotor). The pellet was resuspended in PBS and observed with a JEOL 1011 electron microscope (12, 16) (Fig. 1).

Detection of anti-VP1 antibodies. Microplates (Maxisorp; Nunc) were coated overnight at 4°C with MCPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9, or TSPyV VLPs (100 ng/well in PBS) as previously described (16). Briefly, sera were diluted 1:100, and peroxidase-conjugated anti-human IgG (Southern Biotech, Clinisciences, Nanterre, France) diluted 1:20,000 was used to detect human IgG binding. Histograms of optical density (OD) values for 1- to 10-year-old children (data not shown) revealed a bimodal age distribution of seroreactivity. The cutoff point for seropositivity was defined as the mean of the lower distribution plus 2 standard deviations and was equal to 0.194, 0.169, 0.188, 0.185, and 0.192 for MCPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9, and TSPyV, respectively.

Samples were considered to have high levels of antibodies when the OD value was greater than the median for the seropositive samples, i.e., 2.431 for MCPyV and 1.102 for TSPyV.

MCPyV and TSPyV antibody titers were determined for 48 children aged 1 to 9 years and 48 adults aged more than 60 years. Sera were randomly selected from the subjects who were positive for both anti-MCPyV and anti-TSPyV. Sera were serially diluted 2-fold from 1:100 to 1:204,800, and the endpoint antibody titer was determined as the last dilution that yielded a positive result. Antibody titers were considered to be high if they were in the fourth quartile for all the samples tested for each virus. A high anti-MCPyV titer was >3,200, and a high anti-TSPyV titer was >1,600.

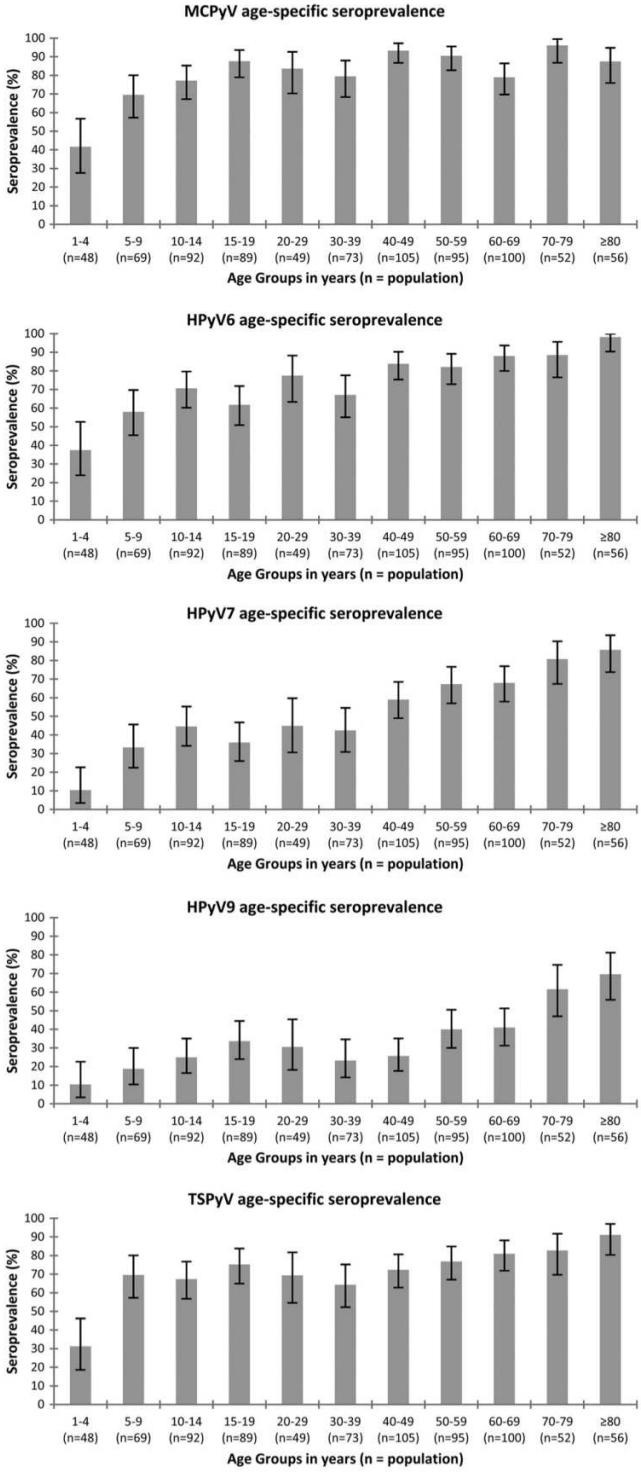


FIG 2 Age-specific seroprevalences of MCPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9, and TSPyV (95% CI are shown).

Statistical methods. Logistic regression with adjustment for age and gender was performed using XLStat software (Addinsoft, France). Age- and gender-adjusted odds ratio estimates (OR*) with 95% confidence intervals (95% CI) were obtained to assess the magnitude and statistical significance of the associations between high levels of antibodies, gender,

TABLE 1 Spearman correlation coefficients for seroreactivity in ELISAs for 5 new human polyomaviruses

Virus	RS value[a] (*P* value)				
	MCPyV	HPyV6	HPyV7	HPyV9	TSPyV
MCPyV	1 (0)				
HPyV6	0.047 ($<10^{-4}$)	1 (0)			
HPyV7	0.056 ($<10^{-4}$)	0.433 ($<10^{-4}$)	1 (0)		
HPyV9	0.042 ($<10^{-4}$)	0.033 ($<10^{-4}$)	0.025 ($<10^{-4}$)	1 (0)	
TSPyV	0.014 (0.001)	0.008 (0.012)	0.002 (0.163)	0.026 ($<10^{-4}$)	1 (0)

[a] RS value, Spearman correlation coefficient.

and age. Correlation analysis of polyomavirus seroreactivities was performed with the Spearman rank correlation test.

RESULTS

Age-specific seroprevalences for the five polyomaviruses investigated are shown in Fig. 2. For MCPyV, the seroprevalence increased with age, from 41.7% in children aged 1 to 4 years to 87.6% in those aged 15 to 19 years. MCPyV seroprevalence was relatively stable in adulthood (79.0% to 96.2%). High levels of infection were also observed for TSPyV and HPyV6. TSPyV antibodies were detected in 31.3% of infants aged 1 to 4 years, and the level increased to 75.3% for children aged 15 to 19 years. There was a slight increase in seroprevalence with age in adulthood, increasing from 64.4% of 30- to 39-year-olds to 91.1% of those aged 80 years and older. Similarly, HPyV6 antibodies were detected in 37.5% of 1- to 4-year-old children and 61.8% of 15- to 19-year-old children, and the seroprevalence increased slightly in adulthood, from 67.1% for 30- to 39-year-old adults to 98.2% for those aged 80 years and older. The seroprevalences of HPyV7 were lower than those shown above, with only 10.4% of 1- to 4-year-old children and 36.0% of 15- to 19-year-olds being seropositive. In adulthood ($\geq$20 years), there was a clear increase in seroprevalence with age (44.9% to 85.7%). The lowest seroprevalence observed was for HPyV9, since only 10.4% of 1- to 4-year-olds and 33.7% of 15- to 19-year-old children were seropositive. As for HPyV7, the HPyV9 seroprevalence increased regularly with age, reaching only 41.0% for 60- to 69-year-olds and 69.6% for those aged 80 years and older. In adulthood ($\geq$20 years), seroprevalences for MCPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9, and TSPyV were 87.0%, 83.4%, 63.6%, 39.4%, and 76.4%, respectively. Correlation analysis of OD values for all polyomaviruses investigated (Table 1) showed no correlation between these polyomaviruses, with the exception of HPyV6 and HPyV7, for which a Spearman coefficient of 0.433 ($P < 10^{-4}$) was found (Table 1).

Scattergram distributions of OD values for the five polyomaviruses studied indicated that high values were observed for MCPyV and TSPyV but not for HPyV6, -7, and -9 (Fig. 3). High OD values above the median for positive samples were positively associated with age for MCPyV, increasing from 35.03% of

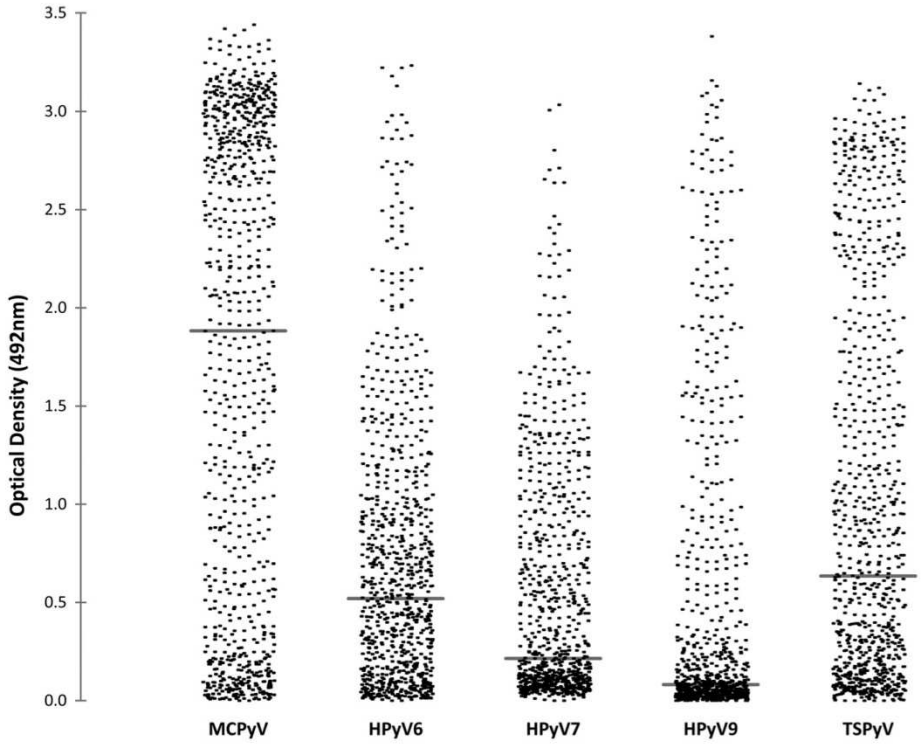


FIG 3 Scattergrams representing the distributions of the 828 human sample reactivities with MCPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9, and TSPyV VLPs (gray bars represent medians).

TABLE 2 High levels of MCPyV and TSPyV in seropositive subjects according to age and sex[a]

Virus	Group	No. of subjects with high level/ no. of positive subjects (%)	OR* (95% CI)[b]	*P* value[c]
MCPyV	Females	192/389 (49.4)	1	
	Males	147/289 (50.9)	1.00 (0.73–1.37)	0.993
	1- to 9-year-olds	24/68 (35.3)	1	
	10- to 19-year-olds	55/149 (36.9)	1.12 (0.61–2.06)	0.710
	20- to 39-year-olds	35/99 (35.4)	1.07 (0.55–2.09)	0.847
	40- to 59-year-olds	114/184 (62.0)	3.02 (1.68–5.41)	**1.5×10^{-4}**
	≥60-year-olds	111/178 (62.4)	2.90 (1.62–5.20)	**2.5×10^{-4}**
TSPyV	Females	163/343 (47.5)	1	
	Males	136/254 (53.5)	1.33 (0.93–1.89)	0.113
	1- to 9-year-olds	44/63 (69.8)	1	
	10- to 19-year-olds	97/129 (75.2)	1.36 (0.69–2.67)	0.377
	20- to 39-year-olds	46/81 (56.8)	0.63 (0.31–1.29)	0.207
	40- to 59-year-olds	53/149 (35.6)	0.25 (0.13–0.47)	**$<1 \times 10^{-4}$**
	≥60-year-olds	59/175 (33.7)	0.22 (0.12–0.41)	**$<1 \times 10^{-4}$**

[a] The median ODs for seropositive samples (2.431 and 1.102 for MCPyV and TSPyV, respectively) were used as cutoffs for high levels of virus.
[b] OR*, OR adjusted for age and sex.
[c] Significant *P* values are in bold.

TABLE 3 High antibody titers for MCPyV and TSPyV in seropositive subjects according to age and sex[a]

Virus	Group	No. of subjects with high antibody titer/ no. of positive subjects (%)	OR* (95% CI)[b]	*P* value[c]
MCPyV	Females	7/45 (15.6)	1	
	Males	11/51 (21.6)	1.73 (0.59–5.10)	0.321
	1- to 9-year-olds	5/48 (10.4)	1	
	≥60-year-olds	13/48 (27.1)	3.42 (1.09–10.69)	**0.034**
TSPyV	Females	10/45 (22.2)	1	
	Males	13/51 (25.5)	0.97 (0.34–2.75)	0.956
	1- to 9-year-olds	20/48 (41.7)	1	
	≥60-year-olds	3/48 (6.3)	0.09 (0.03–0.34)	**3.7×10^{-4}**

[a] The threshold titers of the fourth quartile of positive samples (>3,200 and >1,600 for MCPyV and TSPyV, respectively) were used as cutoffs for high antibody titers.
[b] OR*, OR adjusted for age and sex.
[c] Significant *P* values are in bold.

MCPyV-positive samples for 1- to 9-year-old children to 62.4% of MCPyV-positive samples for those aged 60 years and older (OR* = 2.90; $P = 2.5 \times 10^{-4}$). In contrast, high enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) levels of reactivity against TSPyV were negatively associated with age, decreasing from 69.8% for 1- to 9-year-old children to 33.7% for older subjects (OR* = 0.22; $P \leq 10^{-4}$) (Table 2).

In order to confirm the high levels of reactivity variations observed throughout the age groups, using single 1/100 dilutions, endpoint dilution titers were determined for a subset of the children (48 children aged 1 to 9 years old) and the oldest adults (48 adults aged more than 60 years). High antibody titers were positively associated with age for MCPyV, increasing from 10.4% of MCPyV-positive samples for 1- to 9-year-old children to 27.1% of MCPyV-positive samples for those aged 60 years and older (OR* = 3.42; $P = 0.034$). On the other hand, high antibody titers against TSPyV were negatively associated with age, decreasing from 41.7% for 1- to 9-year-old children to 6.3% for older subjects (OR* = 0.09; $P = 3.7 \times 10^{-4}$) (Table 3). These results confirmed those based on high OD values, using a single dilution.

DISCUSSION

Antibodies against recently discovered human polyomaviruses were investigated in Italian subjects. Antibodies to MCPyV VP1 were detected in 87% of adults, a proportion similar to the 85% we previously reported for a limited number of blood donors (12) and the 66 to 81% reported for adults in Italy based on a VP1-VLP-based ELISA (13) and slightly higher than the 46 to 64% reported in the United States based on a VP1-GST Luminex-based assay (17), VP1-GST capsomere-based ELISA (10), or VLP-based ELISA (11). Primary exposure to MCPyV probably occurred mainly in early childhood, as there was a seroprevalence of 58% in children less than 10 years of age. This seroprevalence was slightly higher than the 45% reported for children less than 10 years of age in Italy (13) and the 43 to 49% reported for 2- to 15-year-old children in the United States (11) but much higher than the 20 to 30% in the United States reported by Kean et al. (10). In addition, we observed that more than 82% of 10- to 19-year-old subjects had anti-MCPyV antibodies, a proportion higher than the 38 to 60% reported by others for subjects of similar age (10, 13).

We confirmed recently reported findings, obtained using VLP-based ELISA (14) and a VP1-GST Luminex-based assay (15), that TSPyV seroprevalence is high in adults (76%) and comparable to that of MCPyV (87%). However, in contrast to the findings reported by Chen et al. (14), we found that MCPyV seroprevalence was slightly higher than TSPyV seroprevalence in children (Fig. 2). TSPyV seropositivities of 31% among 1- to 4-year-olds and 70% among 5- to 9-year-old children were observed in Italy and were higher than those recently reported by van der Meijden et al. (15) in the Netherlands (41% of 1- to 9-year-old children) and by Chen et al. (14) in Finland (5% of 1- to 4-year-olds and 48% of 6- to 10-year-old children).

A higher seroprevalence was observed for HPyV6 (83%) than for HPyV7 (64%) in adults, similar to the levels reported by Schowalter et al. (3), who used VLP-based ELISAs (69% for HPyV6 and 35% for HPyV7). HPyV9 seroprevalence slowly increased with age in children, reaching only 34% at 15 to 19 years of age and being similar in children and young adults to levels recently reported in Germany (13% in 2- to 5-year-old children and 38% in 11- to 20-year-olds) by Trusch et al. (18), who used a VP1-GST capsomere-based ELISA. However, our results differed for adulthood, since a regular increase in seroprevalence with age was observed, reaching 70% for subjects aged 80 years and older, whereas Trusch et al. (18) reported a peak seroprevalence of 53% in young adults (21- to 30-year-olds) and then a decrease to 35% for 60-year-olds. The differences in seroprevalences reported for these five polyomaviruses between studies could represent true differences in seroprevalence in different countries but could also reflect differences in study populations, in techniques used for the detection of antibodies, and in cutoff definitions.

In our series, the age distribution of positive samples for HPyV6 was similar to those observed for MCPyV and TSPyV, for which infection in adulthood seems rare. In contrast, the regular increase in seroprevalence with age for HPyV7 and HPyV9 suggests that transmission of these two polyomaviruses occurs

throughout life. In addition, we confirmed that there is no cross-reactivity between these new human polyomaviruses, with the exception of HPyV6 and HPyV7, in contrast to the results reported by Schowalter et al. (3). However, cross-reactivity between polyomaviruses has already been reported for BKPyV and simian virus 40 (SV40) (19, 20) and for HPyV9 and African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus (LPyV) (16, 18).

Our study has some limitations because the subjects were either blood donors or nonhospitalized patients. However, the sera investigated had been drawn from subjects without a history of immuno-suppression/depression, organ transplantation, immunosuppressive drug treatment, or HIV infection. It is thus unlikely that the seroprevalences reported were significantly different from those in the general Italian population. In addition, there was some heterogeneity in the different VP1 preparations used, but it is unlikely that this would explain the differences in reactivity observed between the different polyomaviruses. No difference in reactivity against monoclonal antibodies was observed between VLPs and capsomeres for papillomaviruses (21), and this can be expected to be the same for polyomaviruses, since all structures have conformational epitopes at the surface. In addition, the variations in the proportions of capsomeres, intermediate-sized capsids, and full-sized VLPs between the different VP1 preparations are unlikely to explain the differences in reactivity observed between polyomaviruses, since, for example, the proportion of small particles and capsomeres was greater in HPyV6 than in HPyV7 preparations but the HPyV6 seroprevalence was higher than the HPyV7 seroprevalence.

