Université Paris Cité

École doctorale « Hématologie Oncogenèse et Biothérapies » ED561

Laboratoire « Génomes, biologie cellulaire et thérapeutique »
INSERM U944 – CNRS UMR 7212
Institut de recherche Saint Louis

Physiopathologie de l'infection à BK virus chez les transplantés rénaux

Impact de la diversité génétique in vivo et de la réponse humorale anti-VP1

Par Julien GRAS

Thèse de doctorat de « Biothérapies et biotechnologies »

Dirigée par le Pr Constance DELAUGERRE

Présentée et soutenue publiquement le Mercredi 19 Octobre 2022

Devant un jury composé de :

Pr Constance DELAUGERRE, PU-PH *(Université Paris Cité)*	**Directrice de thèse**
Pr Samira FAFI-KREMER, PU-PH *(Université de Strasbourg)*	**Rapportrice**
Dr Céline BRESSOLLETTE-BODIN, MCF *(Université de Nantes)*	**Rapportrice**
Dr Timothée BRUEL, CR *(Institut Pasteur)*	**Examinateur**
Dr Etienne BROCHOT, MCU-PH *(Université de Picardie)*	**Examinateur**
Pr Julien ZUBER, PU-PH *(Université Paris Cité)*	**Examinateur**
Dr Ali AMARA, DR *(Université Paris Cité)*	**Membre invité**

Titre : **Physiopathologie de l'infection à BK virus chez les patients transplantés rénaux - Impact de la diversité génétique du BK virus et de la réponse humorale anti-VP1**

Résumé : Le BK virus est un pathogène opportuniste de la famille des *Polyomaviridae*, dont la réactivation chez les patients transplantés rénaux peut conduire, en l'absence d'intervention thérapeutique, à la survenue d'une néphropathie (BKVN). La physiopathologie de l'infection par le BKV reste mal comprise, à la fois sur les plans virologique, immunologique et cellulaire.
Le premier objectif de mon travail de thèse était d'étudier la cinétique de la réplication et la diversité génétique du BKV dans le plasma et le rein de patients transplantés rénaux ayant développé une BKVN, et d'analyser en parallèle la réponse humorale anti-BKV-VP1 chez ces mêmes patients. Dans le cadre d'une une étude rétrospective à l'hôpital APHP-Saint Louis, nous avons inclus 32 patients transplantés rénaux avec une BKVN prouvée histologiquement entre Janvier 2016 et Décembre 2020.
Dans une première partie, nous avons effectué une analyse virologique exhaustive des échantillons de plasma et de ponction biopsie rénale (PBR) disponibles entre la greffe et la BKVN pour ces 32 patients. Au diagnostic de la BKVN, tous les échantillons de plasma et de PBR étaient BKV+ avec une charge virale élevée. Le séquençage Sanger de la protéine de capside VP1 a permis d'identifier le même génotype de BKV dans les deux compartiments chez 31/32 patients. Chez les 19 patients virémiques en amont du diagnostic de BKVN, le séquençage des échantillons de plasmas BKV+ a permis d'isoler le même sous-type que celui de la BKVN dans tous les cas. Le séquençage VP1 des plasmas BKV+ dès le début de la virémie identifie donc le génotype responsable de la BKVN. L'analyse des échantillons séquentiels de PBR a montré que la réplication du BKV est détectable de manière précoce dans le rein des patients greffés rénaux qui développent une BKVN (8/20 soit 40% de PBR BKV+ à J0, et 15/24 soit 62% à M3). En particulier, 9 patients avec une PBR BKV+ avant la survenue de la virémie. Dans ce cas, le génotype identifié dans la PBR à J0 et/ou M3 était différent de celui de la BKVN chez 8/9. Ces données suggèrent que la BKVN ne résulte pas seulement de la transmission du virus du donneur, mais également de la réactivation du virus latent chez le receveur.
Dans une seconde partie, nous avons étudié la réponse humorale anti-BKV dans cette même cohorte de patients, à l'aide de tests de neutralisation utilisant des pseudo-particules virales spécifiques des différents génotypes de BKV. Le titre d'anticorps neutralisants (AcN) vis-à-vis du BKV augmentait significativement entre J0 et le diagnostic de BKVN, mais ne différait pas entre les génotypes. La réponse AcN anti-VP1 du fait d'une cross-réactivité importante, ne permet pas de prédire le génotype responsable de la BKVN.
Le second objectif de mon projet de thèse était d'identifier des facteurs cellulaires essentiels au cycle de réplication du BK virus. A l'aide d'un crible CRISPR-Cas9 sur des cellules rénales primaires (RPTE-hTERT), nous avons identifié les protéines SURF-4 et FITM-2 comme de nouveaux facteurs de dépendance du BKV. L'inactivation de l'expression de ces deux gènes dans des cellules rénales 769P était associée à une réduction significative du taux d'infection par le BKV. SURF-4 et FITM-2 sont des protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique et pourraient donc jouer un rôle essentiel dans le trafficking cellulaire du virus.
En conclusion, ces travaux permettent de porter un regard nouveau sur la physiopathologie de l'infection par le BKV chez les transplantés rénaux. La BKVN pourrait résulter en grande partie de la réactivation du virus latent du receveur. De plus, nous avons identifié SURF-4 et FITM-2 comme de nouveaux facteurs de dépendance du BKV, et pourraient donc constituer des cibles thérapeutiques antivirales potentielles.

Mots clés : BK virus, transplantation rénale, néphropathie, diversité virale, séquençage, réponse humorale, anticorps neutralisants, crible CRISPR-Cas9, facteurs cellulaires.

Title: **Pathogenesis of BK virus infection in kidney transplant recipients – Impact of in vivo BKV genetic diversity and anti-VP1 humoral response.**

Summary: BK virus (BKV) is an opportunistic pathogen of the *Polyomaviridae* family, whose persistent reactivation in kidney transplant recipients (KTR) can lead, in the absence of any therapeutic intervention, to BKV associated tubulo-interstitial nephropathy (BKVN). The pathogenesis of BKV infection is not well established both on virologic, immunological and cellular levels.

The first aim of my PhD project was to study the kinetics of BKV replication and viral genetic diversity in the plasma and kidney of KTR with BKVN, as well as concomitant anti-BKV humoral response. In the APHP-Saint Louis Hospital, we retrospectively analyzed 32 cases of biopsy-proven BKVN from January 2016 to December 2020. In a first part, all available stored plasma and kidney biopsies (KB) samples from KT to BKVN were tested for BKV DNA viral load and BKV-VP1 sequencing performed on positive samples. At the time of BKVN diagnosis, all plasma and KB samples tested positive for BKV detection with high BK viral load. The same BKV-subtype was isolated in both compartments in 31/32 cases. Among viremic KTR before BKVN diagnosis, the BKVN subtype was also found in all previous BKV+ plasma (and concomitant KB samples). Early VP1 sequencing of BKV+ plasma samples identifies the genotype further responsible for BKVN. Sequential analysis of pre-BKVN KB showed that BKV was detected early in the kidney of KTR who develop BKVN (8/20, 40% of BKV+ KB at day 0 and 15/24, 62% at month 3). In particular, nine patients had BKV+ KB samples before the onset of BK viremia at day 0 (N=6) and/or month 3 (N=7). In these patients, VP1 sequencing of BKV+ KB identified a different subtype compared to BKVN sampling in 8/9. These results suggest that not only the donor strain is responsible for BKVN, but also reactivation of the latent recipient subtype may also be responsible for BKV infection following KT.

In a second part, we studied concomitant anti-BKV VP1 humoral response in the 32 KTR with biopsy proven BKVN. BKV-VP1 genotype-specific neutralizing antibodies (NAbs) titers were determined against all four main genotypes (I to IV) using VLP-based neutralization testing available serum samples. BKV-VP1 NAbs titers increased significantly from D0 to BKVN ($p=0.0031$) at similar titers between genotypes. In particular, NAb titer against the BKVN subtype was not statistically different compared to those directed against the other subtypes. Among KTR with BKVN, due to cross-reactivity of NAbs, anti-BKV humoral response cannot help to predict the genotype further responsible for BKVN.

The second aim of my PhD project was to identify key cellular factors required for BKV infection and viral cycle accomplishment. Using a genome-wide CRISPR-Cas9 screen on primary renal epithelial cells (RPTE-hTERT), we identified SURF-4 and FITM-2 as new BKV host dependency factors. We showed that knockout 769P renal cells for these two proteins were resistant to BKV infection. SURF-4 and FITM-2 are transmembrane proteins of the endoplasmic reticulum, and could play a role in BKV trafficking and decapsidation during viral cycle.

In conclusion, this PhD work sheds a new light on the pathogenesis of BKV infection in KTR. BKVN may not only result from the transmission of BKV donor strain, but also from the reactivation of BKV recipient latent subtype. Moreover, we identified SURF-4 and FITM-2 as new cellular factors important for BKV infection. These two proteins could represent new targets for the development of BKV specific antivirals.

Keywords: BK virus, kidney transplantation, nephropathy, viral diversity, sequencing, humoral response, neutralizing antibodies, CRISPR-Cas9 screen, cellular factors.

Remerciements

Cette thèse de sciences n'aurait pas pu aboutir sans l'aide de très nombreuses personnes que je tiens à remercier ici, en espérant ne pas en oublier.

Tout d'abord, je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Aux Docteur Céline Bressollette et Professeur Samira Fafi-Kremer d'avoir accepté d'être rapportrices. Aux Docteurs Timothée Bruel et Etienne Brochot ainsi qu'au Professeur Julien Zuber d'avoir accepté d'en être membres examinateurs. Au Docteur Ali Amara de m'avoir fait le plaisir d'accepter d'en être membre invité.

Je remercie de tout cœur ma directrice de thèse le Professeur Constance Delaugerre, de m'avoir fait confiance tout au long de ce projet, pour son aide et ses conseils précieux. Je ne te serai jamais assez reconnaissant de ta bienveillance, de ton soutien indéfectible et du temps que tu m'as consacré au milieu des première, deuxième … et énième vagues de COVID qui ont bousculé le calendrier de cette thèse. J'espère sincèrement poursuivre avec toi de nombreux projets à l'avenir.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Docteur Ali Amara, qui m'a accueilli dans son équipe de recherche au sein de l'unité U944 de l'INSERM, et d'avoir accepté de me faire confiance malgré mon parcours atypique, pour poursuivre une nouvelle thématique de recherche dans le laboratoire sur le BK virus.

Je tiens également à remercier le Professeur Jean Michel Molina de m'avoir encouragé à effectuer ce projet de thèse de sciences. Je suis fier du chemin parcouru depuis mon premier passage dans votre service comme interne en 2014, et vous serai toujours reconnaissant de m'avoir soutenu dans ce long parcours hospitalo-universitaire.

J'adresse bien évidemment mes remerciements à tous les membres de l'équipe de recherche de l'unité U944, qui m'ont gentiment accueilli, aidé, et encadré : à Lucie tout d'abord, qui m'a tout appris à mon arrivée et sans qui aucune des manips ne serait allée à son terme, à Fanny et Anne Claire pour leur aide précieuse dans l'avancée du projet, à tous les membres actuels ou passés de l'équipe qui ont participé de près ou de loin au « projet BK » à côté de leur projets de recherche respectifs (Stéphane, Athéna, Alexis, Laurent, Vassiliya, ou Laurine), et aux autres membres de l'équipe pour leur gentillesse et leur bienveillance (Sarah, Luc, et Marie). Une pensée particulière enfin pour le Docteur Sylvain Chawki, avec qui j'ai partagé le même bureau dans le laboratoire pendant un an comme co-thésard, puis dans le service comme co-CCA ; je te souhaite plein de réussite pour ta soutenance de thèse à venir.

Je remercie également toute l'équipe de virologie de l'hôpital Saint Louis, avec qui j'ai partagé de longs moments pour l'avancée des manips, au milieu des vagues de COVID. Au Docteur Maud Salmona pour son expertise NGS, sa bienveillance et sa disponibilité jusqu'au milieu de ses vacances pour m'aider dans l'analyse des résultats et la relecture du manuscrit. A Marie Laure qui a pris le temps de former à la PCR et au séquençage BK virus, et sans qui aucun des manips de génomique ne serait arrivée à terme. Mais également au Professeur Jérôme Le Goff, aux Docteures Nadia Mahjoub et Linda Feghoul, et aux autres membres du laboratoire (Séverine…), qui m'ont accompagné dans ce projet, et m'ont encadré de près ou de loin à un moment pour que le BKV se fasse une petite place dans le monde de la virologie à Saint Louis.

Je remercie l'ensemble des acteurs de l'hôpital Saint Louis avec qui j'ai collaboré durant la thèse, et sans qui ce projet n'aurait pas pu voir le jour. Au Professeur Marie Noëlle Peraldi pour sa gentillesse, sa disponibilité et son investissement dans le projet. Au Docteur Jérome Vérine et aux membres du service d'anatomopathologie pour la préparation des biopsies et la relecture des échantillons. Au Professeur Jean Luc Taupin du service d'immunologie d'avoir pris le temps de fouiller dans ses stocks de sérums. A Sophia et surtout Julien du service de bioinformatique pour leur aide précieuse dans l'analyse des résultats de WGS. Aux Professeures Guislaine Carcelain et Sophie Caillat pour les conseils immunologiques avisés. Au Professeur Sylvie Chevret et au Docteur Claire Montlahuc pour leur aide dans les analyses statistiques.

Je remercie également Le Dr Etienne Brochot d'Amiens pour sa précieuse collaboration (tests ELISA et sérums), ainsi que les néphrologues de Necker, pour l'intérêt qu'ils ont porté dans mon travail : le Docteur Anne Scemla pour sa disponibilité et ses conseils avisés lors de mes deux comités de suivi de thèse, le Professeur Julien Zuber pour avoir accepté de faire partie du jury et pour ses conseil de projets de mobilité, et le Pr Dany Anglicheau pour son investissement dans la mise en place de projets de recherche clinques futurs sur le BK virus.

Merci également à toute l'équipe du service de Maladies Infectieuses de l'hôpital Saint Louis avec qui je suis resté en contact durant les deux premières années de thèse, et que j'ai réintégré comme CCA pour la dernière année. C'est aussi pour vous que je me suis lancé dans ce projet un peu fou, et je souhaite sincèrement revenir travailler à vos côtés pour continuer à soigner les gens comme vous savez si bien le faire.

Enfin, un grand merci à tous les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenu et accompagné au bout de ces études sans fin, en particulier à mon père et mes frères, et à ma mère qui aurait été fière de me voir arriver là. Sans oublier ma belle-mère, mes belles sœurs et beaux-frères qui ont accepté avec bienveillance de garder les enfants pour que je puisse finir de rédiger le manuscrit.
Merci enfin à Louise, la plus merveilleuse des compagnes sans qui je ne serai jamais arrivée jusque-là : je ne dirais jamais assez à quel point je te suis reconnaissant d'avoir enduré les longues soirées de travail et mes absences nécessaires à l'aboutissement de ce projet. Et à mes deux amours, Auguste et Joséphine, qui ont illuminé ces trois années de thèse de leurs sourires et de leur joie de vivre communicative.

Table des matières

Remerciements 4
Table des matières 6
Table des illustrations 10
Liste des abréviations 13
Introduction 15
1. BKPyV : aspects virologiques 17
1.1. Structure du BKPyV 17
1.2. Organisation génomique 18
1.3. Cycle de réplication du BKPyV 20
2. Histoire naturelle de l'infection par le BKPyV 23
2.1. Primo-infection 23
2.2. Dissémination et latence dans les tissus infectés 24
2.3. Réactivation et pathogénicité 25
3. Infection à BKPyV en transplantation rénale 27
3.1. Histoire naturelle de l'infection par le BKPyV chez les transplantés rénaux 27
3.2. Facteurs de risque d'infection à BKPyV après transplantation rénale 28
3.3. Physiopathologie de la BKVN 32
4. BKPyV et diversité génétique 38
4.1. Principaux génotypes de BKPyV 38
4.2. Variabilité de la région non codante 40
4.3. Variabilité de la région codante 41
5. BKPyV : aspects immunologiques 43
5.1. Immunité innée 43
5.2. Immunité humorale 44
5.3. Immunité cellulaire adaptative ou spécifique 48
Objectifs 50
Etude de la diversité virale *in vivo* du BKPyV chez les transplantés rénaux avec BKVN 53
1. Méthodes 54

1.1. Population d'étude 54
1.2. Suivi clinique 54
1.3. Prélèvements biologiques 55
1.4. PCR quantitative BK virus 55
1.5. Séquençage Sanger de la protéine de capside VP1 56
1.6. Séquençage génome complet (WGS [Whole Genome Sequencing]) 57
2. Résultats 59
2.1. Caractéristiques de la population d'étude 59
2.2. Analyse de la réplication du BKPyV de la greffe au diagnostic de BKVN 61
2.3. Séquençage Sanger de la protéine de capside VP1 62
2.4. Séquençage génome complet (WGS) 67
3. Discussion 78
3.1. Réplication du BKPyV dans les compartiments biologiques après greffe rénale 78
3.2. Evolution virale du BKPyV dans le rein des patients avec BKVN 80
3.3. Compartimentalisation et diversité du BKPyV des patients avec BKVN 81
4. Apport du WGS dans l'analyse de la diversité virale 82
Etude de la réponse humorale anti-BKPyV chez les transplantés rénaux avec BKVN 84
1. Méthodes 85
1.1. Amplification des plasmides 85
1.2. Production des VLP 86
1.3. Tests de neutralisation 88
1.4. Test ELISA 89
2. Résultats 90
2.1. Détection des anticorps anti-BKPyV à J0 90
2.2. Réponse anticorps neutralisante chez les patients avec BKVN 92
3. Discussion 96
3.1. Séroprévalence à J0 : IgG et AcN anti-BKPyV 96
3.2. Titre d'anticorps anti-BKPyV à J0 et prédiction du risque d'infection à BKPyV 98
3.3. Cinétique de la réponse AcN chez les patients avec BKVN 99

3.4. Facteurs associés à la survenue de la BKVN et à la persistance de la virémie 100

Identification de facteurs cellulaires essentiels au cycle de réplication du BKPyV 103
1. Méthodes..... 104
1.1. Culture cellulaire 104
1.2. Production virale, purification et titration des stocks viraux 105
1.3. Crible CRISPR-Cas9 sur cellules RPTE hTERT 106
1.4. Génération de cellules KO et trans-complémentation 106
1.5. Tests d'infection 107
2. Résultats 108
2.1. Résultats du crible CRISPR-Cas9 sur cellules RPTE-hTERT 108
2.2. Effets de la perte de fonction de SURF4 et FITM2 sur l'infection par le BK virus dans les cellules 769P 109
2.3. SURF4 et FITM2 interviennent à la phase précoce du cycle d'infection par le BKPyV dans les cellules 769P 111
3. Discussion 112

Conclusion et perspectives..... 115

Références 121

Annexe 1 – Données supplémentaires..... 134
1. Matériels et Méthodes 134
1.1. Protocole PCR albumine 134
1.2. Séquences de référence des sous-types de BKPyV utilisés pour la construction des arbres phylogénétiques (Sanger et WGS) 135
2. Figures / Tableaux supplémentaires 136
Tableau S1. Cinétique de réplication du BKPyV et génotype correspondant (Sanger VP1) dans les échantillons de PBR et de plasma concomitant de la greffe au diagnostic de BKVN.136
Tableau S2. Données de séquençage WG des échantillons de biopsies et de plasmas antérieurs à la BKVN..... 138

Figure S1. Arbres phylogénétiques avec les séquences consensus WGS (Patients #3 et #13). 140