A clear increase in high ELISA OD values with age, confirmed by a larger proportion of high titers, was observed for MCPyV antibodies (Tables 2 and 3), in agreement with the findings of Viscidi et al. (13) suggesting that antibody titers increased with age and with those of Tolstov et al. (11) indicating that in most subjects who seroconverted, MCPyV IgG levels increased with advancing age. A correlation between MCPyV loads and antibody titers has been reported (22, 23), suggesting that life-long persistence of MCPyV infection is correlated with higher antibody levels. The increase in MCPyV antibody levels with age may thus reflect the fact that subjects with high antibody titers had active viral replication associated with VP1 production, a state more frequently observed in older subjects due to waning immunity.

Decreases in the proportions of both high TSPyV ELISA OD values and high TSPyV antibody titers were observed with advancing age (Tables 2 and 3), in agreement with a recent study on BKPyV (13), suggesting that TSPyV did not replicate actively in most of the adult individuals. The persistence of TSPyV is not known. However, the fact that antibody levels declined with age suggests that in contrast to the case for MCPyV, active replication of this polyomavirus is a rare event in adulthood or TSPyV replication is restricted to an immunoprivileged site. Since trichodysplasia spinulosa is a very rare disease that occurs in immunocompromised patients, it could be speculated that primary infection with TSPyV, which is asymptomatic, becomes latent in most individuals and may be reactivated under conditions of immunosuppression.

In conclusion, our findings emphasize the fact that there are differences between the age-specific seroprevalences of these 5 new human polyomaviruses. Because our study cohort was not population based, the seroprevalences reported do not necessarily indicate precise seroepidemiology. However, our findings demonstrate that these polyomaviruses circulate widely in the Italian population, with primary exposure occurring mainly in early childhood, with the exception of HPyV9. For all of the polyomaviruses investigated, there was a tendency toward an increase in seroprevalence in adulthood with advancing age. In addition, the increase in antibody levels with age observed for MCPyV suggests a reactivation of the virus at older ages, with waning immunity with age potentially being responsible for reactivation of infection. In contrast to the case for MCPyV, the decrease in antibody levels with age observed for TSPyV suggests that persistence and latency in immunocompetent individuals are less frequent with this polyomavirus, thus resulting in lowering of antibody levels. Such differences also suggest that these five new human polyomaviruses may have different modes of transmission and capacities of persistence.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre-Yves Sizaret and Julien Gaillard (INSERM U966, F Rabelais University, Tours, France) for help with electron microscopy of the VLPs.

The authors have no potential conflicts of interest.

This research was supported by grants to P.C. by the Ligue Contre le Cancer in 2010 and 2011 (Comités de l'Indre et Loire, du Cher, de l'Indre, du Maine et Loire, et de la Sarthe) and to M.T. by the University of Ferrara (FAR project). J.T.J.N. is a Ph.D. fellow of the Region Centre (France), and E.M. is a fellowship recipient of the Fondazione Umberto Veronesi (Italy).

REFERENCES

1. **Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS.** 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science **319**:1096–1100.
2. **Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB.** 2010. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. Cell Host Microbe **7**:509–515.
3. **Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B.** 2011. A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. J. Virol. **85**:4586–4590.
4. **Sauvage V, Foulongne V, Cheval J, Ar Gouilh M, Pariente K, Dereure O, Manuguerra JC, Richardson J, Lecuit M, Burguière A, Caro V, Eloit M.** 2011. Human polyomavirus related to African green monkey lymphotropic polyomavirus. Emerg. Infect. Dis. **17**:1364–1370.
5. **Kazem S, van der Meijden E, Kooijman S, Rosenberg AS, Hughey LC, Browning JC, Sadler G, Busam K, Pope E, Benoit T, Fleckman P, de Vries E, Eekhof JA, Feltkamp MCW.** 2012. Trichodysplasia spinulosa is characterized by active polyomavirus infection. J. Clin. Virol. **53**:225–230.
6. **van der Meijden E, Janssens RWA, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MCW.** 2010. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. PLoS Pathog. **6**:e1001024. doi:10.1371/journal.ppat.1001024.
7. **Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D.** 2012. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. J. Virol. **86**:10321–10326.
8. **Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ.** 2009. The role of polyomaviruses in human disease. Virology **384**:266–273.
9. **Nicol J, Touzé A.** 2011. Prevalence of polyomaviruses and links with human diseases. Future Virol. **6**:1187–1197.
10. **Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL.** 2009. Seroepidemiology of human polyomaviruses. PLoS Pathog. **5**:e1000363. doi:10.1371/journal.ppat.1000363.
11. **Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H, Becker JC, Jenkins FJ, Moschos S, Chang Y, Buck CB, Moore PS.** 2009. Human Merkel cell polyomavirus infection. II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. Int. J. Cancer **125**:1250–1256.
12. **Touzé A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury MJ, Combelas N, Sizaret P-Y, Guyetant S, Maruani A, Baay M, Tognon M, Coursaget P.** 2010.

Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. J. Clin. Microbiol. **48**:1767–1770.

13. **Viscidi RP, Rollison DE, Sondak VK, Silver B, Messina JL, Giuliano AR, Fulp W, Ajidahun A, Rivanera D.** 2011. Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus. Clin. Vaccine Immunol. **18**:1737–1743.
14. **Chen T, Mattila PS, Jartti T, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M, Hedman K.** 2011. Seroepidemiology of the newly found trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. J. Infect. Dis. **204**:1523–1526.
15. **van der Meijden E, Kazem S, Burgers MM, Janssens R, Bouwes Bavinck JN, de Melker H, Feltkamp MCW.** 2011. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. Emerg. Infect. Dis. **17**:1355–1363.
16. **Nicol JT, Touze A, Robinot R, Arnold F, Mazzoni E, Tognon M, Coursaget P.** 2012. Seroprevalence and cross-reactivity of human polyomavirus 9. Emerg. Infect. Dis. **18**:1329–1332.
17. **Carter JJ, Paulson KG, Wipf GC, Miranda D, Madeleine MM, Johnson LG, Lemos BD, Lee S, Warcola AH, Iyer JG, Nghiem P, Galloway DA.** 2009. Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. **101**:1510–1522.
18. **Trusch F, Klein M, Finsterbusch T, Kühn J, Hofmann J, Ehlers B.** 2012. Seroprevalence of human polyomavirus 9 and cross-reactivity to African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. J. Gen. Virol. **93**:698–705.
19. **Carter JJ, Madeleine MM, Wipf GC, Garcea RL, Pipkin PA, Minor PD, Galloway DA.** 2003. Lack of serologic evidence for prevalent simian virus 40 infection in humans. J. Natl. Cancer Inst. **95**:1522–1530.
20. **Viscidi RP, Clayman B.** 2006. Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. Adv. Exp. Med. Biol. **577**:73–84.
21. **Rizk RZ, Christensen ND, Michael KM, Müller M, Sehr P, Waterboer T, Pawlita M.** 2008. Reactivity pattern of 92 monoclonal antibodies with 15 human papillomavirus types. J. Gen. Virol. **89**:117–129.
22. **Faust H, Pastrana DV, Buck CB, Dillner J, Ekström J.** 2011. Antibodies to Merkel cell polyomavirus correlate to presence of viral DNA in the skin. J. Infect. Dis. **203**:1096–1100.
23. **Pastrana DV, Wieland U, Silling S, Buck CB, Pfister H.** 2012. Positive correlation between Merkel cell polyomavirus viral load and capsid-specific antibody titer. Med. Microbiol. Immunol. **201**:17–23.

I.2. Article 2 : Seroprevalence of Human Malawi Polyomavirus

JCM
Journals.ASM.org

Seroprevalence of Human Malawi Polyomavirus

Jérôme T. J. Nicol,[a,b] Valérie Leblond,[a,b] Françoise Arnold,[a,b] Giovanni Guerra,[d] Elisa Mazzoni,[c] Mauro Tognon,[c] Pierre Coursaget,[a] Antoine Touzé[a,b]

Université François Rabelais, Virologie Immunologie Moléculaires, Tours, France[a]; INRA UMR 1282, Infectiologie et Santé Publique, Tours, France[b]; Department of Morphology, Surgery and Experimental Medicine, School of Medicine, University of Ferrara, Ferrara, Italy[c]; Clinical Laboratory Analysis, Sant'Anna University Hospital, Ferrara, Italy[d]

The seroprevalence of the recently discovered human Malawi polyomavirus (MWPyV) was determined by virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in age-stratified Italian subjects. The findings indicated that MWPyV infection occurs early in life, and seroprevalence was shown to reach 42% in adulthood.

Twelve human polyomaviruses have been described to date, including JC and BK polyomaviruses (JCPyV and BKPyV), Karolinska Institute polyomavirus (KIPyV), Washington University polyomavirus (WUPyV), Merkel cell polyomavirus (MCPyV), human polyomaviruses 6 and 7 (HPyV6 and HPyV7), trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV), human polyomavirus 9 (HPyV9) (1), and three recently identified polyomaviruses, i.e., Malawi polyomavirus/human polyomavirus 10 (MWPyV/HPyV10), Saint Louis polyomavirus (STLPyV) isolated from stools (2–4), and human polyomavirus 12 (HPyV12) identified in the liver (5).

Polyomavirus infections are ubiquitous, with seroprevalence ranging from 40 to 90% in adults, and asymptomatic infections occur early in childhood (6–12).

Four human polyomaviruses are associated with disease. JCPyV causes progressive multifocal leukoencephalopathy, BKPyV is the cause of hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients and induced nephropathy frequently followed by graft loss in renal transplant patients. MCPyV is responsible for Merkel cell carcinoma (MCC), which occurs mainly in elderly individuals and immunocompromised subjects, and TSPyV is associated with trichodysplasia spinulosa. JCPyV-, BKPyV-, and TSPyV-associated diseases have been observed only in immunocompromised subjects (1, 13).

In this study, we investigated the seroepidemiology of the recently identified Malawi polyomavirus in an Italian population using a virus-like particle (VLP)-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and evaluated the existence of cross-reactivity with MCPyV, HPyV6, HPyV7, TSPyV, and HPyV9 polyomaviruses.

MWPyV seroprevalence was determined in 825 Italian subjects 1 to 100 years of age. This study population has previously been investigated for reactivity against five other polyomaviruses (12), and the approach here was similar. Antibodies against MWPyV were determined using a VLP-based ELISA (14). The MWPyV VP1 coding sequence (GenBank accession no. NC_018102.1) was codon optimized for expression in *Spodoptera frugiperda* cells (Genscript, Piscataway, NJ) and used to generate a recombinant baculovirus. The presence of 45- to 50-nm VLPs and smaller particles was observed by electron microscopy (Fig. 1). Purified MWPyV VLPs (100 ng/well in phosphate-buffered saline [PBS]) were used to sensitize microplates (Maxisorp; Nunc) overnight at 4°C. Briefly, sera were diluted 1:100, and peroxidase-conjugated anti-human IgG (Southern Biotech, Clinisciences, Nanterre, France) diluted 1:20,000 was used to detect human IgG binding

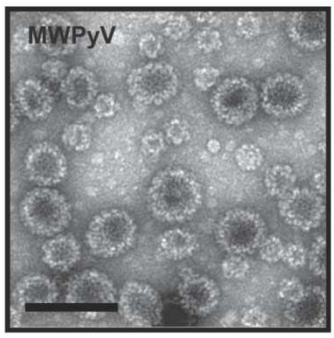


FIG 1 Electron microscopy of Malawi polyomavirus VP1 VLPs produced in insect cells (scale bar,100 nm).

(14). A histogram of the ELISA optical density (OD) values in 1- to 10-year-old children (data not shown) revealed a bimodal distribution of seroreactivity. The cutoff point for MWPyV positivity was therefore set at 0.199 (mean of the lowest distribution of OD values plus 2 standard deviations).

Cross-reactivity between MWPyV and MCPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9, and TSPyV was evaluated by determining the Spearman coefficient correlation (R_S) between OD values for MWPyV and OD values for the five other polyomaviruses (XLStat software; Addinsoft, Paris, France). The results clearly indicated the absence of cross-reactivity between MWPyV and MCPyV ($R_S = 0.012$, $P = 0.002$), HPyV6 ($R_S = 3.10^{-5}$, $P = 0.871$), HPyV7 ($R_S = 6.10^{-5}$, $P = 0.828$), HPyV9 ($R_S = 0.024$, $P < 1.10^{-4}$), and TSPyV ($R_S = 0.027$, $P < 1.10^{-4}$).

Figure 2 summarizes MWPyV age-specific seroprevalence. MWPyV antibodies were detected in 26.9% of 1- to 2-year-old children and then increased to 68.2% in the 3- to 4-year-old age group. After this peak, seroprevalence slowly decreased with age to 31.5% in the 30- to 39-year-old age group. The mean seropreva-

Received 30 September 2013 **Returned for modification** 10 October 2013
Accepted 20 October 2013
Published ahead of print 30 October 2013
Editor: A. M. Caliendo
Address correspondence to Antoine Touzé, antoine.touze@univ-tours.fr.
Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/JCM.02730-13

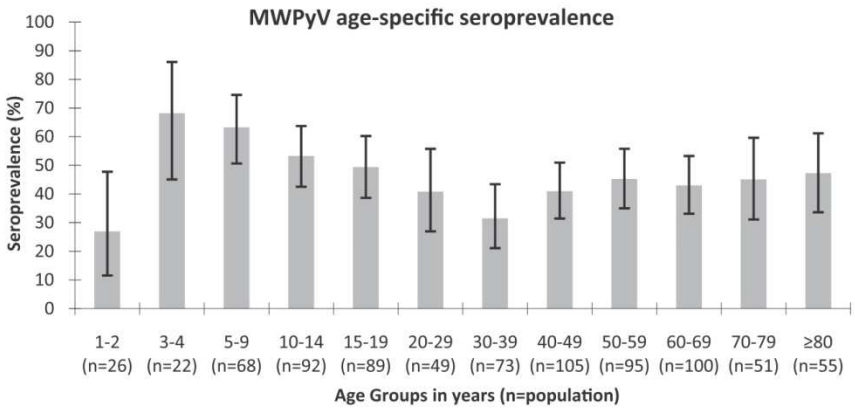


FIG 2 Age-specific seroprevalence of Malawi polyomavirus (error bars represent 95% CI).

lence was 41.8% and was relatively stable in adulthood (>20 years) through to old age (range, 31.5% to 47.3%). No difference in MWPyV seroprevalence according to gender was observed (data not shown).

In order to investigate variations in antibody level according to age, as observed for other polyomaviruses (12), samples were considered as having high levels of antibodies when the OD value was greater than that for the third quartile of seropositive samples (OD = 0.776). Age- and sex-adjusted odds ratio estimates (OR*) with 95% confidence intervals were calculated (XLStat software) to assess the association between high reactivity, gender, and age (Table 1). High reactivity was not associated with gender (OR* = 1.175, $P = 0.514$). However, high reactivity was negatively associated with age, since the percentage of high OD values decreased significantly with age from 38.5% in 1- to 9-year-old children to 18.6% in the 20- to 39-year-old adult group (OR* = 0.325, $P = 0.018$). Moderate variations in the percentage of high-level reactivity were observed after 20 years of age, since high OD values were detected in 19.8% and 22.8% of 40- to 59-year-olds and of those ≥60 years old, respectively.

MWPyV infection is relatively common, since a seroprevalence of 41.8% was observed in adulthood. This seroprevalence was similar to the seroprevalence of 39.4% reported for HPyV9 (12) but lower than the seroprevalence reported for MCPyV, HPyV6, HPyV7, and TSPyV (63.6% to 87.0%) (12). The relatively low seroprevalence observed for MWPyV correlates with the detection of its DNA in only 2.3% of human stools (2), similar to levels observed for HPyV9, for which seroprevalence and DNA prevalence are low (12, 15, 16).

MWPyV seroconversion occurs early in life, as observed with other polyomaviruses (8, 12), since 26.9% of 1- to 2-year-old children were seropositive, followed by a seroprevalence peak of 68.2% in 2- to 4-year-old children.

The OD value at a 1:100 dilution of the sera can be used as a surrogate for antibody titer, and it has been shown that titers increase with age for MCPyV and decrease with age for TSPyV (12). A decrease in the percentage of high reactivity with age was also observed for MWPyV, suggesting that MWPyV clearance occurs or that there is an absence of reactivation with age, as reported for TSPyV (12).

Correlation analysis suggested an absence of cross-reactivity between MWPyV and the five human polyomaviruses tested. Nevertheless, the recently discovered Saint Louis polyomavirus (4) is closely-related to MWPyV and further studies are needed to investigate any cross-reactivity between these two polyomaviruses.

In this study, we determined that MWPyV seroprevalence was 41.8% in our adult population and that infection occurred early in life, as observed for other human polyomaviruses. Further studies are required to elucidate the transmission mode of Malawi polyomavirus in humans and its potential involvement in human diseases and cancers in both immunocompetent and immunocompromised patients.

TABLE 1 Levels of Malawi polyomavirus reactivity according to age and gender in seropositive subjects[a]

Parameter	No. of subjects with high antibody levels/no. of antibody-positive subjects (%)	OR* (95% CI)[b]	*P* value
Gender			
Female	54/229 (23.6)	1	
Male	42/150 (28.0)	1.175 (0.725–1.904)	0.514
Age			
1–9 yr	25/65 (38.5)	1	
10–19 yr	25/93 (26.9)	0.610 (0.306–1.217)	0.161
20–39 yr	8/43 (18.6)	**0.325** (0.124–0.854)	0.018
40–59 yr	17/86 (19.8)	**0.400** (0.192–0.833)	0.013
≥60 yr	21/92 (22.8)	**0.480** (0.238–0.966)	0.039

[a] OR*, adjusted OR (adjusted for age and gender). The third quartile of OD values of seropositive samples (0.776) was used as the cutoff for high levels of antibodies.
[b] Boldface values indicate significant OR* at $P \leq 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre-Yves Sizaret for help with electron microscopy of VLPs.

J.T.J.N. was supported by a doctoral grant from the Région Centre, France, and E.M. is a postdoctoral fellow of the Veronesi Foundation(Milan, Italy) at the University of Ferrara, Ferrara, Italy. This study was also funded by grants to P.C. from the Ligue Contre le Cancer (Comité du Cher and Comité de l'Indre; 2011) and to M.T. from the University of Ferrara.

We have no conflicts of interest.

REFERENCES

1. **Feltkamp MCW, Kazem S, van der Meijden E, Lauber C, Gorbalenya AE.** 2013. From Stockholm to Malawi: recent developments in studying

human polyomaviruses. J. Gen. Virol. **94:**482–496. http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.048462-0.
2. **Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D.** 2012. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. J. Virol. **86:**10321–10326. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01210-12.
3. **Buck CB, Phan GQ, Raiji MT, Murphy PM, McDermott DH, McBride AA.** 2012. Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. J. Virol. **86:**10887. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01690-12.
4. **Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, Stine OC, Skelton R, Brennan DC, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D.** 2013. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. Virology **436:**295–303. http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.12.005.
5. **Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, Moens U, Sauer I, Voigt S, Schmuck R, Ehlers B.** 2013. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. PLoS One **8:**e58021. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058021.
6. **Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH.** 2009. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. J. Infect. Dis. **199:**837–846. http://dx.doi.org/10.1086/597126.
7. **Nguyen NL, Le BM, Wang D.** 2009. Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses. Emerg. Infect. Dis. **15:**1199–1205. http://dx.doi.org/10.3201/eid1508.090270.
8. **Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL.** 2009. Seroepidemiology of human polyomaviruses. PLoS Pathog. **5:**e1000363. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000363.
9. **Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB.** 2010. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. Cell Host Microbe **7:**509–515. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.006.
10. **Chen T, Mattila PS, Jartti T, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M, Hedman K.** 2011. Seroepidemiology of the newly found trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. J. Infect. Dis. **204:**1523–1526. http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir614.
11. **Nicol JTJ, Touzé A, Robinot R, Arnold F, Mazzoni E, Tognon M, Coursaget P.** 2012. Seroprevalence and cross-reactivity of human polyomavirus 9. Emerg. Infect. Dis. **18:**1329–1332. http://dx.doi.org/10.3201/eid1808.111625.
12. **Nicol JT, Robinot R, Carpentier A, Carandina G, Mazzoni E, Tognon M, Touzé A, Coursaget P.** 2013. Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9 and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. Clin. Vaccine Immunol. **20:**363–368. http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00438-12.
13. **Nicol JT, Touzé A.** 2011. Prevalence of polyomaviruses and links with human diseases. Future Virol. **6:**1187–1197. http://dx.doi.org/10.2217/fvl.11.96.
14. **Touzé A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury MJ, Combelas N, Sizaret P-Y, Guyetant S, Maruani A, Baay M, Tognon M, Coursaget P.** 2010. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. J. Clin. Microbiol. **48:**1767–1770. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01691-09.
15. **Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B.** 2011. A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. J. Virol. **85:**4586–4590. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02602-10.
16. **Trusch F, Klein M, Finsterbusch T, Kühn J, Hofmann J, Ehlers B.** 2012. Seroprevalence of human polyomavirus 9 and cross-reactivity to African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. J. Gen. Virol. **93:**698–705. http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.039156-0.

I.3. Article 3 : Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings

II. Réactivités croisées entre polyomavirus humain et simiens proches

En parallèle des travaux menés sur l'épidémiologie des polyomavirus humains, nous nous sommes aussi intéressés à la spécificité des anticorps naturels dirigés contre les polyomavirus. En effet, certains polyomavirus induisent des anticorps cross-réactifs avec des polyomavirus phylogénétiquement proches. Par exemple, chez l'Homme, les infections à BKPyV et JCPyV induisent des anticorps cross-réactifs vis-à-vis du SV40 expliquant ainsi le caractère séropositif de certains humains pour le SV40 (Figure 23Figure 23).

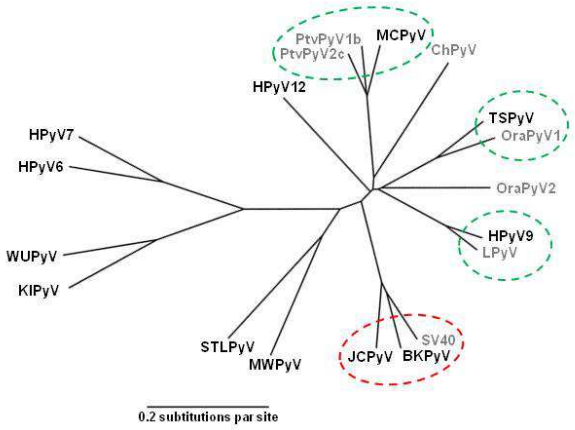


Figure 23 : Relation phylogénétique entre polyomavirus humains et simiens basée sur la protéine majeure capside VP1. Les polyomavirus humains sont écrits en noir et les polyomavirus simiens en gris. L'ellipse rouge entoure les polyomavirus pour lesquels des réactivités croisées sont décrites. Les ellipses vertes désignent des réactivités croisées potentielles.

Au cours d'une première étude, nous avons exploré la possibilité d'infections chez l'Homme par le polyomavirus lymphotropique (LPyV), un polyomavirus simien. En effet, depuis sa découverte en 1979, 15 à 30% des humains sont décrits séropositifs pour ce virus. La découverte récente du polyomavirus humain 9 (HPyV9), phylogénétiquement très proche du LPyV (Figure 23) pouvait expliquer la séropositivité observée chez l'Homme pour le LPyV.

Les VLP-VP1 de ces deux virus ont été produites dans le système baculovirus/cellules d'insecte et utilisées pour détecter des anticorps lors de tests ELISA indirects. Au cours de cette étude, nous avons montré que les prélèvements humains séropositifs pour le LPyV étaient aussi séropositifs pour l'HPyV9. Ces résultats ne sont pas le fruit d'une double infection HPyV9/LPyV car nous avons montré que la réactivité des sera pour le LPyV était abolie par pré-incubation des sera avec des VLP de l'HPyV9. En revanche, la réactivité

dirigée contre l'HPyV9 n'est pas abolie par pré-incubation des sera avec le LPyV. Les anticorps dirigés contre l'HPyV9 reconnaissent donc aussi le LPyV. La séropositivité vis-à-vis du LPyV chez l'Homme étant donc due à ces anticorps cross-réactifs, nous avons ainsi pu montrer qu'il n'y a pas d'infection à LPyV chez l'Homme. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans Emerging Infectious Diseases (Article 4).

Au cours d'une seconde étude, nous avons aussi évalué les réactivités croisées entre le MCPyV et deux polyomavirus de chimpanzé (PtvPyV1b et PtvPyV2c) phylogénétiquement proches (Figure 23). Les VLP-VP1 de ces différents virus ont été produites et les résultats montrent de très fortes réactivités croisées entre ces trois virus. En revanche, les tests d'inhibitions par compétition ont montré que les polyomavirus de chimpanzé n'infectent pas l'Homme. il faudra clarifier notre demarche intelectuelle et l'exposer

Lors de ce travail, l'existence de réactivités croisées possibles, entre le TSPyV et un virus d'orang outang proche (Figure 23), l'OraPyV1 a aussi été envisagées. Les résultats montrent que les infections à TSPyV n'induisent pas d'anticorps cross-réactifs dirigés contre l'OraPyV1. Malgré l'absence de réactivités croisées entre ces deux virus, 4% des prélèvements humains sont séropositifs pour l'OraPyV1, avec des réactivités faibles. L'existence d'un polyomavirus humain encore inconnu, phylogénétiquement très proche de l'OraPyV1 pourrait expliquer que certains sera humains soient positifs pour l'OraPyV1. Ces résultats ont fait l'objet de la rédaction d'un manuscrit actuellement soumis au journal Plos One (Article 5).

II.1. Article 4 : Seroprevalence and Cross-reactivity of Human Polyomavirus 9

Seroprevalence and Cross-reactivity of Human Polyomavirus 9

Jérôme T.J. Nicol, Antoine Touzé, Rémy Robinot, Francoise Arnold, Elisa Mazzoni, Mauro Tognon, and Pierre Coursaget

Many humans have antibodies against simian lymphotropic polyomavirus (LPyV), but its DNA has not been found in humans. Identification of human polyomavirus 9 (HPyV9) led us to compare the seroprevalence and cross-reactivity of LPyV and HpyV9. Results could indicate that humans who have antibodies against LPyV are infected by HPyV9.

To date, 9 human polyomaviruses (HPyVs) have been identified: BK polyomavirus, JC polyomavirus, Karolinska Institute polyomavirus, Washington University polyomavirus, human polyomavirus 6 and 7, Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus, Merkel cell polyomavirus (MCPyV), and human polyomavirus 9 (HPyV9), which was identified in 2010 in human blood and skin samples (*1,2*). Serologic studies have shown that most adults have been exposed to HPyVs, and cross-reactivity studies have shown antigenic similarities between simian virus 40 and BK polyomavirus and, to a lesser extent, between simian virus 40 and JC polyomavirus (*3–5*). Interpretation of phylogenetic analysis of viral protein 1 (VP1) sequences predicts that cross-reactivity might also occur between Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus and Bornean orangutan PyV, between MCPyV and chimpanzee polyomaviruses, and between HPyV9 and simian lymphotropic polyomavirus (LPyV).

Serologic survey results have shown that 15.0%–30.0% of humans have antibodies against LPyV, suggesting that the human population has been exposed to an antigenically related PyV (*4–6*). However, because LPyV DNA sequences have not been reported among humans (*7,8*), LPyV has thus far been considered to be a virus with a narrow host range, limited to nonhuman primates. The 2010 identification of HPyV9 (*1*,*2*), a virus phylogenetically related to LPyV (84.0% of identity), led us to investigate the seroprevalence of this newly discovered polyomavirus and to evaluate the existence of cross-reactivity that might explain the LPyV seroprevalence in humans.

Author affiliations: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Tours, France (J.T.J. Nicol, A. Touzé, R. Robinot, F. Arnold, P. Coursaget); Université François Rabelais, Tours (J.T.J. Nicol, A. Touzé, R. Robinot, F. Arnold, P. Coursaget); and School of Medicine, University of Ferrara, Ferrara, Italy (E. Mazzoni, M. Tognon).

DOI: http://dx.doi.org/10.3201/eid1808.111625

The Study

We investigated the seroprevalence of HPyV9, MCPyV, and LPyV in children 1–14 years of age and adults18–85 years of age in the Ferrara region of Italy during December 2010–September 2011, and attempted to determine whether cross-reactivity between LPyV and HPyV9 might explain the latter's seroprevalence reported among humans. Serum samples from 139 children (63 boys, 76 girls) and 186 adults (82 men, 104 women) were analyzed for HPyV9, LPyV, and MCPyV antibodies. The serum samples from healthy adult blood donors aged 18–65 years were obtained from the University Hospital of Ferrara Blood Center, and samples from children and from adults 66–85 years of age were obtained from the Clinical Analysis Laboratory, University Hospital of Ferrara, by using a protocol approved by the local county ethics committee at University of Ferrara. Consent from participants was not requested for polyomavirus testing; the identity of the sources was removed from the samples, and they were analyzed anonymously. To detect antibodies against HPyV9, we set up a virus-like particle (VLP)–based ELISA similar to the assay we developed for MCPyV (*9*). We obtained the HPyV9 VP1 coding sequence by total synthesis with a codon usage adapted for expression in *Spodoptera frugiperda* cells (Genscript, Piscataway, NJ, USA) (GenBank accession no. HQ696595). We used the Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen, Fisher Scientific, Illkirch, France) to generate recombinant baculoviruses. HiFive cells maintained in Grace medium (Invitrogen) were infected with the different recombinant baculoviruses for the production of the different VLPs. VLPs were purified, and the presence of VLPs was determined by electron microscopy (*9*) (online Technical Appendix Figure 1, wwwnc.cdc.gov/EID/pdfs/11-1625-Techapp.pdf).

ELISAs were performed (*9*) in wells coated with 100 ng of VLPs. We determined concentration of HPyV9, LPyV, and MCPyV VLPs by using the Qubit Protein Assay Kit (Invitrogen). We used human serum samples diluted 1:100 and peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Clinisciences, Nanterre, France) diluted 1:20,000 to detect binding of human IgG. The cutoff values for all assays were set at 0.2, as determined previously for MCPyV and LPyV (*9*).

In all, 81 (24.9%) of the 325 investigated study participants were seropositive for HPyV9, 82 (25.2%) were

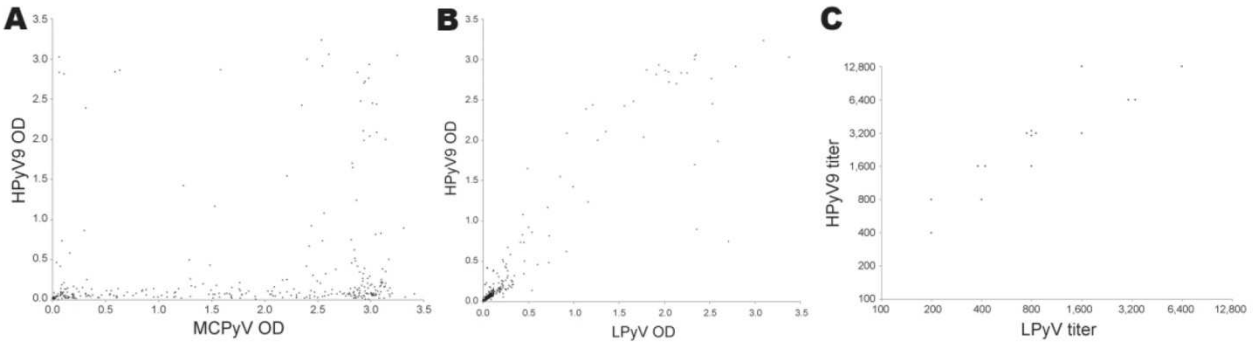


Figure 1. Cross-reactivity between human polyomavirus 9 (HPyV9), simian lymphotropic polyomavirus (LPyV), and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) virus–like particles (VLPs). Correlation between A) seroreactivity of 325 serum samples from children and adults in Italy against HPyV9 VLPs and B) MCPyV VLPs and HPyV9 VLPs was analyzed by ELISA. Each point represents 1 serum sample. Correlation coefficients (Spearman ρ) were determined by using XLStat software (Addinsoft, Paris, France). Correlation coefficient was 0.842 in panel B and 0.139 in panel A. C) Titers of 15 serum samples from adults against HPyV9 VLPs and LPyV VLPs. Each point represents 1 serum sample. OD, optical density.

positive for LPyV, and 252 (77.5%) were seropositive for MCPyV. Seventy-six HPyV9-positive participants were also LPyV positive, whereas the ELISA optical density was found to be close to the cutoff value for the remaining 11 discordant cases. We performed proportional analysis between groups, correlation analysis between HPyV9 and LPyV reactivity and between HPyV9 and MCPyV reactivity by using the χ^2 test and the nonparametric Spearman test, respectively, using XLStat software (Addinsoft, Paris, France). The antibody reactivity of the 325 samples analyzed showed no correlation between HPyV9 and MCPyV ELISA results ($\rho = 0.14$, $p = 0.0001$; Figure 1, panel A) but a strong correlation between HPyV9 and LPyV ELISA results ($\rho = 0.84$, $p = 0.001$; Figure 1, panel B). In addition, antibody titers against HPyV9 and LPyV were determined for a subset of 15 human samples. As shown in Figure 1, panel C, the antibody titer against HPyV9 was always higher than the titer against LPyV (mean geometric antibody titer 2,660 against HPyV9 and 877 against LPyV).

To assess the degree of antigenic cross-reactivity between HPyV9 and LPyV, we performed competition assays by preincubation (1 h at 37°C) of the 15 anti-HPyV9–positive serum samples (diluted 1:100) by using 2 μg of HPyV9, LPyV, and MCPyV VLPs. In HPyV9 ELISA, the reactivity declined dramatically to undetectable levels after preincubation by HPyV9 VLPs but not by LPyV and MCPyV VLPs (Table). Similarly, the serum reactivity in LPyV ELISA declined to undetectable levels (or to low levels in 3 cases) after preincubation with both HPyV9 and LPyV but not with MCPyV VLPs. Dose-ranging competition experiments were performed on serum samples from 2 persons (online Technical Appendix Figure 2), confirming the specificity of the inhibition. These results

Table. Cross-competition between HPyV9, LPyV, and MCPyV VP1 in serum samples reactive against HPyV9 and LPyV VP1 virus-like particles*

Serum	HPyV9 reactivity (OD) after preincubation with				LPyV reactivity (OD) after preincubation with			
sample no.	Control	HPyV9	LPyV	MCPyV	Control	HPyV9	LPyV	MCPyV
H1	0.988	0.054	0.737	0.943	0.848	0.049	0.036	0.841
H2	1.083	0.128	0.737	1.018	1.007	0.128	0.104	0.995
H3	1.154	0.100	0.921	1.128	1.080	0.073	0.061	1.159
H4	2.147	0.164	1.308	1.869	1.680	0.126	0.100	1.629
H5	2.256	0.195	2.023	2.152	2.525	0.349	0.153	2.671
H6	1.610	0.127	0.846	1.544	2.068	0.099	0.095	2.179
H7	1.223	0.088	0.577	1.456	1.816	0.069	0.062	1.828
H8	1.136	0.017	0.629	0.935	0.599	0.015	0.162	0.545
H9	0.732	0.055	0.437	0.648	0.441	0.119	0.075	0.448
H10	1.216	0.036	0.683	1.057	0.771	0.045	0.032	0.659
H11	1.489	0.070	1.114	1.303	0.801	0.203	0.070	0.522
H12	1.406	0.016	0.776	1.265	0.885	0.041	0.032	0.858
H13	1.682	0.042	0.944	1.199	0.853	0.168	0.065	0.547
H14	2.424	0.061	1.566	2.145	1.536	0.064	0.058	1.516
H15	2.843	0.067	2.109	2.611	2.339	0.075	0.318	2.205

*HPyV9, human polyomavirus 9; LPyV, simian lymphotropic polyomavirus; MCPyV, Merkel cell polyomavirus; VP1, viral protein 1; OD, optical density. Fifteen serum samples from blood donors reactive against HPyV9 and LPyV VP1 virus-like particles were preincubated with HPyV9, LPyV, or MCPyV VLPs.

indicate that the HPyV9 reactivity detected in human serum samples was caused by HPyV9 infection and not by infection with the closely related LPyV. The findings also indicate that detection of LPyV antibodies in human serum samples should be attributed to cross-reacting HPyV9 antibodies.

HPyV9 infection was confirmed in 27.5% of adults18–50 years of age and in 42.4% of adults 51–85 years of age (Figure 2). MCPyV infection was confirmed in 82.5% and 83.3%, respectively, of the same population groups. Among children 1–7 years of age, few HPyV9-positive subjects (10.1%) were detected compared with MCPyV-positive subjects (49.3%). HPyV9 and MCPyV antibodies were detected in 18.6% and 74.3% of children 7–14 years of age, respectively. No difference in HPyV9 seroprevalence was observed among children according to sex (14.3% vs. 14.5%, p = 0.98). Among adults, HPyV9 seroprevalence was higher among men than women (47.6% vs. 21.1%, p = 0.007). No difference in MCPyV antibodies according to sex was observed among children (69.8% vs. 55.3%, p = 0.39) or adults (86.6% vs. 91.3%, p = 0.80).