Figure S2. Corrélation charge virale BKPyV / profondeur d'alignement en WGS..... 141

Tableau S3. Comparaison des séquences consensus WGS des échantillons de biopsie et de plasma à la BKVN. 142

Annexe 2 – Publications 143

Publications associées à la thèse..... 143

Publications sur la thématique des infections à BK virus 143

Article 1 associé à la thèse (en cours de révision) 144

Article 2 sur la thématique des infections à BK virus 162

Table des illustrations

Figure 1. **Arbre phylogénétique des polyomavirus responsables de pathologies chez l'homme** (tiré de Ambalathingal et al [4]). 16

Figure 2. **Structure d'une particule de BK virus en microscopie électronique** (tiré de Helle et al. [8], adapté de Hurdiss et al. [6]). 17

Figure 3. **Organisation génomique de l'ADN du BKPyV** (tiré de Helle et al. [8]) 18

Figure 4. **Schéma du cycle de réplication du BKPyV** (tiré de Chong et al. [27]) 21

Figure 5. **Histoire naturelle de l'infection par le BKPyV après transplantation rénale** (tiré de Varella et al. [79]) 28

Figure 6. **Facteurs de risque d'infection par le BKPyV après transplantation rénale** (adapté de la revue d'Ambalathingal et al. [4]) 30

Figure 7. **Physiopathologie de la néphropathie à BKPyV après transplantation rénale.** 33

Figure 8. **Histologie des lésions de BKVN** (adapté de Drachenberg et al. [122]) 35

Figure 9. **Recommandations de l'ATS 2019 concernant le screening, le diagnostic et le traitement de l'infection à BKPyV chez les transplantés rénaux** (tiré de Hirsch et al. [124]). 36

Figure 10. **Distribution géographique des principaux sous-types de BKPyV en Europe, en Afrique et en Asie** (tiré de Zheng et al. [144]) 39

Figure 11. **Diversité des épitopes dans la boucle BC de la protéine de capside VP1 (acides aminés 60 à 83).** 41

Figure 12. **Avantages, inconvénients et modalités des principaux types de tests de détection des anticorps anti-BKPyV** (tiré de Dakroub et al. [172]) 45

Figure 13. **Rôle des lymphocytes T anti-BKPyV dans le contrôle de la réplication virale et la progression vers la néphropathie** (tiré de Babel et al. [199]) 49

Figure 14. **Pipeline 2 d'analyse bio-informatique des données de WGS du BKPyV.** 59

Tableau 1. **Caractéristiques démographiques et de la transplantation de la population.** 60

Tableau 2. **Cinétique de réplication du BK virus dans les échantillons de biopsie rénale et de plasma concomitants de la greffe au diagnostic de BKVN chez les 32 cas.** 61

Figure 15. **Répartition des sous-types de BK virus identifiés par séquençage Sanger de VP1 dans les échantillons de PBR et de plasma au diagnostic de la BKVN.** 62

Tableau 3. **Mutations non synonymes dans le gène VP1 en Sanger.** 64

Figure 16**. Arbres phylogénétiques avec séquences Sanger VP1 des échantillons séquentiels de biopsies et de plasmas de la greffe au diagnostic de BKVN.** 66
Figure 17**. Détermination de la sensibilité du WGS sur échantillons purifiés de BK-Dunlop à des dilutions successives.** 67
Figure 18**. Analyse des données de WGS de mélanges de BKPyV (pipeline 1).** 68
Tableau 4**. Données de séquençage WG des échantillons à la date de la BKVN.** 69
Figure 19**. Arbres phylogénétiques avec séquences consensus majoritaires en WGS des échantillons de plasmas et de biopsies à la date de la BKVN.** 72
Tableau 5**. Génotype majoritaire et coinfections identifiées en Sanger et WGS dans les échantillons de plasma et de biopsie à la BKVN** 73
Tableau 6**. Coinfections BKPyV identifiées en WGS dans les patients avec biopsies rénales séquentielles BKV-positives.** 74
Figure 20**. Nombre et distribution des mutations synonymes et non synonymes le long du génome du BKPyV dans le plasma versus biopsie à la BKVN.** 76
Figure 21**. Nombre et types de mutations identifiées dans les séquences codantes du génome du BKPyV après analyse des variants minoritaires en WGS des différents échantillons.** 77
Tableau 7**. Liste des plasmides utilisés pour la production des VLP-BKPyV** (avec la collaboration de C. Buck et D. Pastrana, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland) 86
Figure 22**. Analyse des fractions obtenues après ultracentrifugation sur gradient d'OptiPrep™ pour la production de VLP-BK VP1-Ib2 (A) et VP1-IVb1 (B).** 87
Figure 23**. Tests de neutralisation pour la détection des AcN du BKPyV.** 88
Figure 24**. Détection des anticorps anti-BKPyV en ELISA et neutralisation sur les sérums à J0.** 91
Figure 25**. Comparaison des titres d'anticorps neutralisants vis-à-vis de la souche responsable de la BKVN comparativement aux autres.** 93
Figure 26**. Cinétique du titre d'AcN vis-à-vis de la souche réplicante et de la charge virale BKPyV plasmatique chez les 32 patients avec un diagnostic de BKVN.** 96
Figure 27**. Les Lymphocytes B mémoires contiennent des anticorps anti-BKPyV capables de cross-neutraliser plusieurs sous-types de BKPyV en liant des épitopes viraux conservés entre les différentes souches** (abstract graphique tiré de Lindner et al. [138]) 100
Figure 28**. Crible CRISPR Cas9 génome complet sur cellules RPTE-hTERT** 108

Figure 29**. SURF4 et FITM2 sont des facteurs proviraux essentiels pour l'infection à BKPyV dans les cellules 769P** 110
Figure 30**. SURF4 et FITM2 interviennent à la phase précoce du cycle d'infection par le BKPyV dans les cellules 769P** 112

Liste des abréviations

A
AA : acides aminés
AcN : anticorps neutralisant
ADN : acide désoxyribonucléique
APOBEC : apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like
AKAP2 : A-Kinase Anchoring protein 2
ARN : acide ribonucléique
ATG : anti-thymocyte globulin

B
BKV : BK virus
BKVN : néphropathie à BK virus

C
cDNA : ADN complémentaire
CMH : complexe majeur histocompatibilité
CNI : inhibiteurs de calcineurine
CSH : cellules souches hématopoïétiques
CV : charge virale

D
pDC : cellules dendritiques plasmocytoïdes
DFG : débit de filtration glomérulaire
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's Medium
DO : densité optique

E
EDTA : acide éthylène-diamine-tétra-acétique
ELISA : enzyme-like immunosorbent assay

F
FACS : fluorescence activated cell sorting
FITM2 : Fat storage Inducing TransMembrane protein 2

G
GVHD: graft versus host disease

H
HA : hémagglutinine
HLA : human leucocyte antigen
HRP : horse radish peroxidase

I
IC50 : concentration inhibitrice à 50%
IC95% : intervalle de confiance à 95%
IFN : interféron
Ig IV : immunoglobulines intra-veineuses
IHC : immunohistochimie
IQR : inter-quartile range (écart inter-quartile)

K
KO : knock out

L
LT : lymphocytes T
LTh : lymphocytes T helper
LTAg : antigène large T

M
MMF : mycophénolate mofetil
MOI : multiplicity of infection

N
NCCR : non coding control region
NGS : next generation sequencing
NK : natural killer
NS : non synonymes

O
OR : odds ratio

P
PALM2 : paralemmin 2

pb : paires de bases
PBMC : peripheral blood mononuclear cells
PBR : ponction biopsie rénale
PCR : polymerase chain reaction
PFA : para-formaldéhyde
PNN : polynucléaires neutrophiles
c-PRA : calculated Panel Reactive Antibody

R
RPM : reads par millions
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
RPTE : renal primary tubular epithelial
RT-PCR : PCR temps reel

S
S : mutations synonymes
sgRNA : single guide ARN
SNP: single nucleotide polymorphism
s/s/a : substitution / site / an
SURF4 : Surfeit Locus Protein 4
SV40 : polyomavirus simien 40

T
TGF : tumor growth factor
TNF : tumor necrosis factor

U
UI : unités internationales

V
VHC : virus de l'hépatite C
VLP : virus-like particles

W
WGS : whole genome sequencing

Introduction

Le BK polyomavirus (BKPyV) est un virus à ADN double brin membre de la famille des *Polyomaviridae* (genre *Betapolyomavirus*), identifié pour la première fois en 1971 à partir des urines d'un patient soudanais transplanté rénal de 37 ans (initiales B.K.) [1].

Les virus de la famille des *Polyomaviridae* (PyV) infectent de nombreuses espèces d'oiseaux et de mammifères (primates, rongeurs). Le PyV murin (MPyV) a été le premier membre identifié en 1953 à partir d'adénocarcinomes de la parotide de jeunes souris, d'où son nom tiré du grec « poly » (nombreuses) et « oma » (tumeur) [2]. Les PyV comprennent aujourd'hui plusieurs dizaines de membres isolés pour la plupart au cours des 10 dernières années grâce aux nouvelles techniques de séquençage [3]. A ce jour, 15 PyV ont été identifiés comme responsables de pathologies chez l'homme (Figure 1). En particulier, les virus JC et MC (Merkel cell) sont impliqués respectivement dans la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) et le carcinome de Merkel [4]. Le BKPyV partage avec les autres PyV une grande similarité structurale, des tailles de génomes comparables et une homologie de séquence importante (75% avec le JCV et 69% avec SV40).

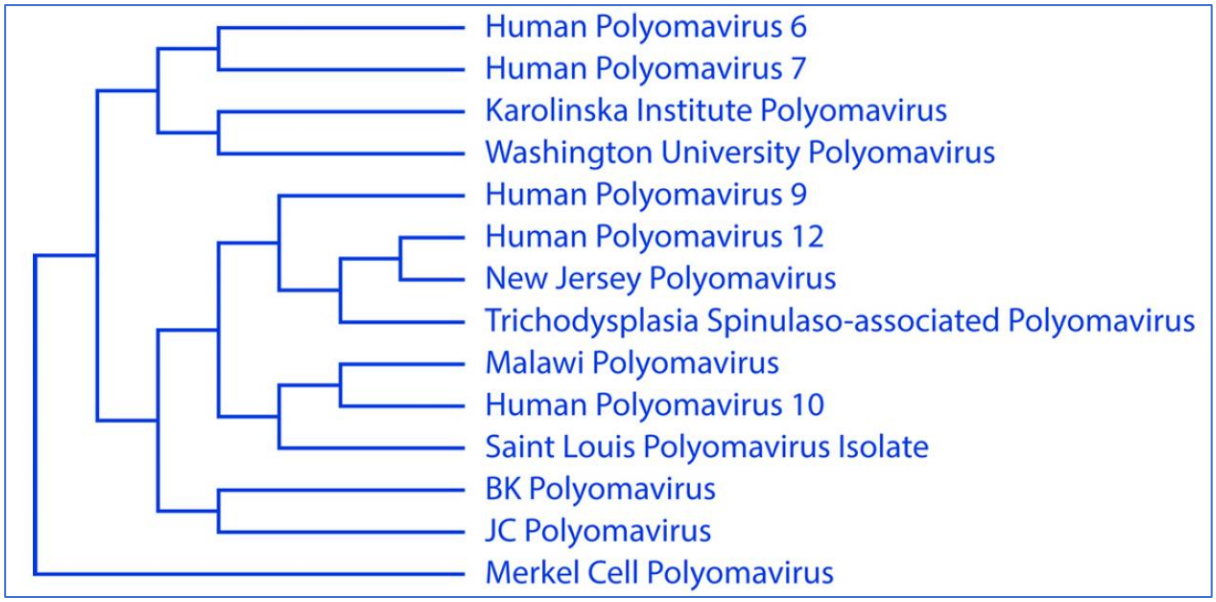


Figure 1**. Arbre phylogénétique des polyomavirus responsables de pathologies chez l'homme** (tiré de Ambalathingal et al [4]).
L'arbre phylogénétique a été réalisé à partir des séquences protéiques de référence de la protéine de capside VP1 des différents PyV.

Le BKPyV est un pathogène opportuniste dont les manifestations cliniques sont le plus souvent minimes chez l'immunocompétent. En revanche, la réactivation du BKPyV chez les sujets immunodéprimés peut être responsable de complications sévères : néphropathies tubulo-interstitielles, des sténoses urétérales, ou des cystites hémorragiques [5].

1. BKPyV : aspects virologiques

1.1. Structure du BKPyV

Le BKPyV est un virus non enveloppé de petite taille (40 à 45nm), et d'une densité de 1.34ng/ml. Il est doté d'une capside icosaédrique (T = 7d) constituée des protéines VP1, VP2, et VP3. Des études récentes de microscopie électronique ont permis de mieux caractériser la structure du BKV [6,7] (Figure 2).

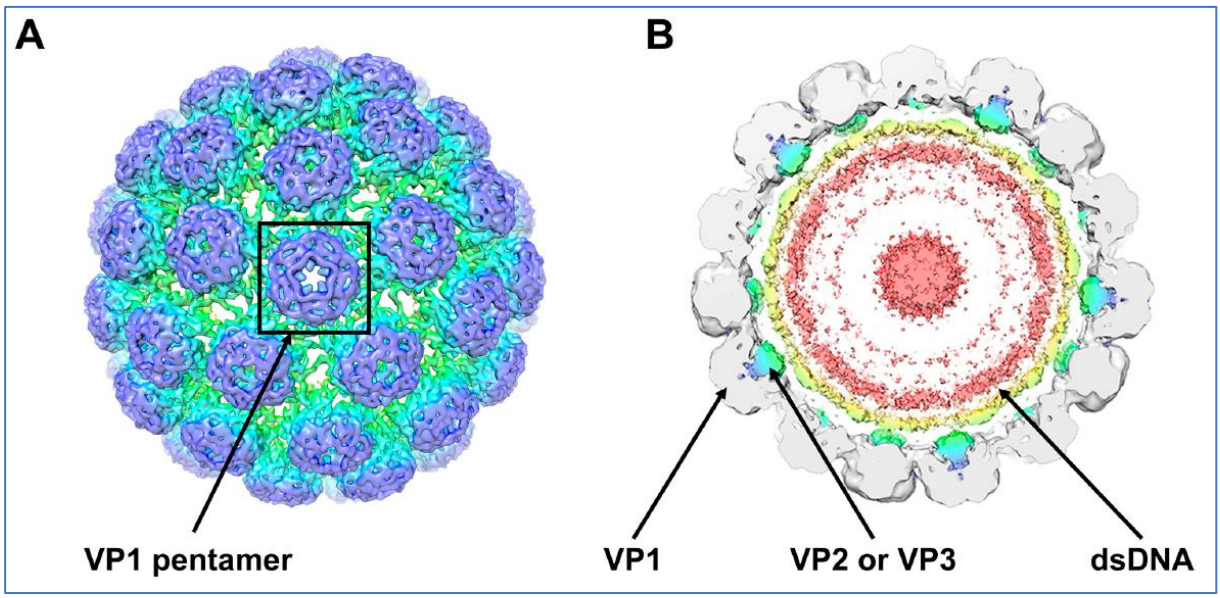


Figure 2**. Structure d'une particule de BK virus en microscopie électronique** (tiré de Helle et al. [8], adapté de Hurdiss et al. [6]).
A. Vue d'ensemble de la capside virale avec les pentamères de VP1 (N=72) à sa surface
B. Coupe transversale d'une particule virale : les protéines de capside mineures VP2 et VP3 sont enchâssées à la face interne de la capside dans les pentamères de VP1 ; la capside contient le matériel génétique sous forme de chromatine super-enroulée.

La protéine de capside majeure VP1 est une protéine de 362 AA (42kDa) divisée en 5 boucles (BC, DE, EF, GH, HI) connectant les différents segments de polypeptides. VP1 représente 80% du contenu protéique total du BKV. Elle est la seule protéine exposée à la surface de la capside, où elle est organisée en 72 pentamères stabilisés par des liaisons disulphure / ions Ca^{2+} [8]. L'extrémité C-terminale assure la liaison avec les pentamères adjacents, tandis que l'extrémité N-terminale (située à la face interne de la capside) assure la liaison avec l'ADN. Trois des 5 boucles de VP1 sont présentes à la surface de la protéine (BC, DE et HI), et sont susceptibles d'interagir avec d'autres protéines au cours du cycle viral.
VP2 et VP3 sont des protéines structurales de capsides dites « mineures », respectivement de 351 AA (38 kDa) et 232 AA (27 kDa), produites à partir du même transcrit tardif. Chacune de

ces molécules interagit avec un unique pentamère de VP1 dans lequel elles s'insèrent au niveau de la cavité centrale par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. Leur extrémité C-terminale est commune et contient plusieurs motifs importants, dont les sites de liaison à VP1 et à l'ADN, ainsi qu'un site de localisation nucléaire (NLS). Ces deux protéines ne sont pas nécessaires à l'assemblage des virions, mais sont essentielles pour créer des virions infectants.

1.2. Organisation génomique

Le génome du BKPyV est un ADN circulaire double brin d'environ 5.2 kb. Il est contenu à l'intérieur de la capside protéique sous forme de chromatine super-enroulée avec des histones, chaque génome contenant environ 20 nucléosomes. Il comporte deux régions codantes hautement conservées, et une région non codante (NCCR) [4,8] (Figure 3).

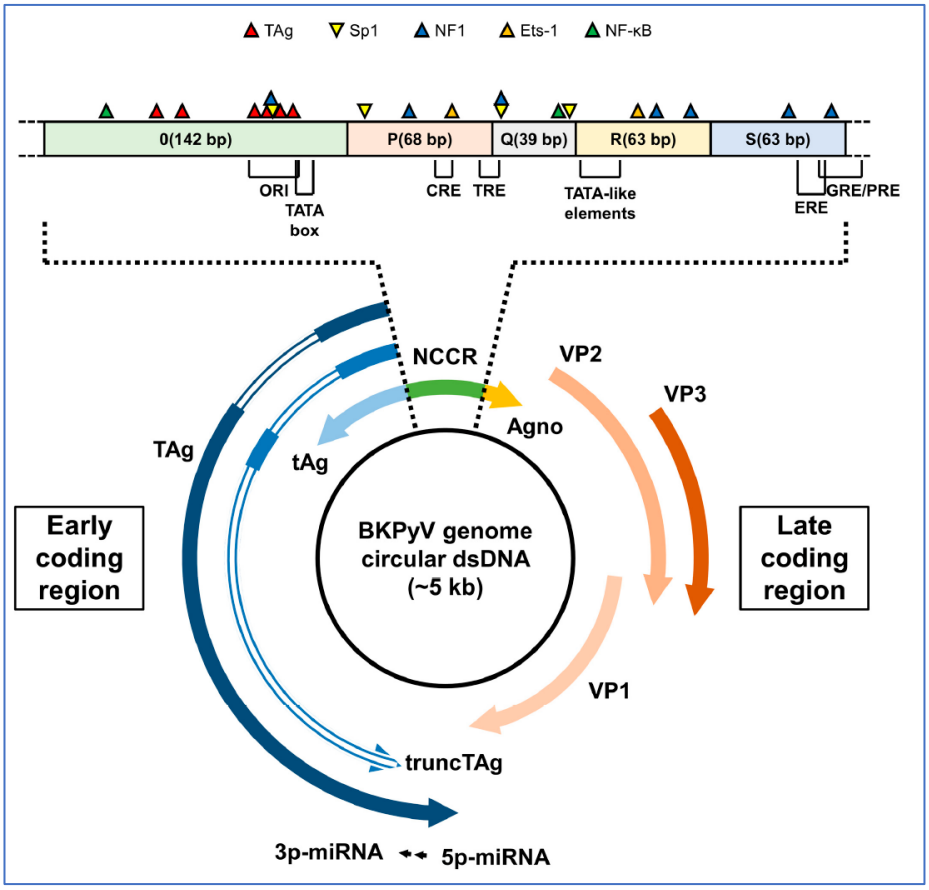


Figure 3**. Organisation génomique de l'ADN du BKPyV** (tiré de Helle et al. [8])
Le génome du BK virus est un ADN circulaire double brin de 5200 pb environ constitué d'une région non codante hypervariable (NCCR) à partir de laquelle d'effectue la transcription bidirectionnelle des régions codantes précoces (LTAg, sTAg, truncTAg) et tardives (Agno, VP1, VP2 et VP3).

La transcription de la région codante précoce conduit à la production de trois ARN messagers (ARNm) différents après splicing, codant respectivement pour les protéines LTAg (large

tumour antigen), sTAg (small tumour antigen) et truncTAg (truncated Tag). Ces trois protéines ont pour rôle principal d'activer la progression dans le cycle cellulaire de la cellule infectée, afin de promouvoir la synthèse d'ADN et de protéines virales. Cette fonction est assurée en premier lieu par LTAg grâce à son activité d'ADN hélicase, et son interaction avec les facteurs de transcription. En effet, LTAg est capable de se lier aux motifs GAGGCC de l'origine de réplication, où elle forme un complexe constitué de deux hexamères. En interagissant avec plusieurs partenaires (RPA, Pol α-primase, topoisomérase-1), elle initie une réplication bidirectionnelle selon un processus ATP-dépendant. De plus, du fait de leur capacité à se lier aux protéines suppresseurs de tumeurs p53 et pRB, LTAg et sTAg sont également capables de bloquer l'apoptose, facilitant ainsi la réplication virale. L'ensemble de ces caractéristiques explique les propriétés de transformation cellulaire maligne du BKPyV largement démontrées *in vitro* et sur des modèles expérimentaux [9].

La région codante tardive code quant à elle pour les protéines structurales produites après l'initiation de la réplication (protéines de capside & protéine Agno). Ces protéines sont produites à partir de deux ARNm tardifs générés suite au splicing d'un pré-ARNm commun. La protéine Agno est une protéine basique de 66 AA (8 kDa) hautement conservée parmi les PyV. Elle est abondamment exprimée dans les cellules infectées par le BKPyV *in vitro* et *in vivo*, où elle est localisée principalement dans la région périnucléaire du cytoplasme, en particulier au niveau des « lipid droplets » [10]. Cependant, en dépit d'une expression abondante, on n'observe pas de réponse immunitaire humorale ou cellulaire vis-à-vis d'Agno chez les patients avec une infection par le BKPyV [11]. Plusieurs rôles putatifs pour la protéine Agno du BKPyV ont été décrits : assemblage des virions, modulation de l'exocytose des particules virales par interaction avec la protéine α-SNAP [12], ou encore inhibition de la réparation de l'ADN après un dommage [13]. Agno semble être une protéine importante mais non essentielle dans le cycle d'infection du BKPyV [14].

Enfin, le génome du BKPyV comprend une région non codante (NCCR) d'environ 400pb organisée en 5 blocs (O, P, Q, R et S) [15] (Figure 3). Cette région joue un rôle clé dans la coordination de la réplication virale, du fait de la présence du site d'initiation de réplication (ORI) dans le bloc O à partir duquel s'effectue la transcription de manière bidirectionnelle. Elle contient également de multiples sites de liaison pour les facteurs de transcription (TFBS), en particulier la protéine Sp1 (mais également NFAT, NT1, Ets1, AP1, p53 ou NFk-B). Contrairement aux deux régions codantes qui sont hautement conservées, la région NCCR est une région hypervariable qui présente un polymorphisme important. Sa séquence permet de distinguer les souches dites « archétypes » (ww-NCCR) correspondant à la forme

transmissible du virus circulant dans la population générale, des souches dites « réarrangées » (rr-NCCR). Ces dernières comportent des modifications de séquences qui affectent le plus souvent les TFBS (mutations ponctuelles, duplications, délétions, réarrangements) [16].

1.3. Cycle de réplication du BKPyV

1.3.1. Attachement du virus

La liaison du BKPyV aux cellules cibles s'effectue par l'intermédiaire de la protéine de capside majeure VP1, seule protéine exprimée à la surface du virus. Plusieurs études ont démontré que les gangliosides polysialylés jouent un rôle clé dans l'interaction initiale entre le BKPyV et les cellules cibles, comme c'est le cas pour d'autres polyomavirus (JCV, SV40, mPy). Les gangliosides sont un type de glycosphingolipides présents à la face externe de la membrane plasmatique, où ils interagissent avec des phospholipides, du cholestérol et des protéines transmembranaires pour former des radeaux lipidiques [17]. Ils sont constitués d'un fragment carbohydrate, et d'un fragment céramide formant deux bras, et contenant un (GM-mono), deux (GD-di) ou trois (GT-tri) résidus d'acide sialique branchés le plus souvent en α-(2,3) sur des résidus galactosyl ou en α-(2,8) sur d'autres résidus d'acide sialique [18]. Le BKPyV interagit notamment avec les gangliosides GT1b et GD1b via un double motif acide sialique N-linked α-(2,3) : cette interaction est essentielle et suffisante à l'infection [19,20] (Figure 4). Le rôle des résidus d'acide sialique dans l'attachement du BKPyV aux cellules cibles a été conforté par des données issues de plusieurs études sur cellules rénales RPTE (Renal Primary Tubular Epithelial) [21], extra-rénales (LNCaP – cellules cancéreuses prostatiques) [19], ainsi que dans des modèles murins [22].

De manière intéressante, les récepteurs gangliosidiques sont abondamment exprimés *in vivo* dans le tissu rénal [23]. Cependant, ils sont également présents à la surface de très nombreux types cellulaires, en particulier dans le tissu cérébral. Le tropisme rénal du BKPyV ne peut donc s'expliquer uniquement par la présence de récepteurs de liaison à la surface des cellules cibles de l'épithélium tubulaire rénal. Il implique probablement également des facteurs de restriction cellulaires encore méconnus.

1.1.1. Internalisation

L'endocytose du BKPyV survient dans les 4h suivant la liaison aux récepteurs, et est médiée principalement par les cavéolines [24], contrairement aux autres virus à ADN qui sont

internalisés généralement par la voie des clathrines, comme c'est le cas pour le JCV [25]. L'endocytose du BKPyV est également dépendante de certains résidus cholestérol de la membrane, d'une étape de phosphorylation tyrosine-kinase dépendante, et d'une acidification du pH intra-vésiculaire [24]. Ces données expérimentales ont été confortées par des données *in vivo* de microscopie électronique, ayant mis en évidence sur des biopsies rénales de patients transplantés avec néphropathie à BKPyV (BKVN), la présence de virions encapsulés dans des petites vésicules situées sous la membrane cytoplasmique des cellules rénales compatibles avec des cavéolines [26].

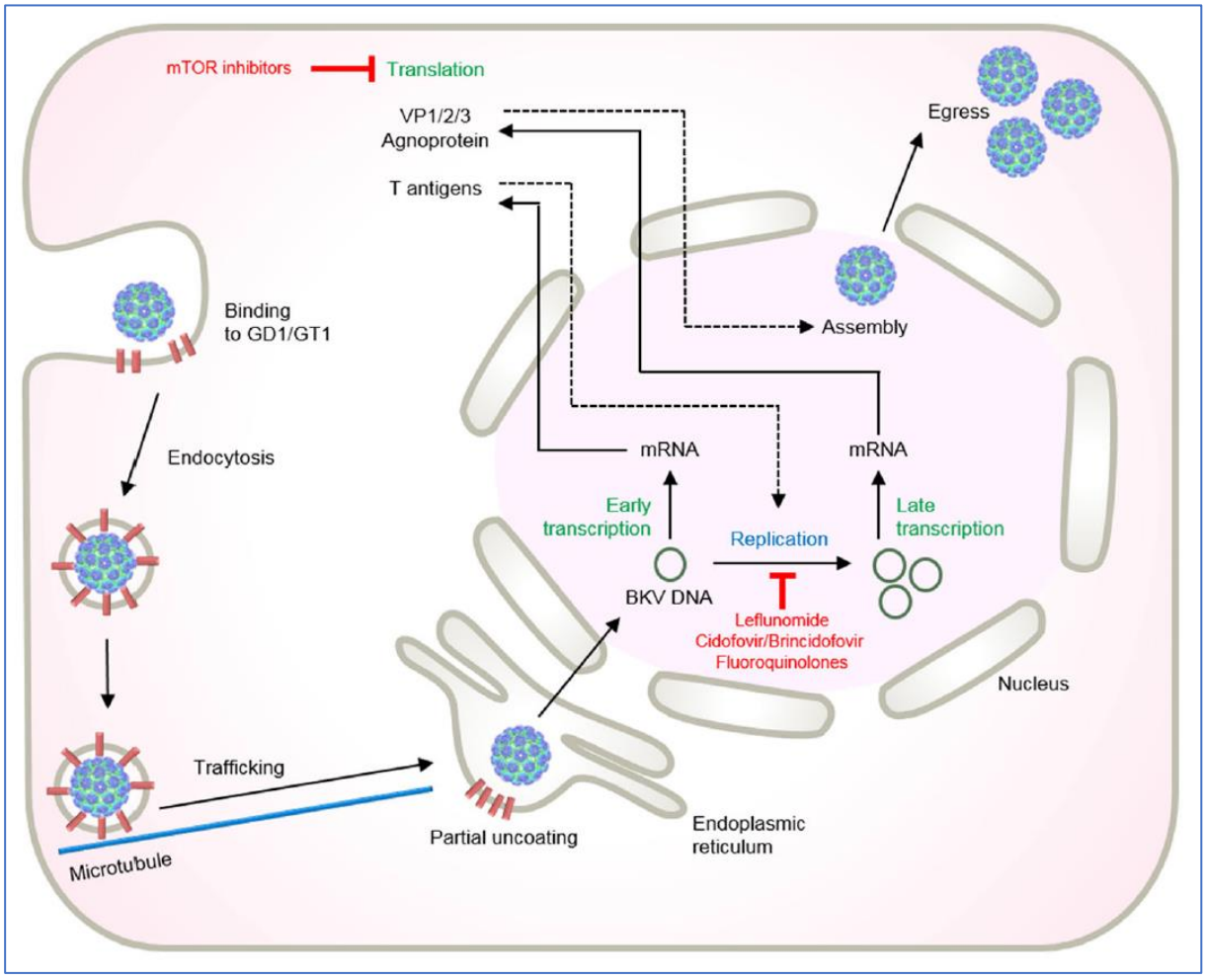


Figure 4**. Schéma du cycle de réplication du BKPyV** (tiré de Chong et al. [27])
Le cycle de réplication du BKPyV débute par l'attachement de la particule virale aux gangliosides GT1b et GD1b à la surface des cellules cibles, par l'intermédiaire de la protéine de capside VP1. La particule virale est ensuite internalisée par la voie des cavéolines, pour rejoindre le RE où elle subit une décapsidation partielle. Une fois l'ADN viral transféré dans le noyau, la transcription s'effectue grâce aux ADN polymérases cellulaires, permettant l'expression des protéines de la région codante précoce (LTAg, sTAg et truncTAg) puis tardives (Agno, VP1, VP2, VP3). Après une étape de traduction dans le cytoplasme, l'assemble des néo-particules virales s'effectue dans le noyau avant relargage suite à la lyse des cellules infectées le plus souvent.

Cependant, des données plus récentes *in vitro* ont montré que le BKPyV est capable d'infecter des cellules RPTE indépendamment de la voie des clathrines et des cavéolines, suggérant possiblement l'existence d'une autre voie d'internalisation [21].

1.1.2. Trafficking

Après internalisation, les particules virales sont transférées vers le réticulum endoplasmique (RE) sans transiter par l'appareil de Golgi, qu'elles atteignent environ 10h après l'infection (Figure 4). Le trafficking intracellulaire des virions se fait le long des microtubules, la dégradation des filaments d'actine n'ayant pas d'impact sur l'infection par le BKPyV [28].

Une fois dans le RE, par analogie avec le polyomavirus SV40, le BKPyV utilise la machinerie ERAD (ER-Associated protein Degradation) pour franchir la membrane du RE et atteindre le cytosol [29,30]. Dans un premier temps, les particules virales vont subir des modifications conformationnelles sous l'action de nombreuses protéines (disulfures isomérases [PDI], réductases [ERdJ5] …) [31]. Celles-ci permettent la décapsidation partielle du virus, exposant les protéines de capside mineures VP2 et VP3 hydrophobes sous-jacentes. La particule virale est recrutée par des protéines chaperonnes pour empêcher leur agrégation dans la lumière du RE (dont la protéine BiP) [32]. Une fois à proximité de la membrane du RE, le complexe Bip-BKV est pris en charge par une protéine chaperonne transmembranaire (BAP31) [32]. Après ancrage dans la membrane du RE, le virus induit une réorganisation des protéines transmembranaires en recrutant notamment les « J-protein » (DNAJ-B12, -B14 et -C18), qui recrutent à leur tour un complexe cytosolique (constitué protéines Hsc70, Hsp105 et SGTA), permettant d'éjecter le virus dans le cytosol [33].

Après décapsidation complète dans le cytosol, le génome viral est transféré dans le noyau au niveau des complexes de pores nucléaires, par l'intermédiaire de la voie des importines [34].

1.1.3. Expression des gènes précoces du BKPyV et réplication du génome viral

La transcription des gènes précoces débute dès l'entrée du génome dans le noyau (soit environ 24h après l'infection), et celle des gènes tardifs environ 36h après. Les protéines précoces sont traduites dans le cytoplasme avant d'être relocalisées dans le noyau, où elles vont promouvoir la progression dans le cycle cellulaire. Le génome du BKPyV ne codant pas pour une ADN polymérase virale, seule la protéine LTag est essentielle à la réplication du génome viral. Tous les autres facteurs impliqués dans la réplication du BKPyV sont ceux de la cellule hôte.

Plusieurs études de transcriptomique ont mis en évidence que le BKPyV dérégule l'expression de nombreux gènes au sein des cellules infectées. En particulier, l'infection par le BKPyV est associée à une up-régulation de l'expression des gènes de contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, visible dès 48h à 72h post-infection [35]. Le BKPyV active également les systèmes cellulaires de réparation de l'ADN (kinases ATM et ATR) afin de protéger la cellule hôte des dommages d'ADN potentiels induits par la réplication de l'ADN viral [36]. Enfin, le BKPyV modifie le pattern des PML-NB (Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies) (augmentation de taille, diminution du nombre), empêchant ainsi ces structures d'assurer leur rôle régulateur de l'infection par les virus à ADN [37].

1.1.4. Assemblage des particules virales et libération

Après traduction dans le cytoplasme, les protéines de capside sont transférées dans le noyau sous forme de complexes VP1-VP3 et VP1-VP2 (grâce aux motifs NLS de VP2 et VP3). L'assemblage des capsomères viraux autour du génome du BKPyV s'effectue dans le noyau grâce aux concentrations élevées de calcium. Les premiers virions sont détectés environ 48h après l'infection. *In vivo*, environ 6000 particules virales de BKPyV sont détectées par cellule rénale infectée dans les biopsies rénales de patients avec une BKVN [5,26].

Peu de données expérimentales existent quant aux mécanismes de sortie du BKPyV de la cellule. La protéine Agno semble jouer un rôle dans la maturation des particules virales et leur exocytose du noyau. Le BKPyV est ensuite le plus souvent relargué par lyse des cellules cibles, mais des données suggèrent l'existence d'autres mécanismes de sortie non lytiques : voie d'exocytose impliquant des lysosomes issus du RE tardif et des canaux anioniques [38], ou vésicules extracellulaires et mécanismes de transmission « en bloc » [39].

2. Histoire naturelle de l'infection par le BKPyV

2.1. Primo-infection

La primo-infection BKPyV survient précocement dans l'enfance, et est le plus souvent asymptomatique. Dans le cas contraire, elle se présente sous forme d'un tableau de virose respiratoire non spécifique, avec des symptômes modérés [40].

Les mécanismes de transmission du BKPyV sont mal connus mais il semble que la transmission intervienne essentiellement par voie directe respiratoire. En effet, dans une étude

rétrospective, l'analyse de sérums d'enfants admis pour une infection respiratoire haute a mis en évidence une séroconversion BKPyV chez 7/177 des sujets testés [40]. Dans cette même étude, l'étude histologique de prélèvements d'amygdales de 12 enfants retrouvait la présence d'ADN du BKPyV par hybridation *in situ* (HIS) sur 5 des 12 échantillons testés (dont un patient avec séroconversion BKPyV concomitante) [40]. D'autres voies de transmission directe ont également été suggérées : oro-fécale (détection fréquente de PyV dans les selles) [41], sanguine (amplification de séquences du BKPyV à partir de lymphocytes périphériques) [42], sexuelle, ou trans-placentaire. Enfin, dans le cadre de la transplantation rénale, une transmission indirecte du BKPyV par l'intermédiaire du greffon pourrait intervenir (cf. 3.3.1.).

2.2. Dissémination et latence dans les tissus infectés

Après acquisition, le BKPyV dissémine au cours d'une phase de virémie vers les organes cibles, par l'intermédiaire des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) infectés au site d'entrée. Sur la base de données histologiques, il est admis que le site de latence principal du BK PyV est le tractus uro-génital. Dans une première étude anatomopathologique ayant analysé des prélèvements rénaux issus de 30 cadavres, l'ADN du BKPyV était détecté dans 33% des échantillons en quantité très faible, et avec une distribution focale [43]. Plus récemment, l'analyse exhaustive de fragments de tissu uro-génital isolés à partir de 9 cadavres de sujets sains (et 1 patient HIV+) a révélé la présence d'ADN du BK PyV tout le long de l'arbre urinaire : parenchyme rénal (29%), bassinet (17%), uretères (20%), et vessie (60%). Dans tous les cas, l'immunohistochimie (IHC) anti-SV40 TAg était négative, suggérant que le BKPyV était présent sous forme latente [44]. Peu d'études ont évalué précisément les cellules cibles préférentielles du BKPyV au sein de l'appareil uro-génital. Cependant, les données obtenues dans des modèles murins à partir de l'étude de la distribution de pseudo-particules virales (VLP) marquées, ont montré que le BKPyV a un tropisme préférentiel pour les micro vaisseaux de la médulla (vasa recta, et plus spécifiquement les cellules endothéliales non fenestrées), ainsi que pour l'épithélium transitionnel du bassinet [45].

Outre le tractus uro-génital, les cellules lymphoïdes circulantes pourraient également constituer un site de latence du BKPyV, même si les premières études se sont avérées discordantes à ce sujet (isolement de séquences de PyV à partir de PBMC de sujets immunocompétents dans 0 [46] à plus de 90% [47] des cas selon les études). En effet, deux larges études de cohorte menées chez des sujets sains dans des établissements de dons du sang, ont retrouvé la présence d'ADN du BKPyV par RT-PCR dans les PBMC de 7,3 à 26,4% des

individus [48,49]. Dans ces deux études, la prévalence de l'infection diminuait avec l'âge, suggérant que les PBMC ne constituent probablement pas un site de latence prolongé du BKPyV. La détection du virus dans les PBMC pourrait donc être davantage le reflet d'une infection et/ou d'une réactivation virale récente.