Conclusions

The HPyV9 antibodies detected in humans did not cross-react with MCPyV VLPs but cross-reacted strongly with LPyV VLPs in agreement with the recently published findings by Trusch et al., who used VP1 capsomers (*10*). Moreover, inhibition analysis suggested that LPyV does not infect humans or is limited in scope and does not circulate widely among humans.

Our finding that 61 (32.8%) of 186 adults were seropositive for HPyV9 supports the view that this virus is commonly circulating and infects humans throughout life.

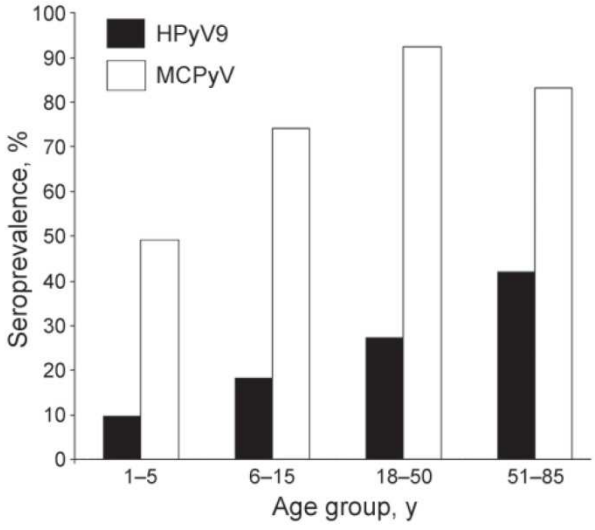


Figure 2. Human polyomavirus 9 (HPyV9) and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) seroprevalence in children and adults in Italy.

However, the HPyV9 seroprevalence was low compared with that observed for other human polyomaviruses (*3,5,11–14*), with the exception of that for human polyomavirus 7 (*13*).

Primary exposure for other HPyVs often occurs in early childhood, as found for MCPyV in this study and others (*5,12*). The detection of antibodies in 10.1% of children1–7 years of age and the increasing seroprevalence related to increasing age among adults suggests that infection by HPyV9 occurs at all ages. It is not surprising that HPyV9 seroprevalence is lower than the seroprevalence observed for other polyomaviruses because HPyV9 DNA has been detected in only a few persons (*1,2*), compared with the high frequency reported for other skin polyomaviruses (*13,15*). In conclusion, HPyV9 circulates widely in humans but not as commonly as other polyomaviruses. Further studies are needed to identify the clinical role of this polyomavirus.

Acknowledgments

We thank Pierre-Yves Sizaret and Julien Gaillard for help with electron microscopy of the VLPs.

J.N. was supported by a doctoral grant from the Région Centre, France, and E.M. is a postdoctorate Fellow at the University of Ferrara. This study was also funded by grants to P.C. from the "Ligue Contre le Cancer" (Comité du Cher and Comité de l'Indre, 2010) and to M.T. from the University of Ferrara.

Mr Nicol is enrolled in the PhD program in infectious diseases at the University François Rabelais, Tours, France. His research is focused on new skin polyomaviruses.

References

1. Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, et al. A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey–derived lymphotropic polyomavirus. J Virol. 2011;85:4586–90. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02602-10
2. Sauvage V, Foulongne V, Cheval J, Ar Gouilh M, Pariente K, Dereure O, et al. Human polyomavirus related to African green monkey lymphotropic polyomavirus. Emerg Infect Dis. 2011;17:1364–70.
3. Carter JJ, Madeleine MM, Wipf GC, Garcea RL, Pipkin PA, Minor PD, et al. Lack of serologic evidence for prevalent simian virus 40 infection in humans. J Natl Cancer Inst. 2003;95:1522–30. http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djg074
4. Viscidi RP, Clayman B. Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. Adv Exp Med Biol. 2006;577:73–84. http://dx.doi.org/10.1007/0-387-32957-9_5
5. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. PLoS Pathog. 2009;5:e1000363. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000363
6. Takemoto KK, Furuno A, Kato K, Yoshiike K. Biological and biochemical studies of African green monkey lymphotropic papovavirus. J Virol. 1982;42:502–9.
7. Focosi D, Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Ceccherini-Nelli L, Petrini M. Polyomaviruses other than JCV are not detected in progressive multifocal leukoencephalopathy. J Clin Virol. 2009;45:161–2. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.04.009

8. Costa C, Bergallo M, Terlizzi ME, Cavallo GP, Cavalla P, Cavallo R. Lack of detection of lymphotropic polyomavirus DNA in different clinical specimens. J Clin Virol. 2011;51:148–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2011.02.015
9. Touzé A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury MJ, Combelas N, et al. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCPyV)–like particles and their application to detection of MCPyV antibodies. J Clin Microbiol. 2010;48:1767–70. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01691-09
10. Trusch F, Klein M, Finsterbusch T, Kühn J, Hofmann J, Ehlers B. Seroprevalence of human 23 polyomavirus 9 and cross-reactivity to African green monkey–derived lymphotropic 24 polyomavirus. J Gen Virol. 2012;93:698–705. http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.039156-0
11. Nguyen NL, Le BM, Wang D. Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses. Emerg Infect Dis. 2009;15:1199–205. http://dx.doi.org/10.3201/eid1508.090270
12. Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H, Becker JC, Jenkins FJ, Moschos S, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. Int J Cancer. 2009;125:1250–6. http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24509
13. Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. Cell Host Microbe. 2010;7:509–15. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.006
14. van der Meijden E, Kazem S, Burgers MM, Janssens R, Bouwes Bavinck JN, de Melker H, et al. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa–associated polyomavirus. Emerg Infect Dis. 2011;17:1355–63.
15. Foulongne V, Kluger N, Dereure O, Mercier G, Molès JP, Guillot B, et al. Merkel cell polyomavirus in cutaneous swabs. Emerg Infect Dis. 2010;16:685–7.

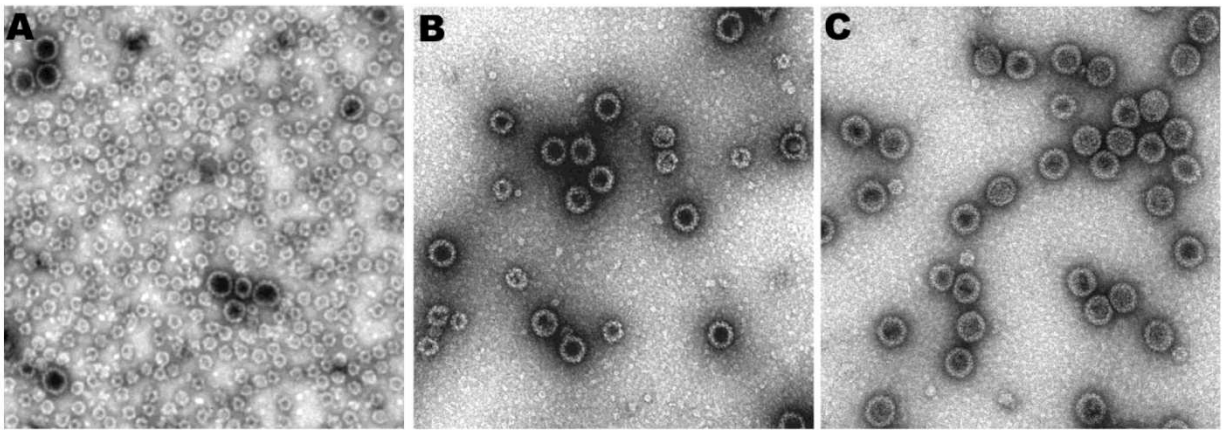
Address for correspondence: Pierre Coursaget, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 31 Ave Monge, 37200 Tours, France; email: coursaget@univ-tours.fr

All material published in Emerging Infectious Diseases is in the public domain and may be used and reprinted without special permission; proper citation, however, is required.

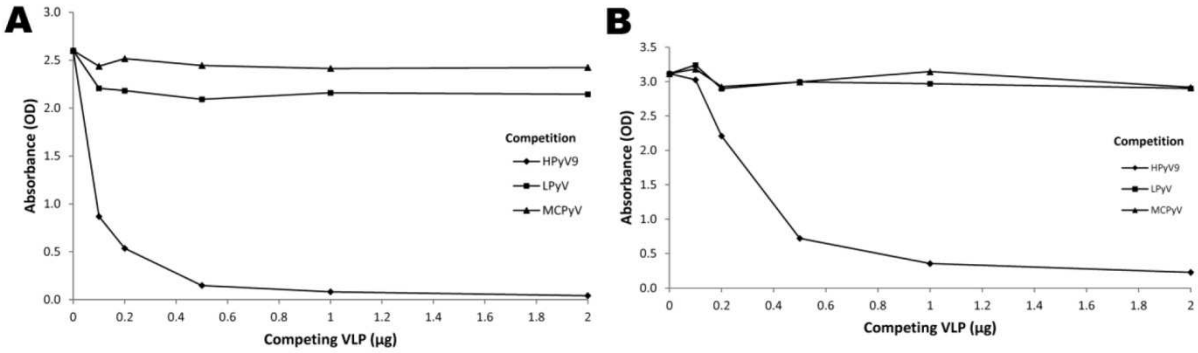
Article DOI: http://dx.doi.org/10.3201/eid1808.111625

Seroprevalence and Cross-reactivity of Human Polyomavirus 9

Technical Appendix



Technical Appendix Figure 1. Electron micrographs of viral structures obtained by expression of viral protein 1 (VP1) genes from human polyomavirus 9 (HPyV9), Merkel cell polyomavirus (MCPyV), and simian lymphotropic polyomavirus (LPyV) in insect cells using recombinant baculoviruses. The preparations were applied to carbon-coated grids, negatively stained with 1.5% uranyl acetate, and observed at 50,000 nominal magnification with a JEOL 1011 electron microscope (JEOL (Europe) SAS, Crossy-sur-Seine, France). Scale bars = 100 nm. In all preparations, 45-nm particles were observed, but 24-nm particles that might correspond to T = 1 structures were present at high concentrations in the HPyV9 preparations.



Technical Appendix Figure 2. Seroreactivity of 2 human serum samples (A, B) to human polyomavirus 9 (HPyV9) virus–like particles after preincubation with increasing amounts of HPyV9-, LPyV-, and MCPyV-virus–like particles.

II.2. Article 5 : Serological cross-reactivity between Merkel Cell polyomavirus and two closely related chimpanzee polyomaviruses

III. Partenaires cellulaires des protéines mineures de capside VP2 et VP3

Parallèlement aux études séro-épidémiologiques décrites dans les parties précédentes, nous avons initié, en 2012, un projet visant à identifier les partenaires cellulaires de l'ensemble des protéines du MCPyV. Ces travaux d'interactomique ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Docteur Yves Jacob (Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN, Institut Pasteur, Paris). La stratégie retenue, consiste dans un premier temps, à déterminer les partenaires cellulaires interagissant avec les protéines du MCPyV par une approche de double hybride en levure. Ces protéines cellulaires candidates sont ensuite confirmées par une méthode orthogonale, l'HT-GPCA (Gaussia Princeps Complementation Assay) en cellules de mammifère, plus proche de la réalité biologique.

C'est travaux visent à améliorer la compréhension sur le cycle viral ainsi que l'oncogenèse viro-induite. Nous avons décidé de faire l'apprentissage des techniques d'interactomique sur les protéines mineures de capside VP2/VP3, puis dans un second temps, de mener ces études sur les autres protéines du MCPyV une fois les technologies acquises et transférées au laboratoire. Pour une première étude d'interactomique, l'utilisation de la protéine majeure de capside VP1 a été écartée. En effet, les techniques d'interactomique reposent sur l'utilisation de protéines de fusion. Concernant les protéines majeures de capside, l'addition de peptides peut causer un encombrement stérique et empêcher leur auto-assemblage en VLP. L'utilisation d'une VP1 non structurée ne serrait donc pas le reflet de la réalité biologique.

III.1. Identification des partenaires cellulaires par double hybride en levures

Nous avons choisi une approche de double hybride en levure pour identifier les partenaires cellulaires du MCPyV. Cette technologie a déjà été utilisée, entre autre, pour identifier les partenaires cellulaires des oncogènes des papillomavirus (Lazarczyk *et al.*, 2009). Le double hybride en levure repose sur la reconstitution du facteur de transcription Gal4 qui est composé de deux domaines distincts et séparables, le domaine de fixation à l'ADN (DBD) et le domaine d'activation de la transcription (AD) (Figure 24).

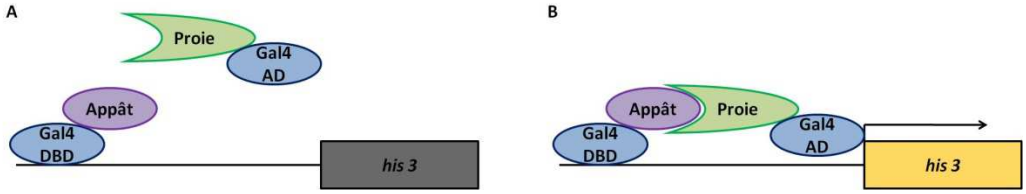


Figure 24 : Principe du double hybride en levure. Les protéines cellulaires (proies) sont fusionnées au domaine d'activation (AD) du facteur de transcription Gal4. Les protéines virales (appâts) sont quant à elles fusionnées à la deuxième partie de Gal4, le domaine de fixation à l'ADN (DBD). Dans le cas A, il n'y a pas d'interaction entre l'appât et la proie. Par conséquent, le gène rapporteur *his3* n'est pas exprimé. Dans le cas B, l'interaction appât-proie rapproche physiquement les deux domaines de Gal4. La fonction du facteur de transcription est restaurée et les levures sont capables de cultiver sur milieu dépourvu en histidine.

La protéine virale étudiée (appât) est fusionnée au domaine DBD de Gal4, puis les constructions sont introduites dans des levures. La banque de proies cellulaires utilisée est constituée de 12000 ORFs humaines fusionnées au domaine AD de Gal4 (banque ORFeome). Les levures contenant les appâts sont croisées avec la banque de levures contenant les 12000 proies. Lorsqu'un appât et une proie interagissent, les domaines DBD et AD vont se rapprocher et donc reformer un facteur de transcription Gal4 actif. La fonction biologique de Gal4 est alors restaurée et pourra induire la transcription du gène *his3* nécessaire à la croissance des levures en absence d'histidine. Le gène rapporteur *his3* code l'imidazole glycerol phosphate dehydratase (IGPD), une enzyme de la voie de biosynthèse de l'histidine (Figure 24).

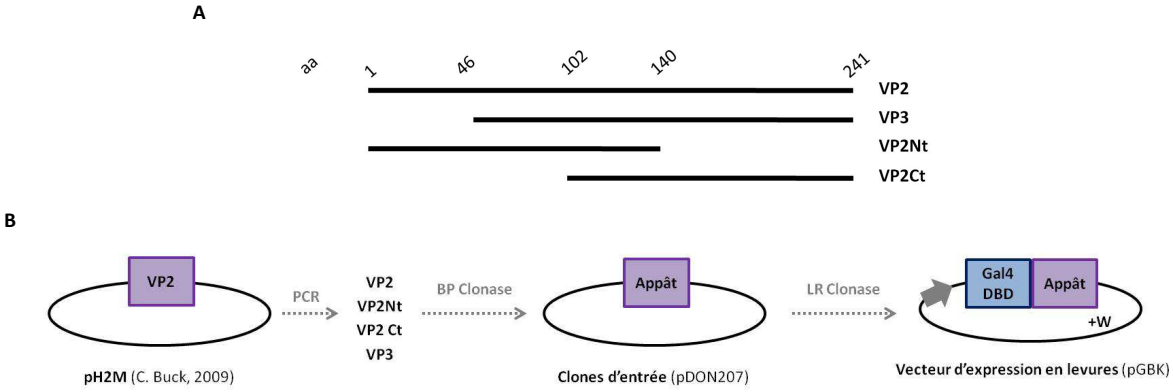


Figure 25 : Constructions des fusions Gal4DBD/appâts viraux VP2/VP3. (A) Les protéines entières VP2 et VP3 correspondent aux protéines virales natives. La VP3 est une VP2 tronquée de ses 45 aa N-terminaux. La construction VP2Nt correspond à la partie N-terminale de la VP2 et la construction VP2Ct correspond à la partie C-terminale de la VP2. La matrice utilisée pour réaliser ces constructions est le plasmide pH2M. **(B)** Les quatre fragments ont générés par PCR puis cloné dans le plasmide pDONR207 par BP clonase. Les inserts contenus dans les plasmides d'entrée ont ensuite été clonés en phase avec de le domaine DBD de Gal4 au cours d'une réaction LR clonase avec le plasmide de destination pGBK.

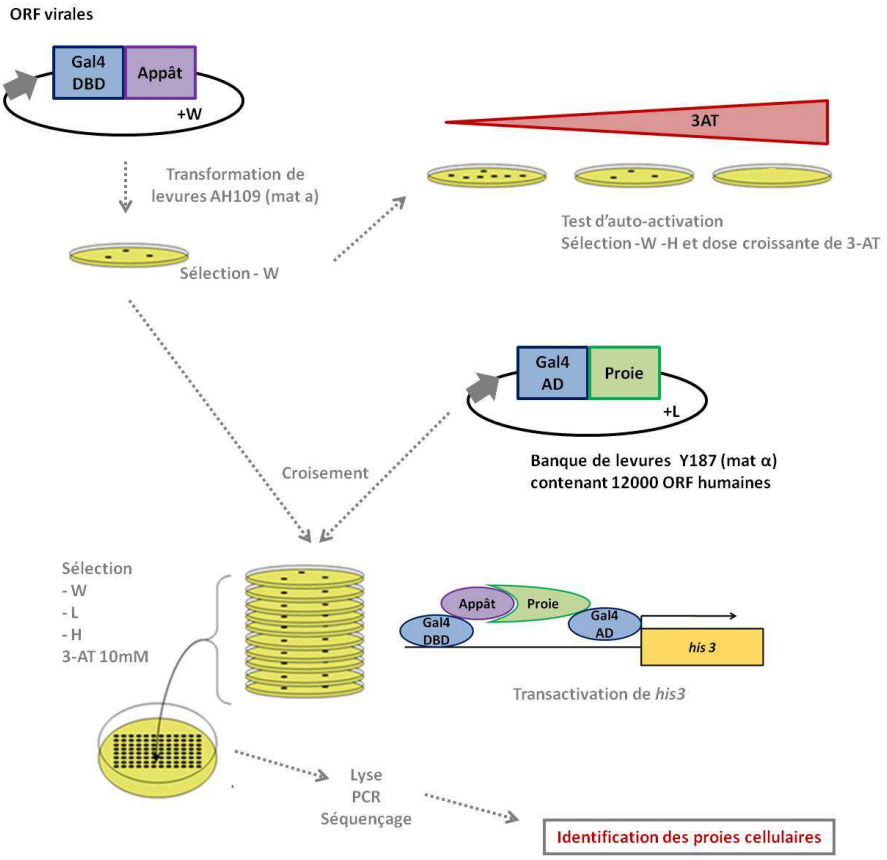


Figure 26 : Double hybride en levure. Les différents plasmides pGBK contenant les appâts viraux fusionnés au domaine DBD de Gal4 sont introduits dans des levures AH109 (-H, -W, -L, mat a). Les levures transformées cultivent sur milieu dépourvu en tryptophane (-W). La concentration en 3 amino-triazole (3-AT) nécessaire pour inhiber l'auto-activation du gène his3 est déterminée sur milieu dépourvu en tryptophane et leucine (-W -L) et contenant des doses croissantes de 3-AT. La banque ORFeome est contenue dans des levures Y187 (-H, -W, -L, mat α). Après croisement entre les levures AH109 et Y187, les levures diploïdes sont sélectionnées, repiquées, lysées puis une PCR est réalisée pour amplifier les proies cellulaires interagissant avec les appâts viraux. Les proies cellulaires sont enfin identifiées par séquençage.