Enfin, d'autres études ont également isolé de l'ADN viral à partir d'autres organes, qui pourraient donc constituer d'autres sites de latence potentiels du BKPyV : les ganglions lymphatiques, les glandes salivaires en particulier chez les patients séropositifs pour le VIH avec HIVSGD (« HIV Salivary Gland Disease) [50], ou encore le système nerveux central [51].

2.3. Réactivation et pathogénicité

2.3.1. Profil de réactivation du BKPyV

Au sein des sites de latence, le BKPyV persiste sous forme d'ADN épisomal non intégré. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le contrôle de la réplication virale. En particulier, les micro ARNs (miRNA) du BKPyV jouent un rôle clé en ciblant des éléments régulateurs de la région non codante, contrôlant ainsi la réplication de l'ADN génomique [52].

Le BKPyV peut se réactiver de manière intermittente à partir des sites de latence en particulier le tractus uro-génital. Une virurie BKPyV est ainsi observée chez 7 à 20% des adultes immunocompétents [53], avec une fréquence accrue chez la femme enceinte ou les personnes âgées [54,55]. En revanche, en cas d'immunodépression sous-jacente (transplantation d'organes solides [TOS], allogreffe de cellules souches hématopoïétiques [CSH], infection par le VIH non contrôlée avec CD4 < 100/mm^3), le BKPyV peut se réactiver de manière persistante dans les urines et/ou le sang, conduisant à des manifestations cliniques sévères. Du fait de son tropisme urologique, les deux manifestations cliniques principales associées à une réplication persistante du BKPyV sont la néphropathie tubulo-interstitielle (cf. 3.), et la cystite hémorragique (CH). D'autres manifestations urologiques (sténoses urétérales) ou extra-urologiques dans le cadre d'infections disséminées (parotidites, pneumopathies interstitielles, méningo-encéphalites, …) ont également été décrites [5].

2.3.2. Cystite hémorragique à BKPyV

Dans les suites d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), une virurie BKPyV est observée chez environ 40% des patients, mais l'incidence de la CH varie entre 5 et 22% des sujets selon les études [56,57]. Elle survient dans un délai médian de 40 jours post

allogreffe, et résulte à la fois de l'atteinte urothéliale directe causée par la réplication du BK virus, mais également de la réponse inflammatoire locale antivirale. La CH à BKPyV se manifeste par des signes fonctionnels urinaires irritatifs et/ou obstructifs, associés à une hématurie mineure (grade 1 ou 2) ou plus sévère (hématurie caillottante avec risque de rétention aiguë d'urines et/ou d'insuffisance rénale obstructive) [58]. Plusieurs facteurs de risque de développer une CH à BKPyV ont été identifiés parmi lesquels le type de greffe (non apparentée, sang de cordon), le conditionnement (myéloablatif, administration de cyclophosphamide et/ou de busulfan), ou encore la survenue d'une GVHD [59,60]. La CH est associée à une morbidité sévère (douleurs, nécessité de transfusions itératives, sondage vésical), et une durée accrue d'hospitalisation. [61]. En revanche, elle ne semble pas associée à un sur-risque de mortalité dans les études les plus récentes [62].

2.3.3. BK virus et pathologies oncologiques

Du fait de leur capacité d'altération du cycle cellulaire et d'inhibition des protéines suppresseurs de tumeur, les protéines LTAg et sTAg sont responsables des propriétés oncogéniques et de transformation cellulaire maligne du BKPyV largement démontrées in vitro et sur des modèles expérimentaux [9]. En revanche, le rôle du BKPyV dans le développement des cancers urothéliaux chez l'homme reste débattu [63]. En effet, les études épidémiologiques, et génétiques (détection de l'ADN du BKPyV dans les tissus tumoraux) ont mis en évidence pour certaines une association entre l'infection par le BKPyV et la survenue de cancers urothéliaux, mais avec des résultats parfois contradictoires et discordants.

Les données cliniques les plus solides en faveur du rôle oncogénique du BKPyV reposent sur une série de 20 cas de cancers urothéliaux diagnostiqués chez des patients transplantés rénaux avec un diagnostic de BKVN. Dans tous les cas, le diagnostic oncologique était posé plusieurs années après la greffe. Il s'agissait de tumeurs agressives, touchant le plus souvent la vessie (11/20), et dont l'analyse histologique retrouvait dans tous les cas un marquage SV40-TAg diffus et intense, sans effet cytopathique viral associé [64]. Plus récemment, des données de séquençage ont mis en évidence la capacité du BKPyV à s'intégrer dans le génome de la cellule hôte en cas de réplication persistante [65]. Par ce mécanisme, le BKPyV pourrait up-réguler l'expression de certains gènes favorisant secondairement le développement de tumeurs urothéliales. Sur la base de ces données, et en dépit de lien de causalité formellement démontré, l'OMS a classé le BKPyV (ainsi que le JCPyV) comme carcinogène « potentiel » [66].

3. Infection à BKPyV en transplantation rénale

Chez les patients transplantés rénaux, la BKVN est une des principales causes de dysfonction du greffon. Elle représente un problème clinique majeur, dont l'incidence a augmenté ces dernières années du fait de l'augmentation de l'activité de transplantation rénale, et de l'utilisation de nouveaux immunosuppresseurs tels que les inhibiteurs de calcineurine (CNI) ou le mycophénolate mofétil (MMF) [67]. Elle survient chez 1 à 10% des patients le plus souvent au cours des 12 premiers mois post-transplantation, mais peut parfois être diagnostiquée de nombreuses années après [68]. En cas greffe ABO-incompatible ou à haut risque immunologique, l'incidence de la BKVN peut être significativement augmentée, entre 18 et 20% [69,70].

3.1. Histoire naturelle de l'infection par le BKPyV chez les transplantés rénaux

Après transplantation rénale, sous l'influence des traitement immunosuppresseurs, 30 à 50% des patients présentent une réplication du BKPyV au niveau urinaire, dont la moitié une virurie persistante et/ou élevée (> 7 $\log_{10}$ copies/ml) (Figure 5). Dans ce cas, la cytologie urinaire peut identifier des cellules du tractus urinaire (« decoy cells »), témoins de l'effet cytopathogène du virus, caractérisées par la présence d'inclusions virales nucléaires. Il est également possible de détecter dans les urines des virions en microscopie électronique.

Parmi les transplantés rénaux, environ la moitié de ceux avec une virurie élevée (soit 10 à 20% de l'ensemble des patients) développent une virémie BKPyV dans un délai médian de 2 à 6 semaines [71] (Figure 5). Une virurie > 8 $\log_{10}$ copies/ml et/ou persistante constituent des facteurs de risque de progression vers la virémie [72,73]. L'évolution de la virémie est très hétérogène d'un patient à l'autre, allant de la clairance spontanée en absence de modification des traitements immunosuppresseurs (virémie transitoire), à une virémie persistante modérée (< 4 $\log_{10}$ copies/ml) ou élevée (> 4 $\log_{10}$ copies/ml).

Parmi les patients avec une virémie persistante, en absence d'intervention thérapeutique, une BKVN survient chez environ la moitié des sujets (soit 1 à 10% des transplantés rénaux) dans un délai médian de 2 mois [74,75] (Figure 5). Une virémie > 4 $\log_{10}$ copies/ml est un facteur prédictif d'évolution vers le BKVN [76]. Au stade de BKVN, l'évolution est le plus souvent très péjorative, avec 30 à 65% de perte du greffon, une proportion supérieure à celle observée en cas de dysfonction du greffon liée à la toxicité des CNI ou à un rejet aigu [77]. Enfin, même en

cas de négativation de la virémie BKPyV, 75% des greffons gardent des lésions de fibrose séquellaires [78].

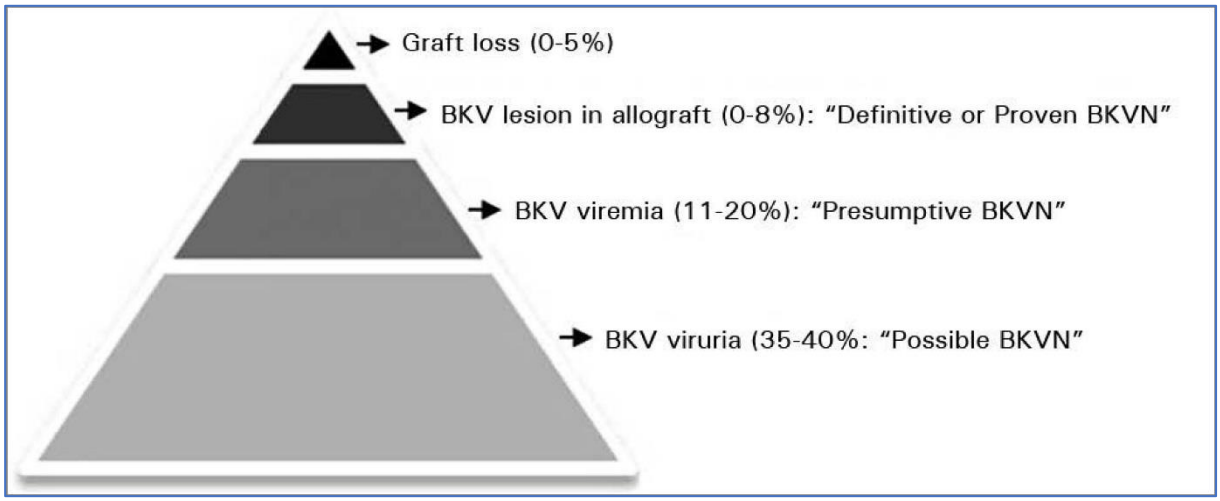


Figure 5. **Histoire naturelle de l'infection par le BKPyV après transplantation rénale** (tiré de Varella et al. [79])
Chez le transplanté rénal, la virurie est fréquente et concerne 30 à 50% des sujets. En cas de réplication élevée et/ou persistante, en absence de baisse des immunosuppresseurs, elle peut progresser vers la virémie BK, voire la BKVN chez 1 à 10% des sujets. Dans ce cas, une dysfonction du greffon est fréquente.

3.2. Facteurs de risque d'infection à BKPyV après transplantation rénale

De nombreuses études ont cherché à identifier les facteurs de risque d'infection à BKPyV chez les transplantés rénaux, avec des résultats parfois contradictoires en partie liés aux différences concernant les protocoles de monitoring, les seuils d'intervention thérapeutique et les modalités de prise en charge. Ces études sont hétérogènes à plusieurs niveaux (méthodologie, effectifs, critères d'évaluation de l'infection à BKPyV), ce qui rend leur interprétation et leur comparaison difficile. Dans une méta-analyse récente, 144 facteurs de risque distincts pour la virémie BKPyV, et 19 pour la BKVN ont été identifiés [80]. Ces facteurs de risque peuvent être séparés en plusieurs catégories (Figure 6).

3.2.1. Facteurs de risque liés au receveur

Certaines caractéristiques démographiques du receveur sont associées à un risque accru de virémie BKPyV chez le patient transplanté rénal : un âge élevé [81,82], le sexe masculin [82–84], une infection par le virus de l'hépatite C [85], ou encore l'origine ethnique même si les données concernant ce dernier facteur sont issues d'étude de faible niveau de preuve et

parfois contradictoires. Ainsi, dans une étude rétrospective, l'ethnie afro-américaine était retrouvée comme facteur protecteur vis-à-vis de la survenue d'une virurie et/ou d'une virémie BKPyV en post-greffe comparativement aux patients caucasiens (OR 0.38 [0.17-0.82], *p*=0.016) [86]. Inversement, deux autres études de plus grande ampleur retrouvaient au contraire l'ethnie afro-américaine comme un facteur de risque accru de virémie BKPyV [87], ou de BKVN [88]. Par ailleurs, une seule étude rétrospective retrouvait l'ethnie asiatique comme facteur de risque de virémie BKPyV en analyse multivariée (OR 4.36 [1.6-11.89], p=0.005) [89]. L'origine ethnique ne semble donc pas jouer un rôle déterminant, et les résultats observés dans les études citées précédemment sont avant tout liés à un biais de recrutement (effet centre). Cependant, des facteurs génétiques sous-jacents comme le polymorphisme HLA pourraient également jouer un rôle dans la prédisposition ou non à l'infection par le BKPyV. En effet, les receveurs porteurs de l'allèle HLA B51 semblent avoir un risque moindre d'infection à BKPyV, qui pourrait s'expliquer par une meilleure présentation des antigènes viraux [90]. Inversement, la compatibilité des allèles HLA A24 et B55 a été retrouvée comme associée à un sur-risque de virémie BKPyV [84]. Outre les allèles HLA, le polymorphisme de certains gènes impliqués dans la réponse interféron-gamma semblent également associé à la survenue d'une réplication BKPyV chez le receveur [91].

Sur le plan immunologique, une sérologie CMV positive chez le receveur et négative chez le donneur étaient associées en analyse multivariée à un risque accru de virémie BKPyV dans une étude rétrospective monocentrique ayant inclus 352 patients transplantés rénaux dont 48 ont développé une virémie BKPyV et 22 une BKVN [92]. Enfin, le statut sérologique du receveur vis-à-vis du BKPyV pourrait également avoir un impact significatif (cf. 5.2.3.).

3.2.2. Facteurs de risque liés au donneur

De même que chez le receveur, un âge élevé ou le sexe (féminin dans ce cas) ont été associés à un surrisque d'infection par le BKPyV. De plus, plusieurs études ont retrouvé un risque de virémie BKPyV majoré en cas de transplantation d'un rein issu d'un donneur décédé [84,89].

Mais ce sont les déterminants immunologiques et génétiques du donneur qui semblent avoir le plus d'impact sur le risque de réplication à BKPyV en post-greffe. Ainsi, dans une large étude rétrospective, un titre élevé d'anticorps anti-BKPyV chez le donneur était associée à un risque significativement augmenté de virémie et de BKVN chez le receveur en post-greffe (cf. 5.2.3.) [93]. De plus, dans une étude prospective menée chez 198 transplantés rénaux, parmi les onze patients ayant présenté une virémie BKPyV persistante, tous avaient un greffon provenant de

donneurs HLA C7 négatifs [94]. La négativité de l'allèle du HLA-C chez le donneur (et le receveur), qui joue un rôle de dans le recrutement des cellules NK, semble donc associé à un sur-risque d'infection à BKPyV en post-greffe [95].

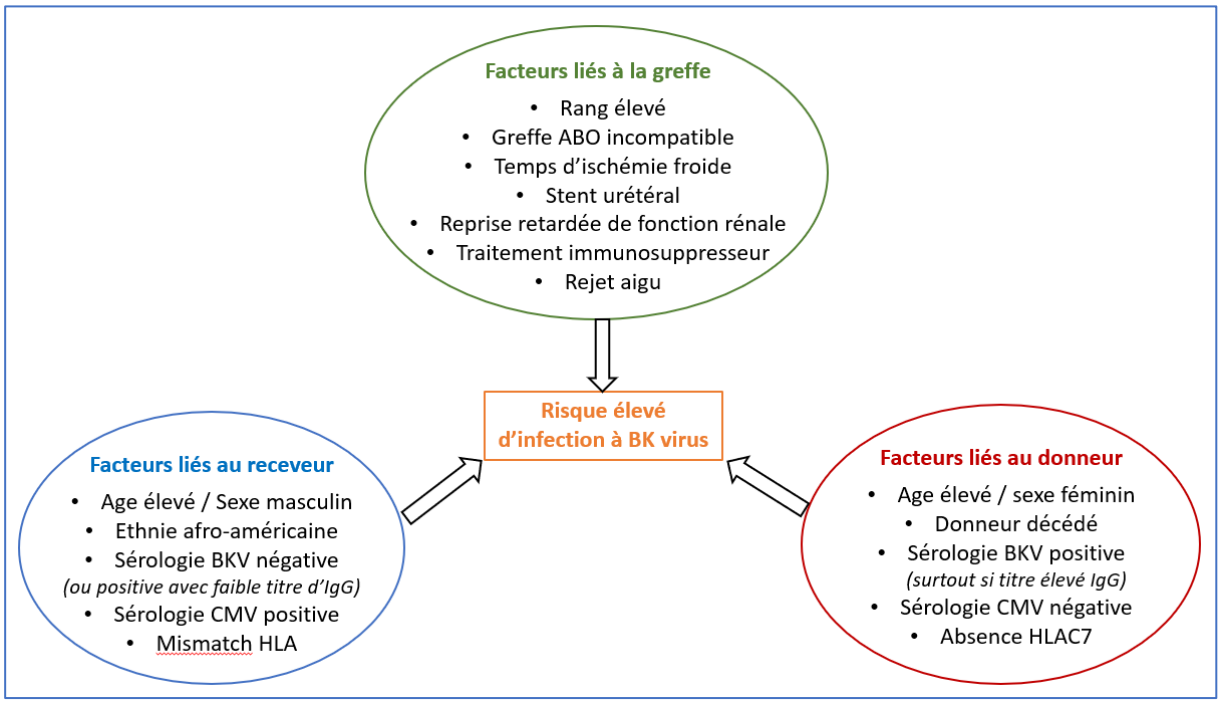


Figure 6. **Facteurs de risque d'infection par le BKPyV après transplantation rénale** (adapté de la revue d'Ambalathingal et al. [4])

Les facteurs de risque décrits ci-dessus sont associés aux caractéristiques démographiques et au statut immunologique du donneur et de receveur, et au profil de la transplantation. Selon les études, ils ont été associés à un risque accru de virurie et/ou de virémie et/ou de BKVN.

3.2.3. Facteurs de risque liés à la transplantation

Le régime d'immunosuppression constitue le facteur de risque principal d'infection à BKPyV en post-greffe, et celui le mieux documenté dans la littérature. Parmi les traitements d'induction, l'utilisation d'anticorps déplétants tels que les anti-thymoglobuline (ATG) est associée à un risque accru de développer une virémie BKPyV prolongée et/ou une BKVN comparativement aux anticorps monoclonaux anti-CD25 comme le basiliximab (SIMULECT) qui cible la chaine α du récepteur de l'IL-2 à la surface des lymphocytes T (LT) [96]. Concernant l'alentuzumab (anti-CD52), en dépit de son effet LT-déplétif prolongé (jusqu'à 5 ans post-greffe), les résultats des études sur le risque d'infection à BKPyV sont contradictoires. La plus large étude sur le sujet ayant inclus 666 transplantés rénaux avec induction par anti-CD25 retrouvait une incidence de virurie (37%), de virémie (12%) et de néphropathie à BKPyV (4.7%) similaires à celles observées dans la plupart des centres n'utilisant pas les anti-CD25 [88].

Concernant les traitements immunosuppresseurs d'entretien, plusieurs études ont démontré que le tacrolimus est associé à un risque accru de virémie BKPyV, en particulier l'essai randomisé contrôlé prospectif DIRECT (incidence de 16% dans le groupe tacrolimus versus 11% dans le groupe ciclosporine, le reste des traitements immunosuppresseurs étant identique par ailleurs) [97]. La corticothérapie a également été incriminée comme facteur de risque indépendant de virémie à BKPyV [71,74] et/ou de BKVN [98]. A l'inverse, les patients bénéficiant d'un traitement par inhibiteur de mTOR (mTORi : sirolimus ou everolimus) semblent avoir un risque moindre de virémie BKPyV et de BKVN [99,100]. Ceci pourrait s'expliquer par l'action antivirale directe des mTORi qui inhibent l'expression de LTAg *in vitro* [101], mais également par l' épargne en CNI associée [102]. Au total, dans la méta-analyse de Demey et al., seul un traitement d'entretien par tacrolimus était retrouvé comme facteur de risque de virémie BKPyV en analyse multivariée [80]. La combinaison tacrolimus / MMF / corticoïdes mycophénolate semble quant à elle plus vectrice de virémie BKPyV, comparativement aux autres régimes d'immunosuppression [103,104].

Mis à part l'immunosuppression qui est le facteur de risque le mieux documenté, d'autres facteurs de risque de virémie BKPyV en lien avec les caractéristiques de la transplantation existent, à savoir : un rang élevé de greffe [92], une greffe ABO incompatible [69], un temps d'ischémie froide allongé [105], une reprise retardée de la fonction rénale [106], ou encore la mise en place d'une sonde double J (ou stent urétéral) en post-greffe. Ce dernier est l'un des facteurs de risque d'infection à BKPyV le mieux établi. En effet, de très nombreuses études (y compris chez les sujets pédiatriques) ont documenté la mise en place d'un stent urétéral comme un facteur de risque de virémie BKPyV, avec un risque relatif variant de 1,36 à 3 selon les cas [87,107–109]. Le mécanisme physiopathologique expliquant cette association n'est pas clairement élucidé, mais la pose de stent urétéral pourrait agir comme trigger lésionnel au niveau de l'urothélium, le BKPyV se réactivant ensuite sous l'effet des traitements immunosuppresseurs (« two hit hypothesis ») (cf. 3.3.2.). Enfin, la survenue d'un rejet aigu est également associée à un risque accru d'infection à BKPyV [88,92,96], principalement du fait d'une majoration de l'immunosuppression pouvant favoriser la réplication virale. L'inflammation créée par le rejet pourrait également créer un environnement favorable à la réplication virale.

3.3. Physiopathologie de la BKVN

3.3.1. Mode de transmission du BKPyV au cours de la transplantation rénale

Du fait de la persistance du BKPyV dans les cellules uro-épithéliales, une hypothèse largement développée dans la littérature est que le greffon pourrait constituer une source d'infection, et la voie de transmission principale du BKPyV du donneur vers le receveur lors de la transplantation rénale.

Cette hypothèse est étayée par les données épidémiologiques, la BKVN étant une complication qui se présente quasi-exclusivement chez les patients transplantés rénaux. Seuls quelques cas ont été décrits chez les autres TOS [110,111], même si la prévalence de l'infection à BKV dans cette population est probablement largement sous-estimée [112,113]. L'immunodépression post-greffe ne peut donc à elle seule expliquer la survenue quasi-exclusive de la BKVN chez les greffés rénaux, qui ont le plus souvent un degré d'immunosuppression moins important que les autres TOS.

De plus, les données sérologiques vont également dans le sens d'une possible transmission du BKPyV par le greffon. Plusieurs études ont mis en évidence une association entre une sérologie BKPyV positive chez le donneur et/ou négative chez le receveur, et la survenue d'une infection à BKPyV en post-greffe [93,114] (cf. 5.2.3.). Ainsi, un titre élevé d'anticorps anti-BKPyV chez le donneur serait le reflet d'une charge virale importante dans le greffon.

Enfin, des arguments virologiques directs plaident également en faveur de cette hypothèse. L'étude de la prévalence de l'infection à BKPyV dans des couples donneurs vivants / receveurs retrouvait un risque accru de d'infection chez le receveur en cas de virurie pré-greffe chez le donneur [115–117]. De plus, l'analyse comparative des souches de BKPyV détectées dans les urines des donneurs vivants en pré-greffe et des receveurs en post-greffe, retrouvait des souches le plus souvent identiques [116,118]. Cependant, les résultats de ces études étaient basés uniquement sur la comparaison de courtes séquences de la région NCCR ou du gène codant pour VP1 en PCR ou séquençage Sanger. En particulier, aucune d'entre elles n'avait comparé les séquences des génomes complets.

3.3.2. Développement de la BKVN : « Two-hit hypothesis »

Deux éléments semblent essentiels au développement de la BKVN : des facteurs locaux permettant l'initiation de la réplication virale, et l'immunosuppression favorisant la persistance de la réplication.

La réplication du BKPyV survient le plus souvent précocement après la greffe, à un moment où les lésions tubulaires induites par la chirurgie, l'ischémie / reperfusion, ou la pose de stent urétéral sont importantes. Ces lésions pourraient faciliter la réactivation du BKPyV latent, comme cela a pu être démontré dans des modèles murins, où des lésions rénales traumatiques ou chimio-induites favorisent la réplication du BKPyV en absence même d'immunosuppresseurs [119]. De plus, en post-greffe immédiat, l'expression abondante de cytokines pro-inflammatoires (TGF-β, TNF-α) est susceptible d'activer directement l'initiation de la transcription au niveau de la région NCCR [120]. Au total, l'ensemble de ces éléments constituent un microenvironnement propice à la réactivation virale, pouvant expliquer la vulnérabilité particulière des patients greffés rénaux à l'infection à BKPyV [121].

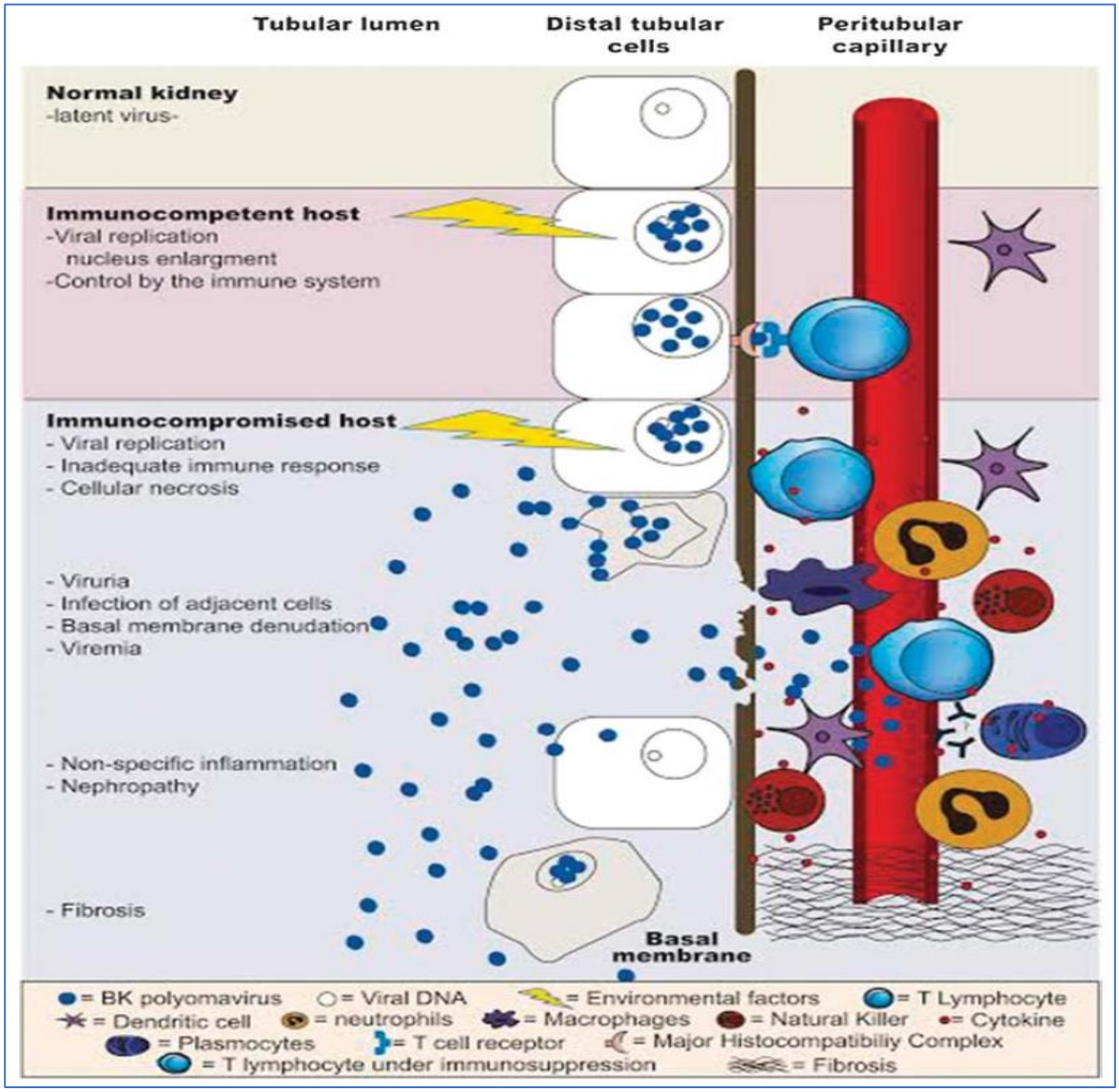


Figure 7. **Physiopathologie de la néphropathie à BKPyV après transplantation rénale.**
Les principales étapes de la latence du BKPyV dans l'urothélium (en haut), au développement de la BKVN avec inflammation et fibrose (en bas) sont décrites (tiré de Lamarche et al. [121])

Suite à l'initiation de la réactivation virale, l'immunosuppression induite par les traitements anti-rejets favorise la persistance de la réplication, et son évolution potentielle vers la néphropathie. Le virus se réplique initialement dans les cellules épithéliales tubulaires distales, aboutissant à leur nécrose et une inflammation locale. La dissémination secondaire des particules virales conduit à l'infection des cellules adjacentes, et à l'apparition de la virurie. La persistance de la réplication virale engendre la mise à nu de la membrane basale, permettant aux virions d'atteindre les capillaires péritubulaires, résultant ainsi en une virémie. Il s'ensuit un recrutement des cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes T et cellules NK) expliquant les lésions histologiques d'inflammation et de fibrose (Figure 7).

3.3.3. Diagnostic de la BKVN

La BKVN est une néphropathie tubulo-interstitielle, dont le diagnostic anatomopathologique est avéré sur la présence en microscopie optique: 1) d'inclusions virales nucléaires correspondant à l'accumulation de particules virales ; 2) de lésions résultant de l'effet cytopathique viral, associant à un degré variable : nécrose cellulaire, infiltrat interstitiel inflammatoire constitué de cellules mononucléées (lymphocytes, plasmocytes, polynucléaires neutrophiles [PNN]), et atrophie tubulaire et fibrose interstitielle dans les formes évoluées [122]. Le diagnostic histologique doit impérativement être confirmé par IHC avec marquage de l'antigène grand T du PyV simien 40 (SV40 LTAg). L'intensité du marquage SV40 LTAg est inversement proportionnel à l'étendue des lésions d'atrophie tubulaire, reflétant l'histoire naturelle de la BKVN. Les lésions périphériques ou précoces ont un marquage intense (Figure 8A1 et A2) contrairement aux lésions cicatricielles où la réplication virale est moins intense, mais où prédominent la fibrose (Figure 8C1 et C2) [123].

Il existe deux classifications histologiques principales de la BKVN : celle de l'ATS (American Transplantation Society) actualisée en 2019 [124], et celle du groupe de travail de Banff élaborée en 2018 à partir de la plus grande cohorte de patients avec une néphropathie prouvée histologiquement [125]. La classification de Banff définit des stades de pronostic péjoratif croissant, sur la base de deux critères histologiques (score pvl [« polyomavirus load level »] et degré de fibrose interstitielle). Ces deux critères histologiques et les 3 classes de néphropathie qui en découlent sont les mieux corrélés à l'évolution clinique de la BKVN (fonction rénale au cours des 2 ans suivants le diagnostic, perte de fonction du greffon).

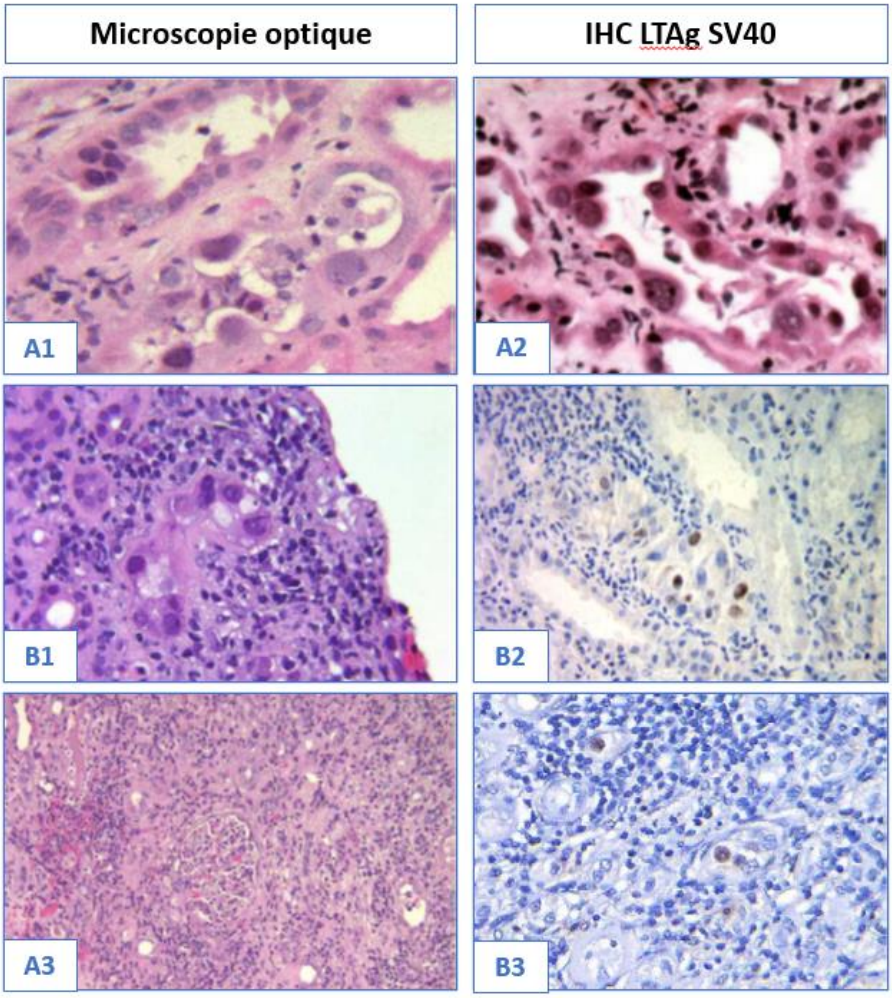


Figure 8**. Histologie des lésions de BKVN** (adapté de Drachenberg et al. [122])
Les stades histologiques correspondant aux classifications de l'ATS 2019 et Banff 2018 (A, B et C) sont présentés de haut en bas en microscopie optique (colonne 1) et IHC anti-SV40 LTAg (colonne 2), et correspondent à l'histoire naturelle de la néphropathie à BK virus.

Les lésions de BKVN prédominent dans la médullaire, mais peuvent toucher également la corticale. Les tubules collecteurs et distaux sont le plus fréquemment atteints [102,123]. Des lésions glomérulaires peuvent également être observées (en particulier au niveau de la capsule de Bowman) [126], l'atteinte glomérulaire étant un marqueur pronostique péjoratif [127]. Les lésions de néphropathie sont multifocales, du fait de la distribution aléatoire de l'ADN du BKPyV latent dans le tissu rénal. De ce fait, il existe un risque de faux-négatif lors de la biopsie diagnostique notamment à la phase précoce, compris entre 10 et 36% [123]. Il est donc recommandé de prélever deux carottes lors de la ponction biopsie rénale (PBR) (contenant préférentiellement du tissu médullaire) et d'analyser le bloc en totalité [74]. Du fait du risque de faux négatifs lors de la PBR (jusqu'à 30%), la détection de l'ADN du BKPyV dans le tissu rénal pourrait permettre d'améliorer le rendement diagnostique. Cependant, la quantification de l'ADN viral du BKPyV dans le parenchyme rénal n'est pas utilisée en routine.

3.3.4. *Recommandations de suivi post-greffe de l'infection à BK virus*

Actuellement, les recommandations préconisent en 1ère intention le suivi de la PCR BKPyV plasmatique pour le diagnostic précoce de l'infection par le BKPyV, et donc de la BKVN. En effet, ce paramètre est le mieux corrélé à l'histoire naturelle de l'infection par le BKPyV, et permet d'identifier au moins 90% des patients à risque de BKVN, avant la dégradation de la fonction rénale [124].

		Clinical diagnosis of PyVAN			
Specimen	**Marker (test, *comments*)**	**Possible**	**Probable**	**Presumptive**	**Proven**
Urine	"High-level viruria"	+	+	+	+
	Decoy cells *(check if inflammation and/or casts)*				
	BKPyV urine DNA load > 7 $\log_{10}$ copies/mL				
	BKPyV *VP1* mRNA load > 6.5 $\log_{10}$ copies/ ngRNA				
	PyV particles *(check if in clusters or "haufen")*				
Plasma	"BKPyV-DNAemia"	–	+	+	+
	Plasma load > 3 $\log_{10}$ copies/mL *(sustained in 2 measurements in < 3 weeks)*		+		
	Plasma load > 4 $\log_{10}$ copies/mL *(increased in 1 of 2 measurements in <3 weeks)*			+	
Biopsy	Polyomavirus-associated nephropathy	–	–	–	+
	Viral cytopathic changes				[a]
	Inflammatory infiltrates/ tubulitis				[a]
	More than mild interstitial fibrosis/tubular atrophy				[a]
Treatment	Recommendation[b]	No	(Yes)	Yes	Yes

Figure 9. **Recommandations de l'ATS 2019 concernant le screening, le diagnostic et le traitement de l'infection à BKPyV chez les transplantés rénaux** (tiré de Hirsch et al. [124]).

Les dernières recommandations de l'ATS 2019 préconisent un suivi de la PCR BKPyV plasmatique tous les mois les 9 premiers mois post-greffe, puis tous les 3 mois jusqu'à 2 ans. Une PCR BKPyV > 4 $\log_{10}$ copies/ml dans le plasma doit faire évoquer le diagnostic « présomptif » de BKVN, et justifier une baisse du traitement immunosuppresseur, sans nécessité d'effectuer un diagnostic histologique de certitude (Figure 9).

3.3.5. Prise en charge thérapeutique de l'infection à BKPyV après greffe rénale

A ce jour, la seule stratégie thérapeutique validée pour la prise en charge de la réplication à BKPyV après transplantation rénale est la baisse de l'immunosuppression [124]. Cette recommandation est basée sur les données d'une métanalyse de grande ampleur [128], ainsi que sur les résultats de plusieurs essais prospectifs observationnels [108,129,130]. Ces derniers rapportaient une clairance de la virémie dans 60 à 100% des cas après baisse de l'immunosuppression, dans un délai médian de 2 à 8 mois Cependant, le pourcentage de clairance de la virémie est variable, et est moindre chez les patients avec un âge élevé et/ou avec des lésions histologiques prouvées de BKVN. Afin de prédire les patients susceptibles de répondre ou non à la minimisation de l'immunosuppression, l'utilisation de marqueurs immunologiques pourrait s'avérer utile (cf. 5.3.).

Il n'existe pas de consensus quant à la stratégie de minimisation des traitements immunosuppresseurs, et les pratiques varient d'un centre à l'autre. De manière générale, les étapes suivantes (et leurs combinaisons) ont été proposées : 1) diminution de posologie des corticoïdes (jusqu'à 10 voire 5mg/jour) ; 2) réduction de 50% de la posologie quotidienne des antimétabolites (MMF) ; 3) diminution de 25 à 50% de la posologie quotidienne des CNI en une ou deux étapes (objectifs de résiduel de tacrolimus < 6 ng/ml et T2 de ciclosporinémie < 150 ng/ml). En cas de persistance de la virémie, on peut proposer un switch du MMF pour l'azathioprine (voire un arrêt des antimétabolites), et/ou un switch du tacrolimus pour la ciclosporine (ou un relais par mTORi [131]).