Pour l'étude des partenaires cellulaires des protéines mineures de capside du MCPyV, quatre constructions ont été réalisées (A). Les constructions VP2 et VP3 correspondent aux protéines virales entières. Afin que tout les domaines soit représentés et de ne pas manquer certaines interactions la VP2 a été fractionnée en deux constructions supplémentaires, VP2Nt et VP2Ct (Figure 25). Les différents fragments ont dans un premier temps été amplifiés par PCR, et fusionnés au domaine AD de Gal4 en utilisant le système de clonage Gateway (Figure 25).

Les quatre constructions ont été utilisées pour transformer des levures AH109 et les levures contenant les plasmides ont été sélectionnées sur milieu dépourvu en tryptophane (Figure 26). Certaines constructions appât-GalDBD ont la capacité d'auto-activer le gène *his3*. La mise en évidence des interactions appât-proie étant basée sur la restauration de l'expression de ce gène, il est nécessaire de vérifier l'activation de *his3*. Cette auto-activation est contrôlée sur milieu dépourvu en tryptophane et histidine et elle inhibée par le 3-amino-triazole (3-AT), un inhibiteur de l'IGPD. La concentration en 3-AT à utiliser pour le double hybride en levure a été fixée à 10mM.

Les tests d'interaction en levures ont été réalisés pour les quatre constructions au sein de l'Institut Pasteur. Après croisement entre les levures contenant les appâts viraux et les levures contenant la banque de proies cellulaires, les cellules diploïdes pour lesquelles la fonction de Gal4 est restaurée ont été sélectionnées sur milieu sélectif (-W -L -H 3-AT 10mM). Après PCR (plus) sur les levures lysées, les proies cellulaires ont été identifiées par séquençage. Au total, 547 séquences exploitables ont été obtenues pour l'ensemble des quatre constructions. L'analyse des séquences a permis d'identifier 87 interactants. Parmi tous ces candidats, 27 sont considérés comme des interactants majoritaires, c'est-à-dire, les candidats retrouvés avec la plus forte occurrence (au moins 3 fois). ~~Trois partenaires cellulaires, CRX, OTX1 et OTX2 ont été exclus de la suite de l'étude car ce sont des protéines qui sont systématiquement retrouvées en double hybride, quelque soit l'appât étudié.~~

Tableau V : Occurrence des interactants majoritaires des protéines mineures VP2/VP3 identifiées par double hybride en levure

Proie cellulaire	Occurrence				
	VP2Nt	VP2Ct	VP2	VP3	Total
GORASP2	-	43	13	38	94
~~# CRX~~	~~12~~	~~16~~	~~15~~	~~24~~	~~67~~
ZNF74	60	-	1	-	61
ZSCAN25	53	-	1	-	54
~~# OTX2~~	~~7~~	~~8~~	~~9~~	~~4~~	~~28~~
~~# OTX1~~	~~7~~	~~1~~	~~10~~	~~5~~	~~23~~
RUSC1	17	-	2	-	19
WASH3P	14	-	-	-	14
ZNF277	-	14	-	-	14
PRDX3	7	1	5	-	13
EIF4E2	12	-	-	-	12
VEGFB	2	2	4	-	8
ZNHIT1	8	-	-	-	8
COPS5	7	-	-	-	7
MTFR2	7	-	-	-	7
ALX3	-	3	2	1	6
BEND7	6	-	-	-	6
PPEF1	-	-	3	3	6
BCL2L11	4	-	1	-	5
FH	4	-	1	-	5
C10orf111	4	-	-	-	4
YPEL3	4	-	-	-	4
ARID5A	2	-	1	-	3
CDCA4	2	-	1	-	3
PNKP	3	-	-	-	3
PRKAA1	3	-	-	-	3
ZNF232	3	-	-	-	3

\- : la proie cellulaire n'a pas été identifiée pour l'appât viral en question

~~# : cible cellulaire assimilée à du bruit de fond du double hybride~~

III.2. Vérification des partenaires cellulaires par HT-GPCA

Les partenaires cellulaires des protéines virales identifiés en double hybride en levure ont été vérifiés par une méthode orthogonale en cellules de mammifères basée sur le système de *Gaussia protein complementation assay* (GPCA) (Cassonnet *et al.*, 2011). L'utilisation de ce système permet de surmonter les limites et d'éliminer les artefacts inhérents à la méthode du double hybride en levure. De plus, le GPCA est réalisé en cellules de mammifère de façon à avoir un environnement plus proche des conditions physiologiques. En effet, dans ce système les modifications post-traductionnelles et la localisation cellulaire des protéines ne sont pas affectées.

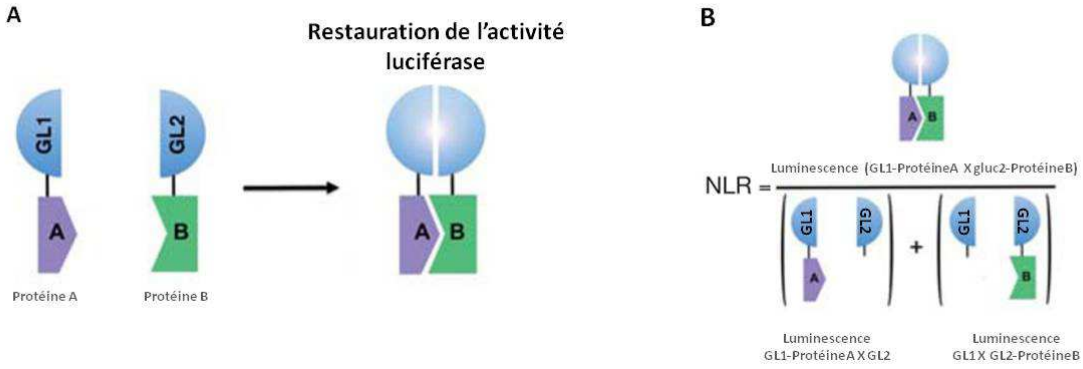


Figure 27 : Principe de l'HT-GPCA. (A) Les protéines A et B sont chacunes fusionnées à une des deux parties de la luciférase Gaussia princeps (GL). Lorsque les protéines A et B interagissent, l'activité luciférase est restaurée et peut être mesurée. **(B)** L'intensité de l'interaction entre les protéines A et B est évalué par le rapport entre la luminescence obtenue pour le couple et la somme de la luminescence obtenue pour chacun des partenaires testé avec l'autre fragment GL non fusionné (D'après (Cassonnet *et al.*, 2011)).

Les quatre appâts viraux ont été fusionnés au fragment 2 de la luciférase gaussia (Gluc2-Appât) en utilisant le système de clonage Gateway. Les 24 partenaires cellulaires identifiés en double hybride ont quant à eux été fusionnés au fragment 1 de la luciférase (Gluc1-Proie). Finalement, les plasmides codant les proies et les appâts fusionnés aux deux fragments de la Gluc ont été cotransfectés en cellules 293T et l'activité gaussia luciferase restaurée a été mesurée au luminomètre. Les tests de complémentations ont été réalisés en triplicats et les NLR obtenus pour chacune des interactions sont présentés (Figure 28).

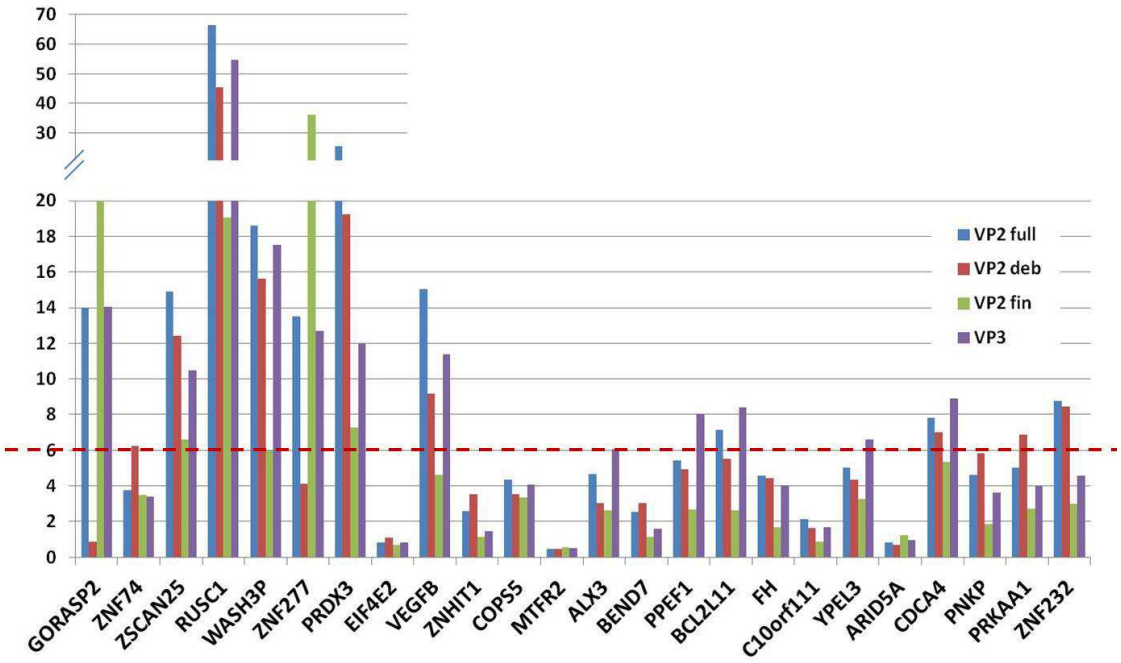


Figure 28 : Interactions entre les proies cellulaires et les appâts viraux en HT-GPCA. La restauration de la luminescence a été mesurée pour chacun des couples proie cellulaire / appât viral ainsi que pour les contrôles. Les NLR ont été calculés selon la formule suivante : NLR=(Luminescence (Gluc1Proie X Gluc2Appât))/(Luminescence ((Gluc1Proie X Gluc2) +(Gluc1 X Gluc2Appât))).

Parmi les 24 proies cellulaires retenues après le double hybride en levure 8 protéines n'interagissent pas avec les appâts viraux dans le système HT-GPCA. En effet, pour EIF4E2, ZNHIT1, COPS5, MTFR2, BEND7, FH, C10ORF111 et ARID5a les NLR sont inférieurs à 4. Pour les protéines GORASP2, ZSCAN25, RUSC1, WASH3P, ZNF277, PRDX3 VEGFB, PPEF1, BCL2L11, YPEL3, CDCA4 et ZNF232 au moins une des quatre constructions virale interagit avec la proie cellulaire. Cinq candidats présentent des NLR proches du NLR seuil. Une interaction entre les protéines mineures de capside et YPEL3, ALX3 PNKP PRKAA1 et ZNF74 n'est donc pas à exclure.

CONCLUSIONS

Tableau VI : Séroépidémiologie des polyomavirus

Virus	Séroprévalence	Individus	Méthode	Référence
MCPyV	64% (adulte > 18 ans)	Donneurs de sang, USA	ELISA VLP	(Tolstov *et al.*, 2009)
	24 % (1-5 ans) 42% (adulte >21ans)	Enfants hospitalisés, USA Donneurs de sang, USA	ELISA GST-VP1r	(Kean *et al.*, 2009)
	59% (adulte > 24ans)	Volontaires, USA	Luminex GST-VP1	(Carter *et al.*, 2009)
	45% (1-10 ans) 74% (adulte >20 ans)	Sujets hospitalisés	ELISA VLP	(Viscidi *et al.*, 2011)
	42% (1-4 ans) 87% (adulte>20 ans)	Enfants hospitalisés, Italie Donneurs de sang, Italie	ELISA VLP	(Nicol *et al.*, 2013)
	58% (1-4 ans) 94% (adulte >20 ans)	Enfants, Cameroun Cameroun	ELISA VLP	(Martel-Jantin *et al.*, 2013)
HPyV6	69% (adultes 47-75 ans)	Donneurs de sang, USA	ELISA VLP	(Schowalter *et al.*, 2010)
	38% (1-4 ans) 83% (adulte >20 ans)	Enfants hospitalisés, Italie Donneurs de sang, Italie	ELISA VLP	(Nicol *et al.*, 2013)
HPyV7	35% (adultes 47-75 ans)	Donneurs de sang, USA	ELISA VLP	(Schowalter *et al.*, 2010)
	10% (1-4 ans) 64% (adulte >20 ans)	Enfants hospitalisés, Italie Donneurs de sang, Italie	ELISA VLP	(Nicol *et al.*, 2013)
TSPyV	23% (1-4ans) 80% (adulte >20 ans)	Volontaires, Pays bas	Luminex GST-VP1	(van der Meijden *et al.*, 2011)
	5% (1-4 ans) 70% (adulte > 20 ans)	Volontaires, Finlande	ELISA VLP	(Chen *et al.*, 2011)
	31% (1-4 ans) 76% (adulte >20 ans)	Enfants hospitalisés, Italie Donneurs de sang, Italie	ELISA VLP	(Nicol *et al.*, 2013)
HPyV9	13% (2-5 ans) 47% (adulte>20 ans)	Enfants hospitalisés, Allemagne Donneurs de sang, Allemagne	ELISA GST-VP1	(Trusch *et al.*, 2012)
	10% (1-4 ans) 39% (adulte >20 ans)	Enfants hospitalisés, Italie Donneurs de sang, Italie	ELISA VLP	(Nicol *et al.*, 2013)
MWPyV	27% (1-2 ans) 42% (adulte >20 ans)	Enfants hospitalisés, Italie Donneurs de sang, Italie	ELISA VLP	(Nicol *et al.*, 2014)
HPyV12	12% (2-5 ans) 15-33% (adulte >20 ans)	Enfants hospitalisés, Allemagne Donneurs de sang, Allemagne	ELISA GST-VP1	(Korup *et al.*, 2013)

Les infections à polyomavirus sont fréquentes chez l'Homme. Le BKPyV, le JCPyV le MCPyV et le TSPyV sont les seuls polyomavirus humains clairement associés à des pathologies chez leur hôte. Depuis la mise en évidence de l'implication du MCPyV dans le CCM, la recherche de nouveaux polyomavirus a conduit à l'identification de douze polyomavirus chez l'Homme. Au cours de ma thèse, nous avons entrepris de déterminer la séroépidémiologie du MCPyV, de l'HPyV6, de l'HPyV7, du TSPyV, de l'HPyV9 ainsi que du MWPyV.

Les VLP nécessaires à ces études ont été produites pour ces six polyomavirus et utilisées pour déterminer l'épidémiologie de ces nouveaux virus dans une population italienne ainsi que l'épidémiologie du MCPyV au Cameroun.

Pour ces six virus, les séroconversions débutent dès le plus jeune âge avec des séroprévalences supérieures à 10% entre 1 et 4 ans. Chez l'adulte de plus de 20 ans, les séroprévalences sont de 87% pour le MCPyV, 83% pour l'HPyV6, 64% pour l'HPyV7, 76% pour le TSPyV, 39% pour l'HPyV9 et 42% pour le MWPyV. A l'âge adulte, les séroprévalences sont relativement stables à l'exception des HPyV7 et 9 pour lesquels les infections semblent se produire tout au long de la vie. Concernant le MCPyV, l'étude menée en collaboration avec le Dr Antoine Gessain sur une population camerounaise, nous a permis de confirmer la précocité de la séroconversion dans l'enfance et que la séroprévalence est élevée à l'âge adulte (94%). Cette étude nous a aussi permis d'étudier la transmission intrafamiliale du MCPyV. Les résultats indiquent que le MCPyV se transmet entre frères et sœurs quand les enfants sont d'âge proche. Cette étude montre aussi une tendance à la transmission mère/enfant (non significatif).

Les résultats que nous avons obtenus sont comparables à ceux qui ont été publiés depuis 2009 (Tableau VI). Cependant, des différences sont à noter entre les différents articles. Ces différences sont en partie imputables à la diversité des techniques utilisées entre les études. Les études pour lesquelles les séroprévalences sont les plus importantes font souvent usage de VLP produites en système eucaryote et non de capsomères comme dans l'étude menée par Kean *et al*. Il a aussi était montré que les tests développés sont plus sensible avec des VLP plutôt que des capsomères. Pour le MCPyV, nos résultats sont comparables à d'autres études pour lesqu'elles des séroprévalence de plus 64% chez l'adultes sont reportées.

Nous avons aussi évalué l'évolution des fortes réactivités tout au long de la vie. Pour les HPyV6, 7 et 9 aucune variation significative n'a été observée. Pour le TSPyV et le

MWPyV, les titres en anticorps diminuent au cours de la vie alors qu'ils augmentent pour le MCPyV. Ces résultats suggèrent que le MCPyV reste latent chez les individus infectés et qu'il est réactivé après 60 ans conduisant à une augmentation des titres en anticorps. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les titres en anticorps anti-MCPyV sont corrélés à la charge virale cutanée. Au contraire, pour les TSPyV et MWPyV, la diminution des titres en anticorps avec l'âge suggère que soit les primo-infections sont résolutives ou alors que le virus reste latent sans être réactivé. Tout comme pour les autres polyomavirus, les infections par les nouveaux polyomavirus sont fréquentes dans la population générale et surviennent dès l'enfance. Même si de manière générale les infections sont fréquentes, des différences sont à noter entre les polyomavirus. Il est probable que ces différences de séroprévalence soient liées à des niveaux de circulation différents dans la population générale ainsi qu'à des modes de transmission différents.