Mis à part la baisse des immunosuppresseurs, aucun traitement adjuvant n'a fait la preuve de son efficacité dans des essais thérapeutiques randomisés contrôlés. Parmi les traitements pouvant un avoir un bénéfice potentiel, on peut citer les immunoglobulines intra-veineuses (IgIV) [132], le léflunomide [133], ou le cidofovir [134]. Cependant, les données d'efficacité concernant ces traitements sont issues d'études de faible niveau de preuve, avec de petits effectifs, et pour lesquels une modification des immunosuppresseurs était systématiquement effectuée de manière concomitante. Une alternative thérapeutique prometteuse pourrait être le transfert adoptif de LT anti- BKPyV. La thérapie cellulaire anti- BKPyV a déjà fait la preuve de son efficacité chez les patients allogreffés de CSH, permettant dans une série récente de 14 cas de CH à BKPyV la résolution complète des symptômes chez 13 d'entre eux [135]. Après transplantation rénale, l'équipe de Lamarche et al. a mis en évidence la possibilité d'amplifier des LT anti-BKPyV chez patients greffés après stimulation des PBMC par des

peptides viraux [136]. Cependant, l'efficacité clinique associée à la réinjection de ces LT anti-BKPyV en cas d'infection documentée à BKPyV reste à démontrer.

3.3.6. Prévention de l'infection à BKPyV après greffe rénale

En absence de d'antiviral direct actuellement disponible, et du fait du risque de rejet associé à la baisse de l'immunosuppression, la meilleure stratégie de prise en charge de l'infection par le BKPyV reste la prévention. A ce titre, l'administration précoce d'IgIV pourrait s'avérer bénéfique dans réduction de l'incidence de la virémie BKPyV, en augmentant le titre d'anticorps neutralisants (AcN) vis-à-vis du BKPyV [137].

De plus, l'analyse immunologique exhaustive du répertoire lymphocytaire B anti-BKPyV de sujets sains, a mis en évidence la présence d'anticorps cross-neutralisants capables de bloquer l'infection par plusieurs génotypes de BKPyV (ainsi que d'autres PyV), en se liant à des épitopes viraux conservés [138]. Le clonage et l'amplification de ces clones B pourrait permettre le développement d'anticorps neutralisants pan-génotypiques spécifiques du BKPyV.

Enfin, dans des modèles murins, l'administration de vaccins constitués de VLPs anti-BKPyV induisaient des réponses humorales fortes contre différents génotypes de BKPyV [139]. Des approches immuno-informatiques, sur la base de la sélection d'épitopes du BKPyV capables d'induire des réponses T-spécifiques intenses, ont également démontré la possibilité de mise au point d'un vaccin thérapeutique universel vis-à-vis du BKPyV. L'ensemble de ces données expérimentales nécessite cependant d'être validées *in vivo*, et à ce jour, aucun essai thérapeutique en cours sur la vaccination anti-BKPyV n'existe.

4. BKPyV et diversité génétique

4.1. Principaux génotypes de BKPyV

Il existe 4 principaux génotypes et de nombreux sous-types de BKPyV [4]. Le génotype I est largement prédominant dans la population générale (46 à 82% des cas), suivi du génotype IV (12 à 54% des cas) retrouvé principalement en Asie du Sud Est. Les génotypes II et III infectent quant à eux une minorité d'individus, même si des études récentes ont retrouvé jusqu'à 20% de souches de BKPyV-II chez les patients greffés rénaux avec une virémie BKPyV [140]. Chacun des deux génotypes principaux est subdivisé en plusieurs sous-groupes (Ia, Ib1, Ib2 et Ic pour

le génotype I ; IVa1, IVa2, IVb1, IVb2, IVc1 et IVc2 pour le génotype IV) [141]. La distribution géographique des différents sous types de BKPyV a été étudiée de manière exhaustive [141,142] (Figure 10). Une des hypothèses expliquant la répartition géographique actuelle des différents génotypes est celle d'une co-migration du virus avec les populations humaines [143,144].

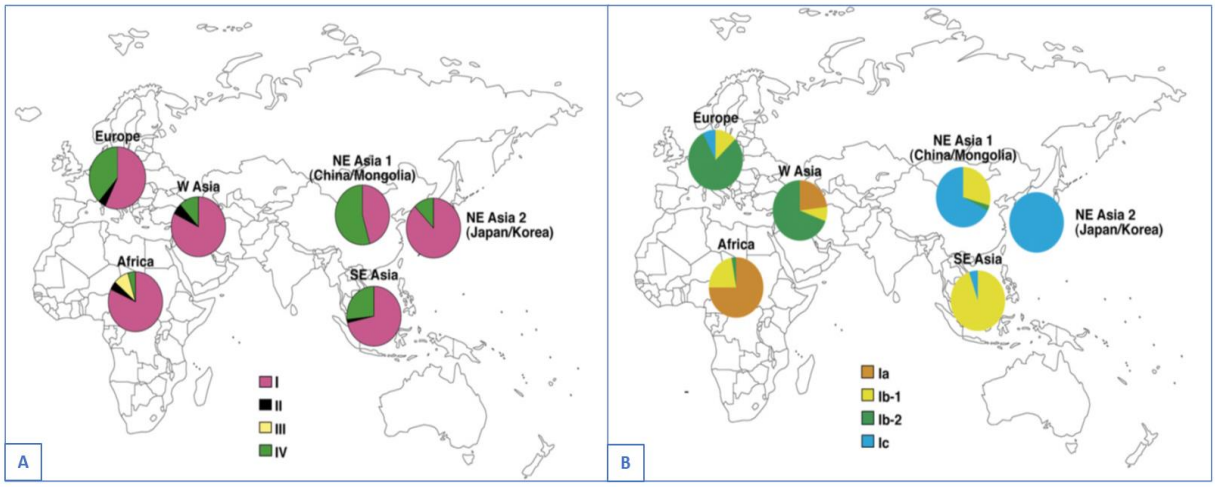


Figure 10. **Distribution géographique des principaux sous-types de BKPyV en Europe, en Afrique et en Asie** (tiré de Zheng et al. [144])

Les proportions des 4 principaux génotypes de BK virus (**A**), et des 4 sous-types de BKPyV-I (**B**) dans les différentes régions géographiques sont représentées dans les diagrammes colorés.

Cette classification génotypique est basée sur le séquençage d'une région de 387 paires de bases (pb) du gène codant pour la protéine de capside VP1 (long de 1089 pb au total), et correspondant aux nucléotides 1630-1956 de la souche de référence Dunlop [145]. Plus récemment, l'analyse comparative des 199 séquences de VP1 référencées dans GenBank a permis d'identifier une région de 100 pb (nucléotides 1977 à 2076) regroupant une majorité de « hotspots » mutationnels et de SNP (single nucleotide polymorphism) informatifs. Le séquençage de cette région appelée « BKTGR » (BK virus Typing and Grouping Region), pourrait donc suffire à identifier de manière plus rapide et simple le sous-type d'une souche donnée de B BKPyV KV [146]. L'algorithme mis en place ne permet cependant pas de distinguer les génotypes IVb1 et IVb2, ni d'étudier de manière précise des virus recombinants et des populations virales très diverses.

Des études sérologiques basées sur l'utilisation de tests ELISA ont montré que les quatre principaux génotypes de BKPyV constituent des sérotypes distincts [147]. Cependant, l'utilisation de tests de neutralisation à l'aide de VLP spécifiques des différents sous-types, ont

également démontré que le BKPyV-Ia/Ib1 et le BKPyV-Ib2, constituent également des sérotypes différents [139].

Cette classification historique est aujourd'hui remise en cause par des données plus récentes issues d'analyses de séquençage « whole genome » (WGS) des souches de BKPyV. En particulier, il n'existe que de minimes différences entre les génotypes II et III ; ces derniers pourraient donc correspondre à deux sous-types d'un même génotype [148]. Les données de WGS ont également mis en évidence un taux de substitution élevé du BKPyV, plus proche de celui des virus à ARN (10^{-4} substitution/site/year) que des taux classiquement décrits pour les virus à ADN double brin (10^{-8} s/s/y) [148]. Cette variabilité s'observe à la fois dans les séquences codantes et non codantes.

4.2. Variabilité de la région non codante

Le polymorphisme de la région NCCR a été mis en évidence il y a plusieurs années *in vitro*. Par la suite, des études *in vivo* ont montré que différents variants viraux de la région NCCR (archétype et réarrangées) peuvent coexister chez un patient dans un même type cellulaire et/ou dans différents tissus [149].

Le séquençage par PCR de la région NCCR de prélèvements plasmatiques ou urinaires BKPyV-positifs a permis de retrouver la présence de souches réarrangées parfois en grande abondance, en particulier chez des patients greffés rénaux avec une charge virale élevée et/ou une BKVN prouvée [150]. En particulier, dans une étude rétrospective ayant séquencé 286 échantillons d'urines et de plasmas issus de 129 transplantés rénaux, la présence des souches rr-NCCR était plus fréquente dans le plasma comparativement aux urines, et était associée à une réplication virale significativement augmentée [151]. De manière intéressante, les souches rr-NCCR isolées *in vivo* chez les greffés rénaux, sont associées à une capacité réplicative augmentée *in vitro* (expression accrue des gènes de la région codante précoce, effet cytopathogène plus important) [151,152]. Ces résultats obtenus avec des techniques de PCR quantitative ont été confirmés par des données plus récentes de séquençage haut débit. Le séquençage profond d'un fragment de la région TCR (319 pb) chez 15 patients transplantés rénaux avec infection par le BKPyV, retrouvait la présence de réarrangements chez la quasi-totalité des patients dans le sang et/ou les urines [153]. De plus, les souches réarrangées étaient plus fréquemment isolées chez les patients avec une virémie élevée, en particulier chez ceux avec une BKVN prouvée histologiquement [153,154].

La présence de réarrangements dans la région NCCR pourrait être un facteur favorisant de survenue de la BKVN, mais pas forcément nécessaire. En effet, la présence de mutations et/ou de recombinaisons de la région NCCR n'est pas systématiquement observée chez les patients avec une réplication BKPyV, et ont également été identifiées chez sujets sans néphropathie. De plus, les modifications de séquence dans les souches rr-NCCR sont parfois associées à une diminution du nombre de sites de liaison des facteurs de transcription, ce qui est davantage censé diminuer la capacité réplicative du virus [153].

4.3. Variabilité de la région codante

La plupart des données relatives à la variabilité génétique des séquences codantes du BKPyV concernent le gène de la protéine de capside VP1, et plus particulièrement la séquence des nucléotides 1744 à 1812 (correspondant aux acides aminés 60 à 83) définis par Jin et al. en 1993 pour la classification génotypique [155]. En effet, la séquence de VP1 présente une grande homologie de séquence entre les différents génotypes (> 95%), mais seuls 61 à 70% des acides aminés des résidus 61E à 83R sont identiques [2] (Figure 11).



Figure 11. **Diversité des épitopes dans la boucle BC de la protéine de capside VP1 (acides aminés 60 à 83).**
La séquence des acides aminés 60 à 83 est présentée pour les 4 principaux génotypes. Les sites de polymorphisme sont représentés avec les différents AA possibles dont la taille est proportionnelle à la fréquence au sein du génotype. La séquence consensus est indiquée au-dessus. Ces données ont été obtenues à partir de 210 séquences pour BKPyV-I, 4 pour BKPyV-II, 8 pour BKPyV-III et 78 pour BKPyV-IV, toutes issues de GeneBank.

L'étude anatomopathologique et virologique de prélèvements issus de patients greffés rénaux a mis en évidence une variabilité génétique *in vivo* de la séquence codant pour la protéine de capside VP1. Ainsi, l'amplification d'un fragment de 94 pb de VP1 sur 49 PBR issues de 24 patients transplantés rénaux avec diagnostic de BKVN, retrouvait une variabilité génétique interindividuelle importante (28 « hotspots » mutationnels) [156]. Dans cette même étude, chez les 11 patients ayant eu plusieurs prélèvements, il était constaté des modifications nucléotidiques sur les biopsies séquentielles, suggérant une évolutivité virale (sous réserve d'artefacts techniques). Ces résultats confirmaient ceux d'une première étude anatomopathologique ayant mis en évidence des variations génomiques dans la séquence de VP1 sur des biopsies rénales de transplantés rénaux avec néphropathie interstitielle par rapport à des séquences de référence publiées antérieurement [157].

Plus récemment, d'autres études ont mis en évidence une variabilité dans la séquence de VP1 plus importante chez les patients transplantés rénaux avec BKVN par rapport à des sujets contrôle, et ce dans tous les compartiments biologiques (urines / plasma / parenchyme rénal) [158]. Enfin, avec le séquençage complet de VP1 de 558 clones de BKPyV issus des prélèvements de 25 patients (dont 18 transplantés rénaux et 7 contrôles), Luo et al. retrouvaient la présence de « quasi-espèces » chez tous les sujets (12 en moyenne) [159]. Le taux de substitution était maximal chez les transplantés rénaux avec virémie (par rapport aux autres groupes), et dans la boucle BC (par rapport aux autres régions de VP1). Cette région correspond donc à une zone fonctionnelle importante (interaction avec récepteurs) qui est la seule soumise à une pression de sélection évolutive.

Les données concernant la variabilité des autres séquences codantes du génome du BKPyV sont peu nombreuses. Le séquençage complet du génome du BKPyV par PCR de 15 souches de BKPyV issues notamment d'un patient immunodéprimé avec une vasculopathie BKV, a révélé la présence de mutations dans les séquences codantes de LTAg et Agno avec une distribution aléatoire [160]. Certaines d'entre elles étaient localisées dans les sites de liaison à l'ADN (pour LTAg), ou les sites de phosphorylation de la protéine Agno, pouvant avoir des conséquences fonctionnelles importantes. Cependant, aucune étude n'a à ce jour étudié l'impact de telles mutations sur le cycle de réplication viral [16].

Si les données des études précédemment citées suggèrent un lien potentiel entre la diversité virale du BKPyV et sa pathogénicité, elles sont limitées par les techniques d'analyse, ne se basant que sur la comparaison de courtes séquences génétiques pour analyser les variations génomiques. A ce jour, seules 4 études ont évalué la diversité virale du BKPyV avec des

techniques de séquençage génome complet (WGS) [148,161–163]. En particulier, dans une étude récente menée chez deux transplantés rénaux ayant développé une BKVN, l'analyse d'échantillons urinaires et plasmatiques en WGS, retrouvait la présence de plusieurs variants, avec des mutations sur l'ensemble du génome (y compris en dehors de VP1), compatibles le plus souvent avec la signature du facteur de restriction cellulaire APOBEC3B [163]. Dans une autre étude menée par l'équipe de virologie du CHRU de Strasbourg, le séquençage profond complet (NGS) du génome du BK BKPyV V extrait de 225 échantillons positifs chez 96 patients transplantés rénaux a confirmé la variabilité génétique importante du BKPyV pour l'ensemble des gènes, en particulier dans les épitopes HLA-C [148].

5. BKPyV : aspects immunologiques

5.1. Immunité innée

Les cellules de l'immunité innée jouent un rôle dans la physiopathologie de la BKVN de manière directe (lyse des cellules infectées), ou indirecte (présentation des antigènes viraux et activation des LT).

En particulier, les cellules NK sont des effecteurs importants de la réponse immunitaire innée antivirale, dont la fonction est régulée par un système complexe de récepteurs membranaires, dont les KIRs (Killer-cell immunoglobulin-like receptor) [164]. Dans une étude rétrospective ayant inclus 48 greffés rénaux avec une infection sévère à BKPyV, l'analyse génotypique des régions télomériques (riches en KIR) retrouvait une fréquence significativement plus basse de récepteurs activateurs des cellules NK (notamment KIR3DS1), comparativement à 110 transplantés n'ayant pas développé d'infection par le BKPyV [165]. De plus, l'absence de l'HLA-C7 chez les transplantés rénaux est associé à un risque accru de virémie à BKPyV [94]. Cet allèle HLA-C7 joue un rôle dans le recrutement des cellules NK au cours de l'infection par le VHC [166], et pourrait donc également constituer un facteur de prédisposition génétique à l'infection par le BKPyV en lien avec la réponse cellulaire NK.

Par ailleurs, les travaux de l'équipe Womer et al. suggèrent un rôle des cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDC) dans le contrôle de l'infection par le BKPyV chez les transplantés rénaux. Les pDC sont un contingent de cellules dendritiques périphériques qui expriment de manière abondante à leur surface le CMH-I et des molécules co-stimulatrices. A ce titre, elles jouent

donc un rôle majeur dans l'activation des lymphocytes T-cytotoxiques en réponse à une infection virale, en sécrétant notamment de grandes quantités d'IFN de type I (réponse Th2) [167]. Dans une première étude, cette équipe a démontré que le taux de pDC était significativement réduit chez les patients transplantés rénaux avec une BKVN, comparativement à des sujets contrôles avec une fonction rénale normale [168,169]. Dans une seconde étude, l'analyse d'échantillons pré-greffe retrouvait chez les patients transplantés développant une virémie BKPyV un taux de pDC significativement plus bas comparativement à des sujets sans infection par le BKPyV en post-transplantation [169]. Un déficit en pDC en amont de la transplantation pourrait donc constituer un facteur de risque de réplication à BKPyV en post-greffe, et constituer un outil supplémentaire dans la stratification du risque de virémie BKPyV.

Enfin, plus récemment, certains polymorphismes nucléotidiques dans 3 gènes impliqués dans l'immunité antivirale (*TLR3*, *IL10* et *CD209*) ont été retrouvés comme associés à une susceptibilité plus ou moins importante vis-à-vis de l'infection par le BKPyV après transplantation rénale [170].

5.2. Immunité humorale

5.2.1. Tests de détection des anticorps anti-BKPyV

Plusieurs techniques permettent d'étudier la réponse humorale anti-BKPyV, à savoir les tests d'hémagglutination (HAI), les ELISAs (enzyme-like immunosorbent assay), et les tests de neutralisation (Figure 12). Quel que soit le type de test utilisé, il repose le plus souvent sur la détection des anticorps dirigés contre la protéine de capside majeure VP1. En effet, VP1 est la protéine immunodominante du BKPyV, et induit des réponses anticorps fortes, stables et prolongées au cours de l'infection par le BKV. A l'inverse, les réponses anticorps contre les protéines LTag ou Agno sont moindres, probablement du fait d'une moins bonne accessibilité et/ou immunogénicité [11,171]. Bien qu'il y ait une bonne concordance globale entre les différents tests sérologiques, il existe cependant des variabilités méthodologiques importantes (type d'antigène VP1, protocole expérimental, choix des contrôles positifs et négatifs, définition des cut-offs…). En absence de normalisation et de reproductibilité des tests sérologiques disponibles, aucun d'entre eux n'est actuellement recommandé en pratique clinique courante.

Technique Requirement	Advantages	Disadvantages	Time
Enzyme Immunoassay	Small quantities of sample required Versatile and customizable Inexpensive once set up	Can only measure one analyte at a time Cross-reactivity Relatively expensive initial investment Time consuming Elevated risk of error when testing a large number of samples	2 days (if wells are coated with antigen overnight)
Hemagglutination Inhibition Assay	Highly specific	Technically demanding Cannot distinguish between antibody classes Requires either intact virions or VLPs	1 day
Multiplex Assay	Simultaneous detection of multiple antigens High speed and dynamic range Customizable Reduced workflow	Expensive especially if a small number of antigens is analyzed Specialized equipment and analysis software are not available in most clinical settings Lack of normalization	Around 2 days (if beads are prepared in advance)
Neutralization Inhibition Assay	Highly Specific Measures neutralizing antibodies	Can only be used with PsV or viruses that can be grown Technically demanding Very time-consuming	Around 5 days

Figure 12. **Avantages, inconvénients et modalités des principaux types de tests de détection des anticorps anti-BKPyV** (tiré de Dakroub et al. [172])

Les tests HIA, même s'ils présentent l'avantage d'être hautement spécifiques (et permettent d'éviter la cross-réactivité des anticorps entre le BKPyV et les autres PyV dont le JCV [173]), ont aujourd'hui été abandonnés au profit des ELISAs. En effet, ces derniers sont rapides, sensibles, reproductibles, et peuvent permettre de distinguer les différents sérotypes du BKPyV. Il n'existe à ce jour aucun test ELISA commercial disponible pour la détection des anticorps anti-BKPyV, et de nombreux protocoles « maison » ont été développés. Ces derniers utilisent selon les cas des VLP, des pseudovirus, des peptides synthétiques de VP1, ou des protéines VP1 complètes (assemblées en capsomères ou fusionnées à la GST [Glutathione S-Transférase]) [172]. Les tests ELISA-VLPs présentent plusieurs avantages comparativement aux autres techniques : réalisation d'études de séroprévalence de grande ampleur [174], meilleure corrélation à la réplication virale et à la réponse cellulaire T-CD4 [175].

Les tests de neutralisation permettent quant à eux de détecter spécifiquement les anticorps neutralisants vis-à-vis du BKPyV, c'est-à-dire ceux qui sont susceptibles de bloquer l'infection virale [176]. Ils représentent donc un outil potentiellement intéressant pour la prédiction du risque d'infection à BKPyV chez les transplantés rénaux [177]. Cependant, le principal inconvénient de ces tests est la lourdeur expérimentale, ce qui les rend difficilement applicables en routine. De plus, il n'existe pas de protocole standardisé, et la définition de la séropositivité varie d'un laboratoire à l'autre.

5.2.2. *Cinétique de la réponse humorale chez les transplantés rénaux avec une infection à BKPyV*

L'immunité humorale est également impliquée dans la régulation de l'infection par le BKPyV, comme en atteste la corrélation observée entre la réplication du BKPyV et l'évolution du titre d'IgG anti- BKPyV chez les patients transplantés rénaux.

Dans une étude transversale monocentrique ayant inclus 81 greffés rénaux, la survenue d'une virurie et/ou d'une virémie BKPyV en post-transplantation était associée à une réponse humorale spécifique anti-BKPyV majoritairement de type IgA (les IgG étant déjà présents avant la greffe chez plus de 80% des individus) [178]. De plus l'ascension du taux d'anticorps était plus importante chez les patients avec une virémie comparativement à ceux avec une virurie isolée. Ces résultats ont été confirmés dans un essai prospectif ayant inclus 200 patients transplantés rénaux avec un suivi virologique et sérologique régulier. Dans cet essai, l'augmentation du titre d'IgG anti-BKPyV était significativement associée à l'intensité de l'infection par le BKPyV en analyse multivariée [179]. Ainsi, le titre d'IgG anti-BKPyV était maximal chez les patients avec une virémie BKPyV persistante, comparativement à des sujets avec une virémie transitoire, ou une virurie.

Cependant, le rôle protecteur de la réponse humorale anti-BKPyV reste débattu. Dans une étude ayant évalué la réponse humorale spécifique anti-BKPyV chez 20 patients greffés rénaux avec une BKVN, la négativation de la virémie (et/ou la normalisation de la fonction rénale) était associée à une ascension significative du titre d'IgG anti-BKPyV, suggérant un rôle de l'immunité humorale dans la clairance virale et la résolution des lésions viro-induites [180]. A contrario, dans l'étude de Bohl et al. précédemment décrite, la hausse significative du titre d'IgG anti-BKPyV observée chez les patients avec une réplication à BKPyV n'était pas systématiquement associée la clairance du virus, plus de 60% des patients étant encore viruriques à la date du dernier suivi [179]. Ainsi, suite à la réactivation virale, les Ig anti-BKPyV semblent conférer une protection incomplète vis-à-vis d'une infection sévère à BKPyV. Les titres élevés d'anticorps observés au cours de la virémie peuvent permettre sa clairance. En revanche, l'impact de la réponse humorale sur la prévention des lésions de néphropathie reste incertain, probablement du fait de la faible diffusion des IgG anti-BKPyV jusque dans les tubules rénaux pour empêcher la propagation virale [181].

5.2.3. Intérêt de l'étude de la réponse humorale avant transplantation rénale

Si l'étude de la réponse humorale une fois l'infection à BKPyV déclarée semble difficile d'interprétation, plusieurs études ont évalué l'intérêt de la sérologie BKV en amont de la greffe pour stratifier le risque d'infection chez des transplantés rénaux adultes [130,166] et pédiatriques [182,183]. Cependant, ces études sont extrêmement hétérogènes à plusieurs niveaux : méthodologie, effectifs, test utilisé pour la détection des anticorps anti-BKPyV, ou critère d'évaluation de l'infection à BKPyV [172]. Cela rend l'interprétation et la généralisation des résultats difficiles, d'autant que les données sont parfois contradictoires.

Dans une cohorte rétrospective de 407 couples donneurs vivant / receveurs (DV/R) parmi lesquels 368 (90.4%) étaient séropositifs pour le BKPyV, Wunderink et al. ont mis en évidence qu'un titre élevé d'IgG anti-BKPyV chez le donneur (déterminé par ELISA GST-VP1), était le facteur de risque majeur associée à la survenue d'une virémie BKPyV et/ou d'une BKVN chez le receveur [184]. A l'inverse, il existait une corrélation négative entre le titre d'IgG chez le receveur en pré-greffe et le risque ultérieur de réactivation virale. Plus récemment, l'analyse sérologique (ELISA VLP-VP1) d'une cohorte de 551 transplantés rénaux retrouvait une incidence de virémie BKPyV de 37.5% chez les couples D+/R- contre 4.3% chez les D-/R+ ($P < 0.05$). De plus, un titre d'IgG anti-BKPyV < 400 chez le receveur était associé à un risque accru de virémie BKV en analyse uni et multivariée [114].

De même, en utilisant des tests de neutralisation sur cellules RPTE, Abend et al retrouvaient que parmi les 116 couples D/R analysés, le risque de virémie post-greffe était significativement augmenté chez les receveurs ayant un donneur avec un titre de neutralisation élevé [185]. En revanche, dans cette dernière étude, le statut sérologique du receveur n'était pas corrélé au risque de virémie BKPyV en post-greffe. Enfin, dans l'étude de Solis et al. ayant inclus 168 transplantés rénaux dont 52 ont présenté une infection à BKPyV dans un délai médian de 24 mois, les patients avec un titre d'anticorps neutralisants (AcN) < 4 Log_{10} IC_{50} à J0 avaient un risque accru de réplication à BKPyV en post-greffe (HR 1.88, IC95% : 1.06-3.45 ; P=0.03) [177].

Au total, il ressort de ces travaux qu'une sérologie BKPyV positive chez le donneur (à fortiori avec un titre élevé d'anticorps) et/ou négative chez le receveur est associée à un risque accru d'infection à BKPyV. Ainsi, les patients les plus à risque d'infection à BKPyV seraient les couples D+ (avec titre d'Ig anti-BKPyV élevé) / R- (ou R+ avec un titre d'IgG anti-BKPyV faible). Inversement, les receveurs avec un titre élevé d'AcN protecteurs vis-à-vis de la souche du donneur seraient à moindre risque.

5.3. Immunité cellulaire adaptative ou spécifique

Comme pour tout virus latent, chez les patients transplantés rénaux, les LT anti-BKPyV jouent un rôle protecteur majeur dans le contrôle de la réplication virale [186]. En effet, une virémie persistante du BKPyV (avec ou sans BKVN) est le plus souvent associée à de faibles réponses T-spécifiques [187,188]. Inversement, la restauration d'une immunité cellulaire anti-BKPyV était associée à la clairance de la virémie BKPyV dans plusieurs études [189–191]. Plusieurs populations de LT reconnaissent des peptides antigéniques (épitopes) dérivés de la quasi-totalité des protéines du BKPyV, à savoir les protéines de capside (VP1, VP2 et VP3), LTag et sTAg [189,192,193]. Les épitopes issus de VP1 sont immunodominants, et associés à une réponse T plus importante [181,189]. La réponse T spécifique du BKPyV est majoritairement de type CD4 avec de bonnes capacités effectrices, comme en atteste le caractère polyfonctionnel de ces cellules avec des capacités de prolifération, de cytotoxicité et de sécrétions cytokiniques multiples [175,194]. La fréquence de détection des LT CD4 cytolytiques et T-helper est maximale pendant la phase de clairance de la virémie [195]. Mutlu et al. ont également retrouvé une corrélation négative entre la charge virale BKV et les réponses T CD4 anti-BKPyV évaluées par ELISPOT dans une cohorte de 31 patients greffés rénaux, dont 8 avec une virémie BKPyV [187]. En revanche, dans cette même étude, il n'était pas retrouvé de corrélation entre les réponses cellulaires anti-BKPyV en pré-greffe et le risque de virémie après transplantation (sous réserve des petits effectifs). Cependant, les réponses T CD4 anti-BKPyV chez les patients greffés sont faibles comparativement à d'autres virus, à la fois quantitativement et qualitativement (production de cytokines réduites). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'activation des LT CD4 par la présentation d'antigènes sur molécules HLA de classe II à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), présentes en faibles quantités dans les tissus épithéliaux. Des LT CD8 anti-BKPyV ont également été identifiés chez les sujets sains séropositifs pour le BKV. Tout comme les LT CD4, les LT CD8 anti-BKPyV sont retrouvés à des fréquences beaucoup plus faibles comparativement à d'autres virus persistants comme le CMV (0.004% pour les LT CD8+ anti-BKPyV versus 1.63% pour les LT CD8+ anti-CMV), et présentent de plus faibles capacités cytotoxiques [196]. Les LT CD8 sont les principaux effecteurs cytolytiques permettant de détruire les cellules infectées qui présentent des antigènes viraux à leur surface via les molécules HLA-I (Figure 13). De manière similaire à la réponse T-CD4, une perte de l'immunité cellulaire T CD8 anti-BKPyV est observée chez des patients transplantés rénaux avec une réplication à BKPyV en post-greffe

comparativement à des sujets contrôles [197]. Inversement, la clairance de la virémie était associée dans une étude récente à des réponses T-CD8 plus importantes à M6 et M12 [198].

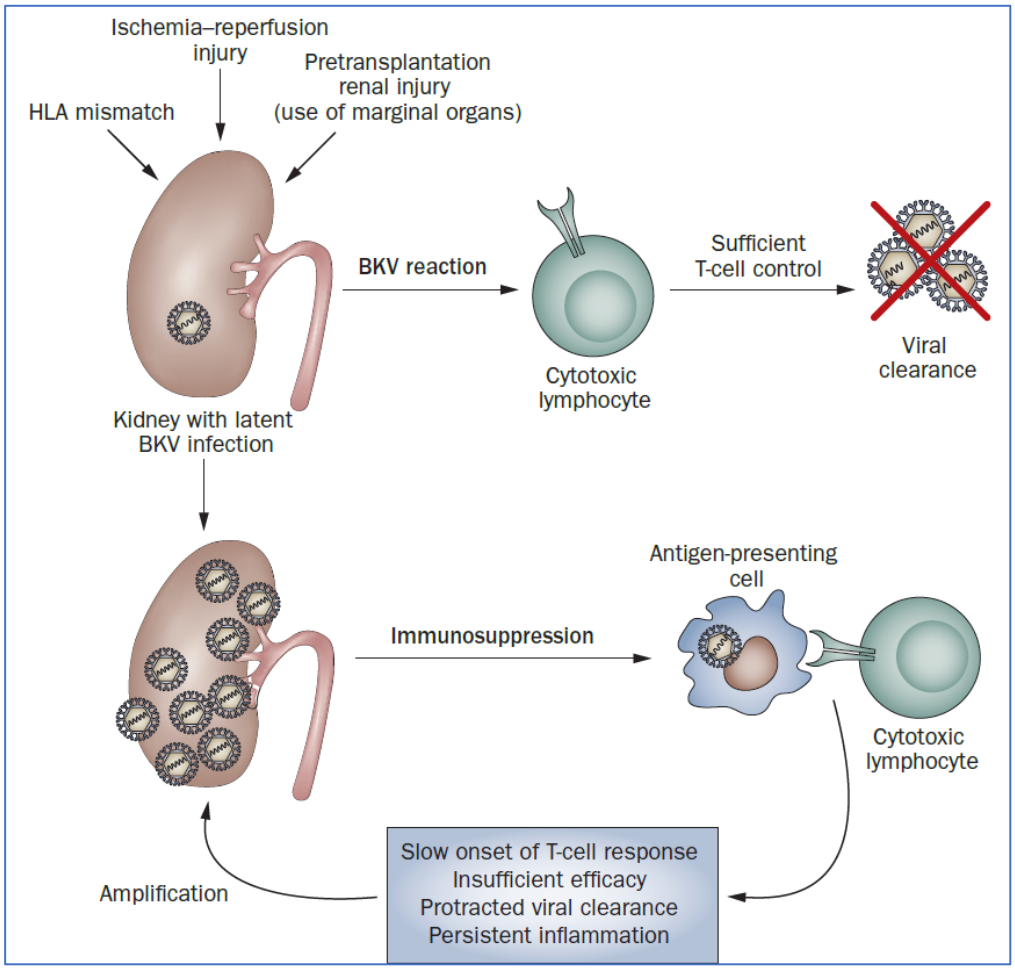


Figure 13. **Rôle des lymphocytes T anti-BKPyV dans le contrôle de la réplication virale et la progression vers la néphropathie** (tiré de Babel et al. *[199]*)
Une réponse cellulaire BKPyV-spécifique suffisante permet le contrôle de la réplication virale (panel du haut). En cas de réponse insuffisante ou tardive, la réplication virale et l'inflammation associée facilite le recrutement de LT cytotoxiques anti-BKPyV et allo-réactifs dans le greffon, responsables des dommages tissulaires pouvant aboutir à des lésions de néphropathie sévère (panel du bas).

Au total, l'ensemble de ces données immunologiques concordent avec les données cliniques, montrant que l'allègement des traitements immunosuppresseurs est associé à une restauration de la réponse T-spécifique CD4 et CD8, permettant le plus souvent le contrôle de la réplication du BKPyV dans le sang et les urines [200]. En revanche, en cas de réponse T spécifique insuffisante, la clairance virale est incomplète ce qui entretient l'inflammation tissulaire dans le greffon. Cela conduit à la migration dans le tissu rénal des LT anti-BKPyV, mais également de LT allo-réactifs dont l'activité entretient les dommages tissulaires (Figure 13). La place du monitoring immuno-virologique chez les patients greffés rénaux reste donc à définir.

Objectifs

Le BKPyV est un virus ubiquitaire, dont la séroprévalence dans la population générale est supérieure à 80%. Il s'agit d'un pathogène opportuniste, dont la réactivation est fréquente en cas d'immunodépression. Chez les patients transplantés rénaux, en l'absence d'intervention thérapeutique, la réplication persistante du BKPyV peut conduire à la survenue d'une néphropathie (BKVN) dont le pronostic rénal est sombre. Malgré la fréquence de la réplication à BKPyV en post-greffe, les déterminants viraux, immunologiques, et cellulaires de la persistance de la réplication du BKPyV et de la progression vers la BKVN restent mal compris.

Mon projet de thèse avait pour objectifs d'étudier la diversité virale *in vivo* du BKPyV dans le plasma et le rein de transplantés rénaux développant une BKVN, d'analyser en parallèle la réponse humorale anticorps neutralisante vis-à-vis des différents génotypes de BKPyV, et d'identifier des facteurs cellulaires essentiels à la réplication virale.

Sur le plan génétique, plusieurs sous-types de BKPyV (ou « quasi-espèces ») peuvent coexister chez les transplantés rénaux ayant une virémie prolongée et/ou développant une néphropathie. La diversité virale *in vivo* du BKPyV a cependant essentiellement été étudiée dans le compartiment urinaire, le plus souvent avec des techniques de PCR. La virurie étant faiblement corrélée à la survenue d'une néphropathie, l'existence de la diversité du BKPyV dans le plasma et/ou le rein et son impact sur la survenue de la BKVN restent inconnus.
Mon premier objectif a donc été d'étudier la cinétique de réplication et la diversité génétique du BKPyV dans le plasma et le rein de patients transplantés rénaux ayant développé une BKVN, à l'aide de plusieurs techniques (séquençage de Sanger de la protéine de capside VP1 et séquençage génome complet).

Sur le plan immunologique, en lien avec l'existence de différentes sous-populations virales, des anticorps neutralisants (AcN) spécifiques de chacun des sérotypes de BKPyV peuvent coexister chez les transplantés rénaux. Cependant, le rôle de la réponse humorale dans le contrôle de la virémie et la survenue de la néphropathie reste débattu. Des études récentes suggèrent un lien potentiel entre la variabilité génétique du BKPyV (notamment au niveau de la région de VP1), et l'échappement à la réponse anticorps neutralisante.
Mon second objectif a donc été d'analyser, en parallèle de l'évolution génétique, la réponse humorale anti-BKPyV-VP1 dans la même population de transplantés rénaux avec un diagnostic de BKVN. Pour cela, nous avons mis au point des tests de neutralisation spécifiques des

principaux génotypes de BKPyV, afin d'étudier la cinétique comparative des AcN vis-à-vis de la souche réplicante et des autres souches.

Sur le plan virologique, le BKPyV est un virus dont l'acquisition survient précocement dans l'enfance, et qui persiste de manière latente dans l'organisme au décours, principalement au niveau de l'urothélium. Les déterminants du tropisme cellulaire du BK virus, et les mécanismes contrôlant la persistance et la réactivation virale sont mal connus.

Mon troisième objectif a donc été d'identifier des facteurs cellulaires essentiels au cycle de réplication du BKPyV, en réalisant un crible CRISPR-Cas9 génome complet sur des cellules rénales primaires immortalisées (RPTE-hTERT).

Etude de la diversité virale *in vivo* du BKPyV chez les patients transplantés rénaux avec BKVN

Le BKPyV est un virus à ADN « variable » dont plusieurs sous-types (ou « quasi-espèces ») peuvent coexister *in vivo*, en particulier chez les transplantés rénaux ayant une virémie prolongée et/ou développant une néphropathie. Cependant, l'impact de cette diversité sur l'histoire naturelle de l'infection par le BKPyV reste mal connu. De plus, la diversité virale *in vivo* du BKPyV a cependant essentiellement été étudiée dans le compartiment urinaire

Dans la première partie de ce travail, nous avons donc étudié la cinétique de réplication et la diversité génétique du BKPyV dans le plasma et le rein de patients transplantés rénaux ayant développé une BKVN, à l'aide de plusieurs techniques.

1. Méthodes

1.1. Population d'étude

Nous avons mené une étude rétrospective au sein de la cohorte de patients transplantés rénaux à l'hôpital APHP (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris) - Saint Louis (Paris, France). Tous les patients ont donné leur accord au moment de l'inscription sur liste de greffe pour que les échantillons prélevés dans le cadre du soin puissent être utilisés ultérieurement à des fins de recherche. Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique local, et les recherches ont été conduites en accord avec la déclaration d'Helsinki.