Les travaux visant à déterminer la séroépidémiologie et la transmission intrafamiliale des polyomavirus seront poursuivis et étendues aux polyomavirus STLPyV et HPyV12 dont les VLP sont en cours de production.

A l'heure actuelle, ces nouveaux polyomavirus ne sont pas tous associés à une pathologie chez l'Homme. Des études complémentaires sont nécessaires afin de mettre en évidence une possible association virus/maladie. A l'image de ce qui est observé pour le BKPyV, le JCPyV, le MCPyV et le TSPyV, il serrait intéressant de rechercher leur association éventuelle avec des maladies ou des cancers chez des sujets immunodéprimés.

Il a été montré qu'il existe des réactivités croisées entre certains polyomavirus humains et simiens phylogénétiquement très proches. Comme certains humains sont séropositifs pour le LPyV, nous avons étudiés les réactivités croisées entre ce virus et le virus humain le plus proche, l'HPyV9. Nous nous sommes aussi intéressés aux cross-réactivités entre deux autres groupes de polyomavirus. En effet, les polyomavirus de chimpanzés PtvPyV1 et PtvPyV2 sont phylogénétiquement très proches du MCPyV et l'OraPyV est proche du TSPyV.

Dans la population étudiée, nous avons confirmés que l'Homme dispose d'anticorps dirigés contre le LPyV. En effet, 25% des sérums testés sont positifs pour le LPyV. Par ailleurs les individus séropositifs pour le virus simien sont aussi séropositifs pour l'HPyV9 et la corrélation entre les deux réactivités est très élevée. Nous avons démontré par des tests de préincubation que la réactivité dirigée contre le LPyV est due à des anticorps cross-réactifs

anti-HPyV9. Ces résultats ont été confirmés par Trusch *et al.* dont la publication est parue de manière concomitante avec la notre. Ces travaux montrent aussi chez l'hôte naturel du LPyV, le macaque, que la situation est inversée par rapport à ce qui est observé chez l'homme. Ces animaux sont séropositifs pour les deux virus mais chez eux, la réactivité anti-HPyV9 est due aux infections par le LPyV (Trusch *et al.*, 2012).

A l'image de nos résultats pour le couple HPyV9/LPyV nous avons observé, chez l'Homme, de fortes corrélations entre les réactivités anti-MCPyV et anti-PtvPyV et que les PtvPyV1 et PtvPyV2 semblent appartenir au même sérotype. Chez, l'Homme, la réactivité anti-PtvPyV est due aux anticorps dirigés contre le MCPyV qui cross-réagissent avec les deux PtvPyV. Pour les chimpanzés, dont les prélèvements proviennent du parc zoologique de Beauval, la situation est moins évidente. Certains animaux semblent infectés seulement par les virus PtvPyV mais d'autres semblent être infectés à la fois par les PtvPyV mais aussi par le MCPyV. Il est possible que ces animaux captifs en contact étroit avec l'Homme soient infectés par le MCPyV. Chez ses animaux il serrait intéressant de rechercher la preuve moléculaire de la présence du génome du MCPyV. Par ailleurs, pour vérifier la possible transmission du MCPyV de l'Homme au chimpanzé, il serrait intéressant de vérifier le statut sérologique d'animaux sauvages.

Concernant l'OraPyV et le TSPyV, aucune réactivité croisée n'a été mise en évidence entre les deux virus. Cependant, 4% des humains sont séropositifs pour l'OraPyV. La séroprévalence ainsi que la réactivité contre l'OraPyV étant très faibles l'hypothèse selon laquelle l'OraPyV circule chez l'Homme est peu probable. Il semble plus probable qu'un virus encore inconnu circule chez l'Homme, ce virus étant plus proche de l'OraPyV que du TSPyV et que ce virus induise des anticorps cross-réactifs anti-OraPyV.

Parallèlement aux travaux portant sur l'épidémiologie des polyomavirus, nous avons entrepris de caractériser les partenaires cellulaires des protéines précoces et tardives du polyomavirus à cellules de Merkel afin de comprendre leurs rôles au cours du cycle viral et de l'oncogenèse associée à ce virus. Pour une première étude, nous nous sommes focalisés sur les partenaires cellulaires des protéines mineures de capside du MCPyV en collaboration avec l'équipe du docteur Yves Jacob.

Dans un premier temps, 87 proies cellulaires ont été identifiées par une approche de double hybride en levure. Dans un second temps, les interactions entre les appâts viraux et les proies cellulaires ont été vérifiées pour les protéines retrouvées au moins trois fois lors des croisements en levures. Parmi les 24 proies cellulaires étudiées dans le système HT-GPCA, 19 ont été vérifiées. Pour EIF4E2, MTFR2, BEND7, C10ORF11 et ARID5a les interactions appât/proie n'ont pas été confirmées.

Les protéines vérifiées par HT-GPCA sont impliquées dans des fonctions biologiques variées comme la prolifération cellulaire, la régulation de la transcription, l'angiogenèse, la dégradation des protéines, l'apoptose et le trafic cellulaire (Tableau). Certaines de ces protéines peuvent être associées au trafic intracellulaire du virus lors de son entrée. Au cours du cycle du viral, il est possible possible que les protéines mineures de capside participent à la modulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose même si ces rôles sont classiquement attribués aux oncoprotéines des polyomavirus. Enfin, il est possible que les VP2/3 participe à la modulation de la réponse immune de l'hôte et à l'échappement au système immunitaire.

Les protéines mineures de capside du MCPyV interagissent avec des protéines qui sont probablement impliquées dans le trafic intracellulaire du virus. Les virus nus entrent dans les cellules par des vésicules d'endocytose qui nécessite un remaniement du cytosquelette cellulaire. Nous avons observé que les protéines mineures de capside du MCPyV interagissent avec WASH1 qui fait partie de la famille des protéines WASH (WASP and SCAR homologue) dont il existe plusieurs isoformes. Ces protéines WASH font partie de certains complexes NPF de type I (Nucleation-Promoting Factor). Ces complexes NPF étant eux même impliqués dans l'activation des complexes ARP2/3 (Actin-Related Proteins) responsables de la nucléation des filaments d'actine. Au sein de ces complexes, les protéines WASH sont impliquées dans la formation et le transport des vésicules d'endocytose ainsi que du transport des endosomes (jusqu'au golgi). Il a été montré que l'endocytose du virus de vaccine est dépendante de protéines WASH sans que le processus par lequel le virus recrute

WASH ne soit mis en évidence (outch poxvirus enveloppé qui entre par fusion donc…il doit direct se fixer sur WASH et zou je rentre). Concernant les polyomavirus, leur entrée et leur trafic intracellulaire est compatible avec l'intervention des protéines WASH. Cependant, l'interaction directe entre les protéines VP2/3 et WASH est surprenante car au cours de son transport, le virus est contenu dans des vésicules.

Les VP2/3 interagissent avec GRASP55 (Golgi reassembly-stacking protein). GRASP55 ainsi que son homologue GRASP65 sont responsables du maintien de l'appareil de golgi ainsi que de sa reformation après la mitose. En dehors de leur rôle dans le maintien de l'appareil de golgi les GRASP55 et 65 interagissent avec la p24. Il a été proposé que le la p24 participe à la formation des vesicules COP en recrutant les protéines COP et les GTases nécessaires à la formation des vésicules. Les complexes VP2/3-GRASP-p24 pourraientt permettre au virus de quitter l'appareil de golgi pour rejoindre le RE.

L'interaction des VP2/3 a été vérifiée avec des protéines contenant des domaines à doigt de zinc (ZNF74, ZNHIT1, ZNF232, ZNF277, ZNF498, (=ZSCAN25)). Les rôles biologiques des ZNF74, 232, 277 et 478 ne sont pour le moment pas clairement supportés par la littérature. Par analogie à d'autres protéines cellulaires, ces ZNF ainsi que ALX3 sont potentiellement impliqués dans la régulation de la transcription ainsi que dans la maturation des ARNm. (Aussi ALX3 facteur de transcription par similarité). A l'image de ce qui observé dans l'encapsidation du génome du SV40 grâce au facteur de transcription SP1, il est possible que l'intéraction ADN-ZNF-VP2/3-VP1 contribue à l'encapsidation du génome viral. BLABLA recrutement des FT necessaire à la transcription virale. (shut off transcription cellulaire on a dit que non au final ???)on avait pas vu qd meme une ref de shut off de lamaturation des messagers cellulaires

Les protéines mineures de capside necessité de moduler les différents domaines qd pertinent interagissent avec la phosphatase PPEF1. Il est possible que cette interaction bloque l'activité sériné/thréonine phosphatase de PPEF1 ou alors que les VP2/3 redirigent l'activité de cet enzyme sur un nouveau substrat. (shut-off PP1 revoir viral zone) dans quelle partie PPEF1 ??

Les protéines mineures VP2 et VP3 interagissent avec des protéines impliquées dans des processus d'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN et l'apoptose (YPEL3, PNKP, ZNHIT1, BCL2L11).

YPEL3 est une protéine récemment décrite qui est probablement un suppresseur de tumeur. La transcription d'YPEL3 est sous la dépendance de la p53 et elle conduit à l'arrêt de la croissance cellulaire par sénescence (Kelley *et al.*, 2010, p. 3).

PRKAA1 est une kinase qui a pour dont le rôle est d'inhiber les voies consommatrices d'énergie lorsqu'il y a des carences en ATP dans la cellule. Il est possible que l'interaction VP2/3-PRKAA1 contrecarre l'action de PRKAA1 afin de continuer à produire des protéines virales lorsque la cellule est épuisée. Active par phosphorylation TSC2 (complexeTSC1/TSC2) qui inhibiteur de la voie mTOR (pro-prolif) détaille

CDCA4 (cell division cycle-associated 4) est impliquée dans le rétrocontrôle négatif de la transcritption E2F dépendante. La transcription de CDCA4 est sous le contrôle des E2F. Une fois produite la CDCA4 bloque leur rôle de facteur de transcription. Interet pour le virus

ZNHIT1 est un régulateur de la transcription qui se fixe au promoteur CDK6 ce qui conduit à sa répression transcriptionnelle et à l'arrêt du cycle cellulaire. Par ailleurs, ZNHIT1 contribue à la transcription p53 dépendante conduisant à l'apoptose.

La protéine BCL2L11 appartient à la famille de BCL2. Contrairement à BCL2 qui a un rôle anti-apoptotique, BCL2L11 est impliquée dans le processus pro-apoptotique car c'est un antagoniste de BCL2. Ajouter les refsEn condition normale, BCL2L11 est sequestrée sur les microtubules par l'intermédiare de la dynéine en fait bcl2l11 se fait btaper dedans par une caveole qui glisse et boum . En présence de signaux de stress, BCL2L11 est phosporylée ce qui conduit à sa libération. La BCL2L11 libérée est alors capable de fixer et d'inactiver BCL2 conduisant ainsi à l'apoptose (et aussi d'activer les pro-apoptotique Bax et blocage de l'autophagie via une interaction indirecte donc j'ai pas envie de me lancer la dedans). Un conditionnel une ref et ca roule non, en analysant est ce un avantage pour le virus l'histaoire de bax si non tu vires

Nous avons aussi identifié des partenaires cellulaires impliqués dans la prolifération cellulaire (VEGFB, PRDX3).

Les VP2 et VP3 interagissent avec le VEGFB (Vascular endothelial growth factor B). De nombreuxCependant ??, l'interaction directe entre une protéine virale et le VEGFB n'a pour le moment pas été décrite. Le rôle biologique de l'interaction VP2/3-VEGFB ne nous semble pour le moment pas intelilligible. Et si tu vois le vegf comme une cytokine est ce que cela change les choses ??

Les VP2/VP3 interagissent avec la fumarase (fumarate hydratase, FH). En dehors de son rôle dans le cycle de Krebs, la fumarase est aussi considérée comme un suppresseur de tumeurs. En effet, il a été montré que des déficiences pour la fumarase sont associées à certains cancers. Son rôle supresseur de tumeur est essentiellement caractérisé pour son action sur la voie HIF (Hypoxia Inductible Factor) dans laquelle l'accumulation de fumarate conduit entre autre à la prolifération cellulaire (Figure).

Le MCPyV grâce à ses protéines mineures de capside semble capable de moduler la voie NFκB. Le facteur de transcription NFκB régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la réponse inflammatoire et l'apoptose. En réponse aux pathogènes cette voie est rapidement déclenchée et de nombreux virus sont capables de la moduler. Les herpervirus EBV et KSHV sont capable de réguler la voie positivement ou négativement. Au cours du cycle lytique, ces virus suppriment la voie de signalisation NFκB alors que pendant la latence ils l'activent. Les papillomavirus grâce à la protéine E7 empêche la libération de NFκB en se fixant au complexe complexe IKK. Concernant le MCPyV, cette modulation se fait à différents niveaux car les VP2/3 interagissent avec deux protéines impliquées dans la voie NFκB : PDRX3 et RUSC1 (=NESCA). Cependant, même si des deux protéines cellulaires sont impliquées dans la voie NFκB, elles ont fait l'objet de peu de publications et leur rôle n'est pas complètement élucidé.

PRDX3 (=AOP1) semble être un co-activateur de la voie de NFkB. En effet, il a récemment été montré que AOP-1, (via son interaction avec LZK) fait partie intégrante du complexe IKK. En synergie avec les autres proteines du complexe IKK, AOP-1 semble impliquée dans la libération de NFκB et à la transcription NFκB-dépendante. AOP-1, ne possédant pas d'activité kinase, il a été suggéré que son activité péroxydase permet de stabiliser le complexe IKK (en condition de stress H_2O_2) (Masaki *et al.*, 2003). Les protéines VP2/3 interagissent avec NESCA (New molecule containing SH3 at carboxy terminus), une protéine récemment décrite pour être impliquée dans la voie NFκB. Elle interagit avec les protéines TRAFF6 et la sous-unité NEMO du complexe IKK mais son rôle n'est pas clairement établi dans la voie NFκB (Napolitano *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, nous ne savons pas les interactions entre les VP2/3 et AOP-1 NESCA contribuent à l'activation ou à l'inhibition de la transcription NFκB-dépendante. En effet, en début de cycle, il serrait interessant pour le virus d'inhiber la réponse inflammatoire alors qu'en fin de cycle l'activation de cette voie pourrait contribuer à l'apoptose de la cellule infectée et à la libération des virions.

Nous avons montré que les protéines mineures de capside VP2 et VP3 du MCPyV interagissent avec des protéines de l'hôte impliquées dans des processus cellulaires très variés tels que la prolifération cellulaire, l'apotose, la voie NFκB et le transport. Il est surprenant d'observer que les VP2/3 semblent avoir la capacité de moduler les voies de prolifération cellulaire et d'apoptose. En effet, ses fonctions sont généralement attribuées aux protéines précoces des polyomavirus via leur interaction avec les suppresseurs de tumeur. Cependant, nous avons observé une forte redondance dans la capacité du MCPyV à moduler ces voies. vu le nombre important de partenaires cellulaires impliqués dans ces voies ces résultats sont probablement pertinents (CF caro). A l'heure actuelle, nous ne savons pas si les interactions entre ses protéines cellulaires et les protéines virales conduisent à l'activation ou à l'inhibition de ses voies ni à quel moment de l'infection ses interactions surviennent. Au cours du cycle viral, les protéines mineures de capside sont exprimées tardivement et contribuent à la libération des virions. Pour le SV40, cette capacité est pour le moment attribuée au groupement myristyle et à l'action viroporine des protéines mineures de capside. Il est envisageable que les VP2/3 présentes lors de l'entrée du virus dans la cellule favorisent la prolifération cellulaire et bloquent l'apoptose. A l'inverse, il est possible que les interactions avec les protéines cellulaires impliquées dans l'apoptose et la prolifération cellulaire aient pour finalité de conduire à l'apoptose et de facilité la libération des virions. Il est donc nécessaire de réaliser des études complémentaires afin de déterminer comment la prolifération cellulaire ainsi que l'apoptose sont modulée par les VP2/3.

Donne les pistes qui te feraient triper avec quelles manips

L'étude des partenaires cellulaires du MCPyV sera étendue à la protéine majeure de capside VP1 et aux antigènes LT et ST afin de comprendre mieux caractériser la réplication du génome viral ainsi que l'oncogenèse viro-induite. Par ailleurs les interactions entre les différentes protéines virales seront étudiées par HT-GPCA.

Les protéines VP2/VP3 interagissent avec la sous unité COPS5 du complexe CSN (COP9 Signalosome complexe). Au sein de ce complexe, COPS5 est l'enzyme qui opère la dé-neddylation de la sous unité structurale culline du complexe E3 ubiquitine ligase (CRL)

qui passe alors de sa forme active à inactive. En conséquence, les substrats du complexe CRL sont stabilisés. Le rôle du complexe CSN est de prévenir l'auto-protéolyse cellulaire et la sous unité COPS5 est surexprimé dans de nombreux cancers (Gummlich *et al.*, 2013). Les papillomavirus, le KSH, l'EBV sont capables de rediriger l'activité des CRL sur les suppresseurs de tumeurs p53 ou pRB favorisant ainsi leur cycle viral. L'EBV est aussi capable d'inactiver les complexe CRL grâce à l'activité déneddylase de la protéine virale BPLF1. Tout comme de nombreux virus, le MCPyV semble donc capable de moduler la protéolyse cellulaire. Cependant, la conséquence de l'interaction VP2/3 reste à élucider. En effet, si l'interaction VP2/3-COPS5 résulte dans la séquestration de COPS5, la conséquence serrait une augmentation de la protéolyse….

Références bibliographiques

Agelli, M. & Clegg, L. X. (2003). Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* **49**, 832–841.

Agelli, M., Clegg, L. X., Becker, J. C. & Rollison, D. E. (2010). The etiology and epidemiology of merkel cell carcinoma. *Curr Probl Cancer* **34**, 14–37.

Albores-Saavedra, J., Batich, K., Chable-Montero, F., Sagy, N., Schwartz, A. M. & Henson, D. E. (2010). Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study. *J Cutan Pathol* **37**, 20–27.

Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M. A. A., Dalianis, T., Ramqvist, T. & Andersson, B. (2007). Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* **81**, 4130–4136.

An, K., Gillock, E. T., Sweat, J. A., Reeves, W. M. & Consigli, R. A. (1999). Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J Gen Virol* **80 (Pt 4)**, 1009–1016.

An, P., Sáenz Robles, M. T. & Pipas, J. M. (2012). Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Annu Rev Microbiol* **66**, 213–236.

Arora, R., Chang, Y. & Moore, P. S. (2012). MCV and Merkel cell carcinoma: a molecular success story. *Curr Opin Virol* **2**, 489–498.

Van Assche, G., Van Ranst, M., Sciot, R., Dubois, B., Vermeire, S., Noman, M., Verbeeck, J., Geboes, K., Robberecht, W. & Rutgeerts, P. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* **353**, 362–368.

Bauman, Y., Nachmani, D., Vitenshtein, A., Tsukerman, P., Drayman, N., Stern-Ginossar, N., Lankry, D., Gruda, R. & Mandelboim, O. (2011). An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell Host Microbe* **9**, 93–102.

Bennett, M. D. & Gillett, A. (2014). Butcherbird polyomavirus isolated from a grey butcherbird (Cracticus torquatus) in Queensland, Australia. *Vet Microbiol* **168**, 302–311.

Benoist, C. & Chambon, P. (1981). In vivo sequence requirements of the SV40 early promotor region. *Nature* **290**, 304–310.

Bodaghi, S., Comoli, P., Bösch, R., Azzi, A., Gosert, R., Leuenberger, D., Ginevri, F. & Hirsch, H. H. (2009). Antibody responses to recombinant polyomavirus BK large T and VP1 proteins in young kidney transplant patients. *J Clin Microbiol* **47**, 2577–2585.

Bouvard, V., Baan, R. A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N. & Straif, K. (2012). Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol* **13**, 339–340.

Bozeman, L. H., Davis, R. B., Gaudry, D., Lukert, P. D., Fletcher, O. J. & Dykstra, M. J. (1981). Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Dis* **25**, 972–980.

Bressollette-Bodin, C., Coste-Burel, M., Hourmant, M., Sebille, V., Andre-Garnier, E. & Imbert-Marcille, B. M. (2005). A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* **5**, 1926–1933.

Buck, C. B., Phan, G. Q., Raiji, M. T., Murphy, P. M., McDermott, D. H. & McBride, A. A. (2012). Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *J Virol* **86**, 10887.

Carter, J. J., Madeleine, M. M., Wipf, G. C., Garcea, R. L., Pipkin, P. A., Minor, P. D. & Galloway, D. A. (2003). Lack of serologic evidence for prevalent simian virus 40 infection in humans. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1522–1530.

Carter, J. J., Paulson, K. G., Wipf, G. C., Miranda, D., Madeleine, M. M., Johnson, L. G., Lemos, B. D., Lee, S., Warcola, A. H. & other authors. **(2009).** Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **101**, 1510–1522.

Carter, J. J., Daugherty, M. D., Qi, X., Bheda-Malge, A., Wipf, G. C., Robinson, K., Roman, A., Malik, H. S. & Galloway, D. A. (2013). Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 12744–12749.

Cassonnet, P., Rolloy, C., Neveu, G., Vidalain, P.-O., Chantier, T., Pellet, J., Jones, L., Muller, M., Demeret, C. & other authors. **(2011).** Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. *Nat Methods* **8**, 990–992.

Chastain, M. A. & Millikan, L. E. (2000). Pilomatrix dysplasia in an immunosuppressed patient. *J Am Acad Dermatol* **43**, 118–122.

Chen, T., Mattila, P. S., Jartti, T., Ruuskanen, O., Söderlund-Venermo, M. & Hedman, K. (2011). Seroepidemiology of the newly found trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *J Infect Dis* **204**, 1523–1526.

Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G. & Harrison, S. C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* **5**, 557–567.

Cicala, C., Pompetti, F. & Carbone, M. (1993). SV40 induces mesotheliomas in hamsters. *Am J Pathol* **142**, 1524–1533.

Clever, J. & Kasamatsu, H. (1991). Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. *Virology* **181**, 78–90.

Clever, J., Dean, D. A. & Kasamatsu, H. (1993). Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. *J Biol Chem* **268**, 20877–20883.

Corrand, L., Gelfi, J., Albaric, O., Etievant, M., Pingret, J.-L. & Guerin, J.-L. (2011). Pathological and epidemiological significance of goose haemorrhagic polyomavirus infection in ducks. *Avian Pathol J WVPA* **40**, 355–360.

Costa, C., Bergallo, M., Terlizzi, M. E., Cavallo, G. P., Cavalla, P. & Cavallo, R. (2011). Lack of detection of lymphotropic polyomavirus DNA in different clinical specimens. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* **51**, 148–149.

Coursaget, P., Samimi, M., Nicol, J. T. J., Gardair, C. & Touzé, A. (2013). Human Merkel cell polyomavirus: virological background and clinical implications. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* **121**, 755–769.

Dalianis, T., Ramqvist, T., Andreasson, K., Kean, J. M. & Garcea, R. L. (2009). KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: A new era for human polyomavirus research. *Semin Cancer Biol* **19**, 270–275.

Daniels, R., Rusan, N. M., Wadsworth, P. & Hebert, D. N. (2006a). SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implications for DNA translocation out of the ER. *Mol Cell* **24**, 955–966.

Daniels, R., Rusan, N. M., Wilbuer, A.-K., Norkin, L. C., Wadsworth, P. & Hebert, D. N. (2006b). Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes. *J Virol* **80**, 6575–6587.

Das, G. C. & Salzman, N. P. (1985). Simian virus 40 early promoter mutations that affect promoter function and autoregulation by large T antigen. *J Mol Biol* **182**, 229–239.

DeCaprio, J. A. & Garcea, R. L. (2013). A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol* **11**, 264–276.

Dela Cruz, F. N., Jr, Giannitti, F., Li, L., Woods, L. W., Del Valle, L., Delwart, E. & Pesavento, P. A. (2013). Novel polyomavirus associated with brain tumors in free-ranging raccoons, western United States. *Emerg Infect Dis* **19**, 77–84.

Diamandopoulos, G. T. (1972). Leukemia, lymphoma, and osteosarcoma induced in the Syrian golden hamster by simian virus 40. *Science* **176**, 173–175.

Dugan, A. S., Gasparovic, M. L. & Atwood, W. J. (2007). Direct Correlation between Sialic Acid Binding and Infection of Cells by Two Human Polyomaviruses (JC Virus and BK Virus). *J Virol* **82**, 2560–2564.

Dugan, A. S., Eash, S. & Atwood, W. J. (2005). An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *J Virol* **79**, 14442–14445.

Dworkin, A. M., Tseng, S. Y., Allain, D. C., Iwenofu, O. H., Peters, S. B. & Toland, A. E. (2009). Merkel cell polyomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma of immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* **129**, 2868–2874.

Eash, S., Querbes, W. & Atwood, W. J. (2004). Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol* **78**, 11583–11590.

Eddy, B. E., Stewart, S. E., Young, R. & Mider, G. B. (1958). Neoplasms in hamsters induced by mouse tumor agent passed in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* **20**, 747–761.

Eddy, B. E., Stewart, S. E., Stanton, M. F. & Marcotte, J. M. (1959). Induction of tumors in rats by tissue-culture preparations of SE polyoma virus. *J Natl Cancer Inst* **22**, 161–171.

Egli, A., Binggeli, S., Bodaghi, S., Dumoulin, A., Funk, G. A., Khanna, N., Leuenberger, D., Gosert, R. & Hirsch, H. H. (2007). Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* **22 Suppl 8**, viii72–viii82.

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

Elaba, Z., Hughey, L., Isayeva, T., Weeks, B., Solovan, C., Solovastru, L. & Andea, A. (2012). Ultrastructural and molecular confirmation of the trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in biopsies of patients with trichodysplasia spinulosa. *J Cutan Pathol* **39**, 1004–1009.

Elphick, G. F., Querbes, W., Jordan, J. A., Gee, G. V., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A. & other authors. **(2004).** The Human Polyomavirus, JCV, Uses Serotonin Receptors to Infect Cells. *Science* **306**, 1380–1383.

Engels, E. A., Frisch, M., Goedert, J. J., Biggar, R. J. & Miller, R. W. (2002). Merkel cell carcinoma and HIV infection. *Lancet* **359**, 497–498.

Erickson, K. D., Garcea, R. L. & Tsai, B. (2009). Ganglioside GT1b Is a Putative Host Cell Receptor for the Merkel Cell Polyomavirus. *J Virol* **83**, 10275–10279.

Faust, H., Pastrana, D. V., Buck, C. B., Dillner, J. & Ekström, J. (2011). Antibodies to Merkel cell polyomavirus correlate to presence of viral DNA in the skin. *J Infect Dis* **203**, 1096–1100.

Feng, H., Taylor, J. L., Benos, P. V., Newton, R., Waddell, K., Lucas, S. B., Chang, Y. & Moore, P. S. (2007). Human transcriptome subtraction by using short sequence tags to search for tumor viruses in conjunctival carcinoma. *J Virol* **81**, 11332–11340.

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

Focosi, D., Maggi, F., Andreoli, E., Lanini, L., Ceccherini-Nelli, L. & Petrini, M. (2009). Polyomaviruses other than JCV are not detected in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* **45**, 161–162.

Foulongne, V., Kluger, N., Dereure, O., Mercier, G., Molès, J.-P., Guillot, B. & Segondy, M. (2010). Merkel Cell Polyomavirus in Cutaneous Swabs. *Emerg Infect Dis* **16**, 685–687.

Foulongne, V., Courgnaud, V., Champeau, W. & Segondy, M. (2011). Detection of Merkel cell polyomavirus on environmental surfaces. *J Med Virol* **83**, 1435–1439.

Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V. & Hulme, B. (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* **1**, 1253–1257.

Garneski, K. M., Warcola, A. H., Feng, Q., Kiviat, N. B., Leonard, J. H. & Nghiem, P. (2009). Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol* **129**, 246–248.

Gasparovic, M. L., Gee, G. V. & Atwood, W. J. (2006). JC virus minor capsid proteins Vp2 and Vp3 are essential for virus propagation. *J Virol* **80**, 10858–10861.

Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G. A., Sloots, T. P. & Wang, D. (2007). Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* **3**, e64.

Gerits, N. & Moens, U. (2012). Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology* **432**, 316–326.

Giannitti, F., Higgins, R. J., Pesavento, P. A., Cruz, F. D., Clifford, D. L., Piazza, M., Struckhoff, A. P., Valle, L. D., Bollen, A. W. & other authors. **(2013).** Temporal and Geographic Clustering of Polyomavirus-Associated Olfactory Tumors in 10 Free-Ranging Raccoons (Procyon lotor). *Vet Pathol*.

Gilbert, J. & Benjamin, T. (2004). Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J Virol* **78**, 12259–12267.

Gilbert, J. M., Goldberg, I. G. & Benjamin, T. L. (2003). Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J Virol* **77**, 2615–2622.

Giorda, K. M., Raghava, S., Zhang, M. W. & Hebert, D. N. (2013). The viroporin activity of the minor structural proteins VP2 and VP3 is required for SV40 propagation. *J Biol Chem* **288**, 2510–2520.

Gjoerup, O. & Chang, Y. (2010). Update on human polyomaviruses and cancer. *Adv Cancer Res* **106**, 1–51.

Gordon-Shaag, A., Ben-Nun-Shaul, O., Roitman, V., Yosef, Y. & Oppenheim, A. (2002). Cellular transcription factor Sp1 recruits simian virus 40 capsid proteins to the viral packaging signal, ses. *J Virol* **76**, 5915–5924.

Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P., van Strien, A. & van der Noordaa, J. (1982). The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol* **10**, 91–99.

Gross, L. (1953). 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* **83**, 414–421.

Guerin, J. L., Gelfi, J., Dubois, L., Vuillaume, A., Boucraut-Baralon, C. & Pingret, J. L. (2000). A novel polyomavirus (goose hemorrhagic polyomavirus) is the agent of hemorrhagic nephritis enteritis of geese. *J Virol* **74**, 4523–4529.

Gummlich, L., Rabien, A., Jung, K. & Dubiel, W. (2013). Deregulation of the COP9 signalosome–cullin-RING ubiquitin-ligase pathway: Mechanisms and roles in urological cancers. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 1327–1337.

Halami, M. Y., Dorrestein, G. M., Couteel, P., Heckel, G., Müller, H. & Johne, R. (2010). Whole-genome characterization of a novel polyomavirus detected in fatally diseased canary birds. *J Gen Virol* **91**, 3016–3022.

Haycox, C. L., Kim, S., Fleckman, P., Smith, L. T., Piepkorn, M., Sundberg, J. P., Howell, D. N. & Miller, S. E. (1999). Trichodysplasia spinulosa--a newly described folliculocentric viral infection in an immunocompromised host. *J Investig Dermatol Symp Proc Soc Investig Dermatol Inc Eur Soc Dermatol Res* **4**, 268–271.

Hirsch, H. H., Knowles, W., Dickenmann, M., Passweg, J., Klimkait, T., Mihatsch, M. J. & Steiger, J. (2002). Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* **347**, 488–496.

Hodgson, N. C. (2005). Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol* **89**, 1–4.

Holzer, A. M. & Hughey, L. C. (2009). Trichodysplasia of immunosuppression treated with oral valganciclovir. *J Am Acad Dermatol* **60**, 169–172.

Ishii, N., Nakanishi, A., Yamada, M., Macalalad, M. H. & Kasamatsu, H. (1994). Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants of simian virus 40 structural proteins. *J Virol* **68**, 8209–8216.

Izakovic, J., Büchner, S. A., Düggelin, M., Guggenheim, R. & Itin, P. H. (1995). [Hair-like hyperkeratoses in patients with kidney transplants. A new cyclosporin side-effect]. *Hautarzt Z Für Dermatol Venerol Verwandte Geb* **46**, 841–846.

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

Jennings, S. H., Wise, A. G., Nickeleit, V., Maes, R. K., Cianciolo, R. E., Del Piero, F., Law, J. M., Kim, Y., McCalla, A. C. & other authors. **(2013).** Polyomavirus-associated nephritis in 2 horses. *Vet Pathol* **50**, 769–774.

Johne, R. & Müller, H. (1998). Avian polymavirus in wild birds: genome analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes. *Arch Virol* **143**, 1501–1512.

Johne, R. & Müller, H. (2001). Avian polyomavirus agnoprotein 1a is incorporated into the virus particle as a fourth structural protein, VP4. *J Gen Virol* **82**, 909–918.

Johne, R., Jungmann, A. & Müller, H. (2000). Agnoprotein 1a and agnoprotein 1b of avian polyomavirus are apoptotic inducers. *J Gen Virol* **81**, 1183–1190.

Johne, R., Wittig, W., Fernández-de-Luco, D., Höfle, U. & Müller, H. (2006). Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. *J Virol* **80**, 3523–3531.

Johne, R., Paul, G., Enderlein, D., Stahl, T., Grund, C. & Müller, H. (2007). Avian polyomavirus mutants with deletions in the VP4-encoding region show deficiencies in capsid assembly and virus release, and have reduced infectivity in chicken. *J Gen Virol* **88**, 823–830.

Johne, R., Buck, C. B., Allander, T., Atwood, W. J., Garcea, R. L., Imperiale, M. J., Major, E. O., Ramqvist, T. & Norkin, L. C. (2011). Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol* **156**, 1627–1634.

Kanitakis, J., Joly, M. O., Chouvet, B., Euvrard, S. & Claudy, A. (2006). Merkel cell carcinoma in immunocompetent and organ-transplant recipients do not harbor HPV. *Eur J Dermatol EJD* **16**, 445–446.

Kartenbeck, J., Stukenbrok, H. & Helenius, A. (1989). Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **109**, 2721–2729.

Kassem, A., Schöpflin, A., Diaz, C., Weyers, W., Stickeler, E., Werner, M. & Hausen, A. zur. **(2008).** Frequent Detection of Merkel Cell Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinomas and Identification of a Unique Deletion in the VP1 Gene. *Cancer Res* **68**, 5009–5013.

Kawano, M., Inoue, T., Tsukamoto, H., Takaya, T., Enomoto, T., Takahashi, R., Yokoyama, N., Yamamoto, N., Nakanishi, A. & other authors. **(2006).** The VP2/VP3 minor capsid protein of simian virus 40 promotes the in vitro assembly of the major capsid protein VP1 into particles. *J Biol Chem* **281**, 10164–10173.

Kean, J. M., Rao, S., Wang, M. & Garcea, R. L. (2009). Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* **5**, e1000363.

Kelley, K. D., Miller, K. R., Todd, A., Kelley, A. R., Tuttle, R. & Berberich, S. J. (2010). YPEL3, a p53-regulated gene that induces cellular senescence. *Cancer Res* **70**, 3566–3575.

Khalili, K. & White, M. K. (2006). Human demyelinating disease and the polyomavirus JCV. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* **12**, 133–142.

Kleinschmidt-DeMasters, B. K. & Tyler, K. L. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med* **353**, 369–374.

Koljonen, V. (2006). Merkel cell carcinoma. *World J Surg Oncol* **4**, 7.

Komagome, R., Sawa, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Tanaka, S., Atwood, W. J. & Nagashima, K. (2002). Oligosaccharides as Receptors for JC Virus. *J Virol* **76**, 12992–13000.

Korup, S., Rietscher, J., Calvignac-Spencer, S., Trusch, F., Hofmann, J., Moens, U., Sauer, I., Voigt, S., Schmuck, R. & Ehlers, B. (2013). Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PloS One* **8**, e58021.

Krauzewicz, N., Streuli, C. H., Stuart-Smith, N., Jones, M. D., Wallace, S. & Griffin, B. E. (1990). Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J Virol* **64**, 4414–4420.

Kuwamoto, S., Higaki, H., Kanai, K., Iwasaki, T., Sano, H., Nagata, K., Kato, K., Kato, M., Murakami, I. & other authors. **(2011).** Association of Merkel cell polyomavirus infection with morphologic differences in Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol* **42**, 632–640.

Kwun, H. J., Guastafierro, A., Shuda, M., Meinke, G., Bohm, A., Moore, P. S. & Chang, Y. (2009). The minimum replication origin of merkel cell polyomavirus has a unique large T-antigen loading architecture and requires small T-antigen expression for optimal replication. *J Virol* **83**, 12118–12128.

Lamoth, F., Pascual, M., Erard, V., Venetz, J.-P., Nseir, G. & Meylan, P. (2008). Low-dose cidofovir for the treatment of polyomavirus-associated nephropathy: two case reports and review of the literature. *Antivir Ther* **13**, 1001–1009.

Langer-Gould, A., Atlas, S. W., Green, A. J., Bollen, A. W. & Pelletier, D. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med* **353**, 375–381.

Lanoy, E., Costagliola, D. & Engels, E. A. (2010). Skin cancers associated with HIV infection and solid-organ transplantation among elderly adults. *Int J Cancer J Int Cancer* **126**, 1724–1731.

Laude, H. C., Jonchère, B., Maubec, E., Carlotti, A., Marinho, E., Couturaud, B., Peter, M., Sastre-Garau, X., Avril, M.-F. & other authors. **(2010).** Distinct merkel cell

polyomavirus molecular features in tumour and non tumour specimens from patients with merkel cell carcinoma. *PLoS Pathog* **6**, e1001076.

Laureano, A., Cunha, D., Pernandes, C. & Cardoso, J. (2014). Dermoscopy in Merkel cell carcinoma: a case report. *Dermatol Online J* **20**, 21543.

Lazarczyk, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y. & Favre, M. (2009). The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **73**, 348–370.

Lee, S., Paulson, K. G., Murchison, E. P., Afanasiev, O. K., Alkan, C., Leonard, J. H., Byrd, D. R., Hannon, G. J. & Nghiem, P. (2011). Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* **52**, 272–275.

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

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

Loyo, M., Guerrero-Preston, R., Brait, M., Hoque, M. O., Chuang, A., Kim, M. S., Sharma, R., Liégeois, N. J., Koch, W. M. & other authors. **(2010).** Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission. *Int J Cancer J Int Cancer* **126**, 2991–2996.

Major, E. O. (2010). Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med* **61**, 35–47.

Martel-Jantin, C., Filippone, C., Cassar, O., Peter, M., Tomasic, G., Vielh, P., Brière, J., Petrella, T., Aubriot-Lorton, M. H. & other authors. **(2012).** Genetic variability

and integration of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Virology* **426**, 134–142.

Martel-Jantin, C., Pedergnana, V., Nicol, J. T. J., Leblond, V., Trégouët, D.-A., Tortevoye, P., Plancoulaine, S., Coursaget, P., Touzé, A. & other authors. **(2013).** Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* **58**, 288–291.

Masaki, M., Ikeda, A., Shiraki, E., Oka, S. & Kawasaki, T. (2003). Mixed lineage kinase LZK and antioxidant protein-1 activate NF-kappaB synergistically. *Eur J Biochem FEBS* **270**, 76–83.

Matthews, M. R., Wang, R. C., Reddick, R. L., Saldivar, V. A. & Browning, J. C. (2011). Viral-associated trichodysplasia spinulosa: a case with electron microscopic and molecular detection of the trichodysplasia spinulosa-associated human polyomavirus. *J Cutan Pathol* **38**, 420–431.

Van der Meijden, E., Janssens, R. W. A., Lauber, C., Bouwes Bavinck, J. N., Gorbalenya, A. E. & Feltkamp, M. C. W. (2010). Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* **6**, e1001024.

Van der Meijden, E., Kazem, S., Burgers, M. M., Janssens, R., Bouwes Bavinck, J. N., de Melker, H. & Feltkamp, M. C. W. (2011). Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Emerg Infect Dis* **17**, 1355–1363.

Minor, P., Pipkin, P. A., Cutler, K. & Dunn, G. (2003). Natural infection and transmission of SV40. *Virology* **314**, 403–409.

Moens, U., Ludvigsen, M. & Van Ghelue, M. (2011). Human polyomaviruses in skin diseases. *Pathol Res Int* **2011**, 123491.

Moore, P. S. & Chang, Y. (2010). Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer* **10**, 878–889.

Nakanishi, A., Nakamura, A., Liddington, R. & Kasamatsu, H. (2006). Identification of Amino Acid Residues within Simian Virus 40 Capsid Proteins Vp1, Vp2, and Vp3 That Are Required for Their Interaction and for Viral Infection. *J Virol* **80**, 8891–8898.

Nakanishi, A., Itoh, N., Li, P. P., Handa, H., Liddington, R. C. & Kasamatsu, H. (2007). Minor capsid proteins of simian virus 40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry but are required for nuclear entry of the viral genome. *J Virol* **81**, 3778–3785.

Napolitano, G., Mirra, S., Monfregola, J., Lavorgna, A., Leonardi, A. & Ursini, M. V. (2009). NESCA: a new NEMO/IKKgamma and TRAF6 interacting protein. *J Cell Physiol* **220**, 410–417.

Neu, U., Woellner, K., Gauglitz, G. & Stehle, T. (2008). Structural basis of GM1 ganglioside recognition by simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5219–5224.

Neu, U., Hengel, H., Blaum, B. S., Schowalter, R. M., Macejak, D., Gilbert, M., Wakarchuk, W. W., Imamura, A., Ando, H. & other authors. **(2012).** Structures of Merkel Cell Polyomavirus VP1 Complexes Define a Sialic Acid Binding Site Required for Infection. *PLoS Pathog* **8**, e1002738.

Nguyen, N. L., Le, B. M. & Wang, D. (2009). Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses. *Emerg Infect Dis* **15**, 1199–1205.

Nicol, J. T. J., Robinot, R., Carpentier, A., Carandina, G., Mazzoni, E., Tognon, M., Touzé, A. & Coursaget, P. (2013). Age-specific seroprevalences of merkel cell

polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9, and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Clin Vaccine Immunol CVI* **20**, 363–368.

Nicol, J. T. J., Leblond, V., Arnold, F., Guerra, G., Mazzoni, E., Tognon, M., Coursaget, P. & Touzé, A. (2014). Seroprevalence of human Malawi polyomavirus. *J Clin Microbiol* **52**, 321–323.

Nicol, J. T. & Touzé, A. (2011). Prevalence of polyomaviruses and links with human diseases. *Future Virol* **6**, 1187–1197.

Osswald, S. S., Kulick, K. B., Tomaszewski, M.-M. & Sperling, L. C. (2007). Viral-associated trichodysplasia in a patient with lymphoma: a case report and review. *J Cutan Pathol* **34**, 721–725.

Ou, W. C., Hseu, T. H., Wang, M., Chang, H. & Chang, D. (2001). Identification of a DNA encapsidation sequence for human polyomavirus pseudovirion formation. *J Med Virol* **64**, 366–373.

Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J. & Dessel, B. H. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* **1**, 1257–1260.

Pastrana, D. V., Tolstov, Y. L., Becker, J. C., Moore, P. S., Chang, Y. & Buck, C. B. (2009). Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathog* **5**, e1000578.

Pastrana, D. V., Wieland, U., Silling, S., Buck, C. B. & Pfister, H. (2012a). Positive correlation between Merkel cell polyomavirus viral load and capsid-specific antibody titer. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **201**, 17–23.

Pastrana, D. V., Brennan, D. C., Çuburu, N., Storch, G. A., Viscidi, R. P., Randhawa, P. S. & Buck, C. B. (2012b). Neutralization Serotyping of BK Polyomavirus Infection in Kidney Transplant Recipients. *PLoS Pathog* **8**, e1002650.

Paulson, K. G., Lemos, B. D., Feng, B., Jaimes, N., Peñas, P. F., Bi, X., Maher, E., Cohen, L., Leonard, J. H. & other authors. **(2009).** Array-CGH reveals recurrent genomic changes in Merkel cell carcinoma including amplification of L-Myc. *J Invest Dermatol* **129**, 1547–1555.

Paulson, K. G., Carter, J. J., Johnson, L. G., Cahill, K. W., Iyer, J. G., Schrama, D., Becker, J. C., Madeleine, M. M., Nghiem, P. & Galloway, D. A. (2010). Antibodies to merkel cell polyomavirus T antigen oncoproteins reflect tumor burden in merkel cell carcinoma patients. *Cancer Res* **70**, 8388–8397.

Pelkmans, L., Kartenbeck, J. & Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**, 473–483.

Pérez-Losada, M., Christensen, R. G., McClellan, D. A., Adams, B. J., Viscidi, R. P., Demma, J. C. & Crandall, K. A. (2006). Comparing phylogenetic codivergence between polyomaviruses and their hosts. *J Virol* **80**, 5663–5669.

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

Querbes, W., Benmerah, A., Tosoni, D., Di Fiore, P. P. & Atwood, W. J. (2004). A JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin- and eps15-dependent pathway. *J Virol* **78**, 250–256.

Querbes, W., O'Hara, B. A., Williams, G. & Atwood, W. J. (2006). Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J Virol* **80**, 9402–9413.

Raghava, S., Giorda, K. M., Romano, F. B., Heuck, A. P. & Hebert, D. N. (2011). The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release. *PLoS Pathog* **7**, e1002116.

Renshaw, R. W., Wise, A. G., Maes, R. K. & Dubovi, E. J. (2012). Complete genome sequence of a polyomavirus isolated from horses. *J Virol* **86**, 8903.

Richardson-Burns, S. M., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., DeBiasi, R. L. & Tyler, K. L. (2002). Progressive multifocal leukoencephalopathy and apoptosis of infected oligodendrocytes in the central nervous system of patients with and without AIDS. *Arch Neurol* **59**, 1930–1936.

Rio, D. C. & Tjian, R. (1983). SV40 T antigen binding site mutations that affect autoregulation. *Cell* **32**, 1227–1240.

Roingeard, P., Al-Najjar, A., Buchler, M., Goudeau, A. & Lebranchu, Y. (1999). Infection par le virus BK chez un transplanté rénal. *Virologie* **3**, 418–9.

Roitman-Shemer, V., Stokrova, J., Forstova, J. & Oppenheim, A. (2007). Assemblages of simian virus 40 capsid proteins and viral DNA visualized by electron microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **353**, 424–430.

Rossi, G., Taccini, E. & Tarantino, C. (2005). Outbreak of avian polyomavirus infection with high mortality in recently captured Crimson's seedcrackers (Pyrenestes sanguineus). *J Wildl Dis* **41**, 236–240.

Sadler, G. M., Halbert, A. R., Smith, N. & Rogers, M. (2007). Trichodysplasia spinulosa associated with chemotherapy for acute lymphocytic leukaemia. *Australas J Dermatol* **48**, 110–114.

Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R. & Benjamin, T. (1993). Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology* **192**, 142–153.

De Sanjose, S., Shah, K. V., Domingo-Domenech, E., Engels, E. A., Fernandez de Sevilla, A., Alvaro, T., Garcia-Villanueva, M., Romagosa, V., Gonzalez-Barca, E. &

Viscidi, R. P. (2003). Lack of serological evidence for an association between simian virus 40 and lymphoma. *Int J Cancer J Int Cancer* **104**, 522–524.

Sapp, M. & Day, P. M. (2009). Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology* **384**, 400–409.

Sasnauskas, K., Buzaite, O., Vogel, F., Jandrig, B., Razanskas, R., Staniulis, J., Scherneck, S., Krüger, D. H. & Ulrich, R. (1999). Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol Chem* **380**, 381–386.

Sastre-Garau, X., Peter, M., Avril, M.-F., Laude, H., Couturier, J., Rozenberg, F., Almeida, A., Boitier, F., Carlotti, A. & other authors. **(2009).** Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J Pathol* **218**, 48–56.

Sauvage, V., Foulongne, V., Cheval, J., Ar Gouilh, M., Pariente, K., Dereure, O., Manuguerra, J. C., Richardson, J., Lecuit, M. & other authors. **(2011).** Human polyomavirus related to African green monkey lymphotropic polyomavirus. *Emerg Infect Dis* **17**, 1364–1370.

Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. A., Moyer, A. L. & Buck, C. B. (2010). Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* **7**, 509–515.

Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kühn, J., Hengel, H. & Ehlers, B. (2011). A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol* **85**, 4586–4590.

Seo, G. J., Chen, C. J. & Sullivan, C. S. (2009). Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression. *Virology* **383**, 183–187.

Shaw, M., Warren, S., Groben, P. & Gulley, M. L. (2006). No evidence of Epstein-Barr virus association with Merkel cell carcinoma. *J Cutan Pathol* **33**, 624–628.

Shitrit, D., Lev, N., Bar-Gil-Shitrit, A. & Kramer, M. R. (2005). Progressive multifocal leukoencephalopathy in transplant recipients. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* **17**, 658–665.

Shuda, M., Feng, H., Kwun, H. J., Rosen, S. T., Gjoerup, O., Moore, P. S. & Chang, Y. (2008). T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16272–16277.

Shuda, M., Kwun, H. J., Feng, H., Chang, Y. & Moore, P. S. (2011). Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *J Clin Invest* **121**, 3623–3634.

Siebrasse, E. A., Reyes, A., Lim, E. S., Zhao, G., Mkakosya, R. S., Manary, M. J., Gordon, J. I. & Wang, D. (2012). Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J Virol* **86**, 10321–10326.

Spanielová, H., Fraiberk, M., Suchanová, J., Soukup, J. & Forstová, J. (2014). The encapsidation of polyomavirus is not defined by a sequence-specific encapsidation signal. *Virology* **450-451**, 122–131.

Sperling, C. L. C., Tomaszewski, M.-M. & Thomas, D. A. (2004). Viral-associated trichodysplasia in patients who are immunocompromised. *J Am Acad Dermatol* **50**, 318–322.

Stevens, H., Bertelsen, M. F., Sijmons, S., Van Ranst, M. & Maes, P. (2013). Characterization of a novel polyomavirus isolated from a fibroma on the trunk of an African elephant (Loxodonta africana). *PloS One* **8**, e77884.

Stewart, S. E., Eddy, B. E., Gochenour, A. M., Borgese, N. G. & Grubbs, G. E. (1957). The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. *Virology* **3**, 380–400.

Stoll, R., Luo, D., Kouwenhoven, B., Hobom, G. & Müller, H. (1993). Molecular and biological characteristics of avian polyomaviruses: isolates from different species of birds indicate that avian polyomaviruses form a distinct subgenus within the polyomavirus genus. *J Gen Virol* **74 (Pt 2)**, 229–237.

Sullivan, C. S. & Pipas, J. M. (2002). T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **66**, 179–202.

Sullivan, C. S., Grundhoff, A. T., Tevethia, S., Pipas, J. M. & Ganem, D. (2005). SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* **435**, 682–686.

Sullivan, C. S., Sung, C. K., Pack, C. D., Grundhoff, A., Lukacher, A. E., Benjamin, T. L. & Ganem, D. (2009). Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. *Virology* **387**, 157–167.

Sundsfjord, A., Spein, A. R., Lucht, E., Flaegstad, T., Seternes, O. M. & Traavik, T. (1994). Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol* **32**, 1390–1394.

Sweet, B. H. & Hilleman, M. R. (1960). The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* **105**, 420–427.

Takemoto, K. K., Furuno, A., Kato, K. & Yoshiike, K. (1982). Biological and biochemical studies of African green monkey lymphotropic papovavirus. *J Virol* **42**, 502–509.

Todaro, G. J. & Takemoto, K. K. (1969). 'Rescued' SV40: increased transforming efficiency in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **62**, 1031–1037.

Tolstov, Y. L., Pastrana, D. V., Feng, H., Becker, J. C., Jenkins, F. J., Moschos, S., Chang, Y., Buck, C. B. & Moore, P. S. (2009). Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J Cancer J Int Cancer* **125**, 1250–1256.

Topalis, D., Andrei, G. & Snoeck, R. (2013). The large tumor antigen: a 'Swiss Army knife' protein possessing the functions required for the polyomavirus life cycle. *Antiviral Res* **97**, 122–136.

Touzé, A., Bousarghin, L., Ster, C., Combita, A.-L., Roingeard, P. & Coursaget, P. (2001). Gene transfer using human polyomavirus BK virus-like particles expressed in insect cells. *J Gen Virol* **82**, 3005–3009.

Touzé, A., Gaitan, J., Maruani, A., Le Bidre, E., Doussinaud, A., Clavel, C., Durlach, A., Aubin, F., Guyétant, S. & other authors. **(2009).** Merkel cell polyomavirus strains in patients with merkel cell carcinoma. *Emerg Infect Dis* **15**, 960–962.

Touzé, A., Gaitan, J., Arnold, F., Cazal, R., Fleury, M. J., Combelas, N., Sizaret, P.-Y., Guyetant, S., Maruani, A. & other authors. **(2010).** Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J Clin Microbiol* **48**, 1767–1770.

Touzé, A., Le Bidre, E., Laude, H., Fleury, M. J. J., Cazal, R., Arnold, F., Carlotti, A., Maubec, E., Aubin, F. & other authors. **(2011).** High levels of antibodies against merkel cell polyomavirus identify a subset of patients with merkel cell carcinoma with better clinical outcome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* **29**, 1612–1619.

Trusch, F., Klein, M., Finsterbusch, T., Kühn, J., Hofmann, J. & Ehlers, B. (2012). Seroprevalence of human polyomavirus 9 and cross-reactivity to African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Gen Virol* **93**, 698–705.

Tsai, B. (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J* **22**, 4346–4355.

Viscidi, R. P. & Clayman, B. (2006). Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. *Adv Exp Med Biol* **577**, 73–84.

Viscidi, R. P., Rollison, D. E. M., Viscidi, E., Clayman, B., Rubalcaba, E., Daniel, R., Major, E. O. & Shah, K. V. (2003). Serological cross-reactivities between antibodies to simian virus 40, BK virus, and JC virus assessed by virus-like-particle-based enzyme immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 278–285.

Viscidi, R. P., Rollison, D. E., Sondak, V. K., Silver, B., Messina, J. L., Giuliano, A. R., Fulp, W., Ajidahun, A. & Rivanera, D. (2011). Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus. *Clin Vaccine Immunol CVI* **18**, 1737–1743.

Weber, T. & Major, E. O. (1997). Progressive multifocal leukoencephalopathy: molecular biology, pathogenesis and clinical impact. *Intervirology* **40**, 98–111.

White, M. K. & Khalili, K. (2004). Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology* **324**, 1–16.

White, M. K., Safak, M. & Khalili, K. (2009). Regulation of gene expression in primate polyomaviruses. *J Virol* **83**, 10846–10856.

Wyatt, A. J., Sachs, D. L., Shia, J., Delgado, R. & Busam, K. J. (2005). Virus-associated trichodysplasia spinulosa. *Am J Surg Pathol* **29**, 241–246.

Yu, G., Greninger, A. L., Isa, P., Phan, T. G., Martínez, M. A., de la Luz Sanchez, M., Contreras, J. F., Santos-Preciado, J. I., Parsonnet, J. & other authors. **(2012).**

Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. *PloS One* **7**, e49449.

Annexes

Annexe 1 Titre de votre annexe

Si vous désirez structurer chaque annexe, vous avez à votre disposition, dans le menu déroulant des Pages annexes, un niveau de titre : ‘Subdivision 1’ (style 3|Ann_tit3).

N’oubliez pas d’effacer ce texte quand vous n’en aurez plus besoin.

Logo partenaire

Prénom NOM

TITRE de la thèse

Logo partenaire

Résumé

Insérer votre résumé en français suivi des mots-clés

1000 caractères maximum

Résumé en anglais

Insérer votre résumé en anglais suivi des mots-clés