Tous les patients transplantés rénaux avec un diagnostic histologique de BKVN selon les critères ATS-IDCOP et Banff Working Group [200,201] de Janvier 2016 à Juin 2020 ont été inclus. Des sujets contrôles n'ayant pas développé de BKVN ont été sélectionnés durant la même période d'étude pour l'analyse comparative de la PCR BKPyV dans les biopsies préimplantatoires réalisées lors de la greffe.

1.2. Suivi clinique

Tous les patients inclus (cas et contrôles) ont été suivis jusque fin 2021. Les données cliniques suivantes ont été collectées à partir des dossiers patients dans un fichier informatique anonymisé : critères démographiques, caractéristiques de la transplantation rénale, et données clinico-biologiques au diagnostic de la BKVN (pour les cas uniquement). A l'hôpital APHP - Saint Louis, les transplantés rénaux bénéficient d'un traitement d'induction par ATG, à l'exception des patients ayant reçu un traitement immunosuppresseur en pré-greffe qui

reçoivent une induction par basiliximab (en association à un bolus de 500mg de méthylprednisolone). Le traitement d'entretien consiste le plus souvent en une trithérapie associant des corticostéroïdes, un CNI (tacrolimus ou ciclosporine A) et du MMF, ou une bithérapie sans corticostéroïdes.

Depuis 2005 et conformément aux recommandations internationales, tous les transplantés rénaux bénéficient d'un screening régulier de la virémie BKPyV en post-greffe selon le rythme suivant : une fois par mois les 6 premiers mois, puis tous les 3 mois jusqu'à 2 ans, et tous les 6 mois au décours. Pour les patients recevant un rein d'un donneur décédé, une ponction-biopsie rénale (PBR) préimplantatoire du greffon est effectuée au moment de la chirurgie de greffe. Des biopsies protocolaires sont également effectuées à 3 et 12 mois post-greffe, ainsi que dans les cas suivants : insuffisance rénale aiguë ou protéinurie *de novo*, suspicion de rejet aigu ou de BKVN.

1.3. Prélèvements biologiques

Pour les greffés rénaux avec un diagnostic de BKVN, les échantillons congelés disponibles de plasma et de PBR prélevés entre la greffe et le diagnostic ont été récupérés à partir des collections biologiques des services de Virologie et d'Anatomopathologie de l'hôpital APHP-Saint Louis. Pour les sujets contrôles, seule la PBR effectuée à J0 a été récupérée. Pour chaque échantillon de PBR, 20 coupes de 10 µm ont été réalisées sur cryostat, collectées dans 2 ml de milieu Xpert® Viral Transport Medium (Cepheid), broyées, et digérées à la protéinase K à 56°C pendant une heure. Une coupe de 10 µm de chaque biopsie a été mise de côté pour relecture en anatomopathologie, avec la collaboration du Dr Jérôme Verine (coloration standard et microscopie optique +/- immunohistochimie avec marquage LTag SV40).

L'extraction des acides nucléiques a été effectuée à partir d'un volume de 500 µl de plasma ou de broyat de PBR sur l'automate NucliSENS™ easyMAG (Biomérieux) selon les recommandations du fabricant (éluat de 100 µL).

1.4. PCR quantitative BK virus

Une quantification par PCR temps réel de l'ADN du BKPyV a été effectuée à partir de 15 µl d'éluat sur tous les échantillons de plasma et de PBR, à l'aide du kit *artus*® BK Virus RG PCR (QIAGEN) (seuil de détection de 195 copies/ml). Pour les biopsies, une PCR temps réel pour le gène de l'albumine a été réalisée en parallèle, afin de quantifier le nombre de cellules

présentes dans chaque échantillon (Annexe 1 – Matériels et Méthodes). La charge virale BKPyV dans les PBR a été quantifiée en nombre de copies/millions de cellules permettant une comparaison entre les différents prélèvements indépendamment de la taille du prélèvement, de la qualité du broyage et de l'extraction d'ADN.

1.5. Séquençage Sanger de la protéine de capside VP1

Dans un premier temps, le gène de la protéine de capside VP1 a été amplifié à partir de 10 µl d'éluat dans un volume final de réaction de 40 µl contenant 1X PCR buffer, 2.5 nM $MgSO_4$, 50 nM de dNTP, 0.25µL d'AmpliTaq Platinium, et 500nM des primers SeqB7 (5'-AAGAACTGCTCCTCAATGGATG-3') et SeqB15 (5'-AATCACAATGCTCTTTCCCAAGTC-3') [202]. La réaction de PCR a été effectuée sur l'automate ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems) avec les conditions suivantes : dénaturation initiale de 94°C pendant 3 min, suivie de 40 cycles avec dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 57°C pendant 30 s, puis extension à 68°C pendant 90 s (extension finale durant 10 min à 68°C). L'amplicon de 1355-bp a été visualisé à l'aide du système Agilent 4200 TapeStation (D1000 ScreenTape Analysis, Agilent technologies), puis les produits de PCR purifiés à l'aide du kit ExoSAP-IT Cleanup Reagent (ThermoFischer Scientific). Une seconde réaction de PCR a ensuite été réalisée sur l'amplicon purifié à l'aide des mêmes primers SeqB7 et SeqB15, et d'un second couple de primers : SeqIntF (5'- ATATCAGCAGCTGAAACATAC-3') et SeqIntR (5'- CCTTGGAAATGCAGGGAG-3'). La réaction a été conduite sur un automate Eppendorf selon les conditions suivantes : dénaturation à 96°C pendant 1 min, 28 cycles avec dénaturation à 96°C pendant 10 s, hybridation à 55°C pendant 5 s, et extension à 60°C durant 4 min. Le séquençage Sanger a enfin été effectué sur un automate Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems).

La qualité des chromatogrammes a été inspectée, et les séquences trop courtes et/ou de mauvaise qualité exclues. Pour chaque échantillon, une séquence consensus a été construite sur le logiciel Geneious Prime v2022.1.1, puis alignée avec 36 séquences de référence de VP1 (trois par sous-type) extraites de la base de données GenBank (liste disponible en Annexe 1). Les arbres phylogénétiques ont été construits sur le logiciel MEGA v11.0 selon la méthode de Neighbor-Joining (avec 1000 réplicas de boostrap) [203], et les distances évolutives déterminées à l'aide du modèle paramétré Tamura-3 (distribution uniforme) [204].

1.6. Séquençage génome complet (WGS [Whole Genome Sequencing])

1.6.1. Design des sondes de capture

Le génome du BKPyV (environ 5,2 kb) étant de taille très inférieure au génome humain (environ 3 GB), et présent en beaucoup plus faible quantité dans les échantillons analysés, le séquençage du génome complet du BKPyV a nécessité une étape d'enrichissement pour obtenir une couverture virale suffisante. A partir de plus de 300 séquences de génomes du BKPyV référencées dans GenBank (regroupant tous les sous-types), nous avons dessiné 2996 sondes de capture de 120 pb chacune, permettant de couvrir l'ensemble du génome de chaque sous-type de BKPyV (SureSelect$^{XT\ HS}$ Custom, Agilent Technologies) (liste des sondes et séquences sur le lien : https://dispose.aphp.fr/u/4KBRx00gUdTyoFHR/39e4891b-452d-4080-9487-756417389860?l).

1.6.2. Préparation des librairies

Après extraction de l'ADN, les échantillons à séquencer ont été purifiés à l'aide du kit Zymo-DNA clean (Zymo Research), puis quantifiés (QUBIT ds-DNA HS Assay Kit, ThermoFisher Scientific). Les librairies ont été préparées à partir d'une quantité d'ADN de 200ng (dans un volume final de 7µl), à l'aide de la trousse SureSelect$^{XT\ HS}$ Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library (Agilent Technologies). Brièvement, après fragmentation enzymatique, réparation et adénylation, les adaptateurs ont été ligués sur les échantillons avant purification (AMPure XP beads, Beckman Coulter™, ThermoFischer Scientific). Une première réaction d'amplification a été effectuée à l'aide de l'Herculase II Fusion DNA Polymerase (« Pre-capture library »). Après purification, les sondes de capture ont été hybridées sur la librairie amplifiée, puis l'ADN hybridé capturé à l'aide de billes de streptavidine (Streptavidin C1 Dynabeads™ MyOne™, ThermoFischer Scientific). Après lavage des billes, une seconde étape d'amplification a été effectuée à l'aide de l'Herculase II Fusion DNA Polymerase (« Post-capture library »), avant purification finale (AMPure XP beads). La qualité et la quantité des librairies obtenues a été contrôlée à l'aide du système Agilent 4200 TapeStation (D1000 ScreenTape Analysis, Agilent technologies). Une quantification a été effectuée dans le même temps (QUBIT ds-DNA HS Assay Kit, ThermoFisher Scientific).

1.6.3. Séquençage et analyse

Tous les échantillons à séquencer lors d'un même *run* ont été poolés en quantité équimolaire, et quantifiés à l'aide du kit QUBIT ds-DNA HS Assay (Thermofisher). Le séquençage des librairies a été réalisé sur le système MiSeq (Illumina ®), avec une cartouche v2 2x150pb. Les séquences générées (*reads* bruts) ont été analysées avec deux pipelines bio-informatiques construits pour l'étude.

Pour le 1er pipeline, après une première étape de nettoyage et de vérification de la qualité, les *reads* filtrés ont été alignés sur les séquences de référence des 12 sous-types de BKPyV disponibles en Annexe 1 (outil BLASTN). Dans chaque échantillon, le nombre de *reads* alignés, le pourcentage de couverture et la profondeur d'alignement pour chaque sous-type était décrit. Les *reads* indéterminés ont été exclus. Seuls les sous-types avec une couverture > 75% ont été pris en compte pour la recherche de co-infections. Le calcul des proportions a été fait en prenant en compte la profondeur d'alignement des différents sous-types de BKPyV avec > 75% de couverture.

Pour le 2nd pipeline, après application des filtres et nettoyage des *reads* bruts, les *reads* filtrés ont été alignés sur le génome de référence BK Dunlop (numéro d'accès GenBank : NC001538) afin de générer une séquence consensus majoritaire. Seuls les variants avec une couverture globale > 50% et une profondeur > 5/nucléotide ont été pris en compte. Les séquences consensus ainsi obtenues ont été alignées avec des séquences de référence des différents sous-types de BKV (Annexe 1 – Matériels et Méthodes) sur le logiciel Geneious Prime 2022.1.1 (MAFFT alignment). Les arbres phylogénétiques ont ensuite été construits sur le logiciel MEGA v11.0 selon la méthode de Neighbor-Joining (avec 1000 réplicas de boostrap) [203], et les distances évolutives déterminées à l'aide du modèle paramétré Tamura-3 (distribution gamma avec sites invariants) [204]. Dans un second temps, les *reads* filtrés ont été réalignés sur la séquence consensus générée afin d'identifier les variants minoritaires (seuil de 1%). L'impact de chaque variant nucléotidique sur la séquence protéïque a été annoté avec le logiciel SNP-effect. Les statistiques de mutations synonymes et non-synonymes, et de pression de sélection par gène et par échantillon ont été calculées (Figure 14).

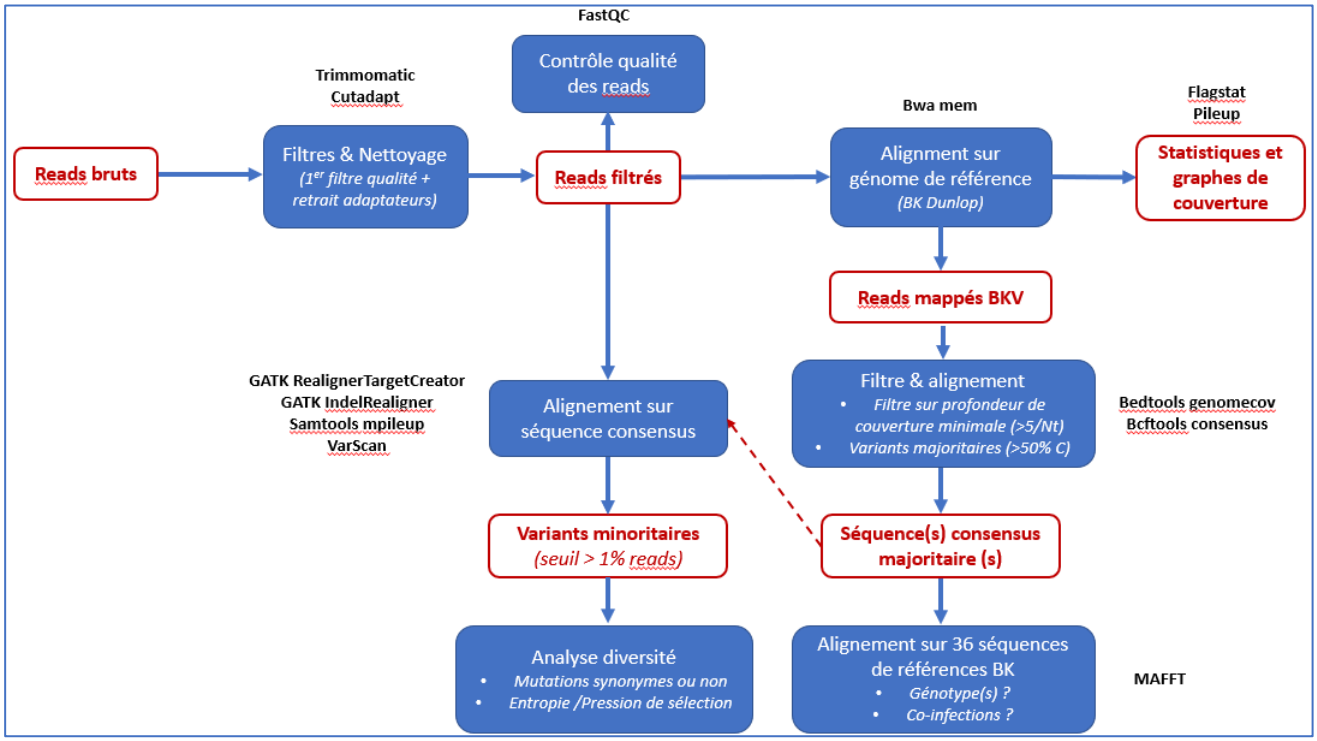


Figure 14. **Pipeline 2 d'analyse bio-informatique des données de séquençage WG du BKPyV.** Les différentes étapes du pipeline avec les outils (en noir) sont détaillées de l'analyse des *reads* bruts à l'obtention de la séquence consensus majoritaire, et des variants minoritaires.

2. Résultats

2.1. Caractéristiques de la population d'étude

De Janvier 2016 à Juin 2020, 32 cas de BKVN prouvés histologiquement ont été identifiés parmi la file-active des patients transplantés rénaux à l'hôpital Saint Louis. Pour la population contrôle, nous avons sélectionné de manière aléatoire 98 greffés n'ayant pas développé de BKVN durant la même période (et parmi lesquels 20/98 soit 20.4% avaient eu une virémie en post-greffe). La durée médiane de suivi des cas et des contrôles était respectivement de 46 (EIQ : 36-68) et 34 (28-44) mois (p<0.001). Les principales caractéristiques démographiques et relatives à la greffe des patients de l'étude sont présentées dans le Tableau 1.

Comparativement aux cas de BKVN, les patients contrôles avaient un score c-PRA plus faible (20 [0-54]) vs. 50 [9-88], p=0.003), mais plus fréquemment un mismatch HLA supérieur ou égal à 3 (97% vs. 77%, p=0.001). Le traitement d'induction consistait en l'administration d'ATG chez une vaste majorité des patients, avec une proportion supérieure chez les contrôles (99% versus 84% des cas, p=0.003).

Variable *n* (%); médiane [EIQ]	**Cas de BKVN** (N=32)	**Contrôles** (N=98)	***p*-value**
Caractéristiques démographiques			
Age à la date de greffe *(ans)*	55 [46-63]	55 [43-64]	0.88
Sexe masculin	18 (56)	60 (61)	0.62
Pays d'origine			0.43
Europe de l'Ouest	17 (44)	33 (39)	
Caraïbes	2 (6)	4 (5)	
Afrique du Nord / Moyen orient	6 (19)	14 (16)	
Afrique sub-saharienne	4 (12)	24 (28)	
Asie	3 (9)	10 (12)	
Néphropathie sous-jacente			0.80
Vasculaire +/- diabétique	9 (28)	33 (34)	
Glomérulonéphrite chronique	6 (19)	22 (23)	
Néphropathie interstitielle	5 (16)	11 (11)	
Autres	12 (37) *	31 (32)	
Spécificités de la transplantation rénale			
Durée de la dialyse pré-greffe *(mois)*	37 [11-60]	48 [24-68]	0.09
Première transplantation	29 (91)	88 (88)	0.74
Type de transplantation			0.71
Greffe rénale seule	29 (91)	90 (93)	
Greffe combinée	3 (9) **	7 (7)	
Donneur décédé	26 (81)	97 (100)	**< 0.001**
Temps d'ischémie froide *(heures)*	13 [6-15]	14 [11-16.5]	**0.04**
Score c-PRA	50 [9-88]	20 [0-54]	**0.003**
Mismatch HLA			**0.001**
< 3	7 (23)	3 (3)	
≥ 3	23 (77)	95 (97)	
Traitement d'induction			**0.003**
ATG	27 (84)	97 (99)	
Anti-CD25	4 (13)	1 (1)	
Autres †	3 (9)	0	

Tableau 1. **Caractéristiques démographiques et de la transplantation de la population.**

* Néphropathie indéterminée (N=8), polykystose rénale autosomique dominante (N=3), néphropathie congénitale (N=1)

** Greffe combinée rein-pancréas (N=1), ou rein-foie (N=2)

† Autre traitement d'induction : anti-CD20 (N=1), anti-CD52 (N=1), échange plasmatique (N=1)

Concernant les 32 cas, la BKVN était diagnostiquée dans un délai médian de 12 (8.2-17.5) mois après la transplantation, et 2.4 (1.3-6.4) mois après le début de la virémie. Vingt-neuf des 32 patients (91%) étaient sous trithérapie immunosuppressive au moment du diagnostic, associant le plus souvent des corticostéroïdes (N=29, 91% ; posologie médiane : 10mg/jour [8-10]), un antiprolifératif (MMF [N=16, 50%] ou azathioprine [N=13, 41%]) et un CNI (tacrolimus

[N=19, 59%] ou ciclosporine [N=12, 38%]). La médiane de créatininémie au diagnostic était de 197 (135-239) µM, correspondant à un DFG de 31 (22-48) ml/min/1.73 m^2. L'analyse histologique des biopsies diagnostiques a mis en évidence une BKVN stade A chez 5 (18%) patients, B chez 21 (78%) and C chez un (4%) selon la classification ATS-IDCOP [124].

2.2. Analyse de la réplication du BKPyV de la greffe au diagnostic de BKVN

La présence d'ADN du BKPyV dans les échantillons de plasma et de PBR des cas de BKVN de la greffe au diagnostic a été quantifiée par RT-PCR (Tableau 2).

Variable *n* (%); médiane [EIQ]	**J0 / Date de greffe** (N=20)	**Pré-BKVN** (N=24)	**Date de la BKVN** (N=32)
Délai médian post-greffe *(mois)*	-	3 [3-7]	12 [8-17]
PCR BKV - Biopsie rénale			
Échantillons BKV-positifs *(n, %)*	8 (40)	15 (62) *	32 (100)
Charge virale *(log UI/10^6 cellules)*	3.7 [3.5-4.4]	5.0 [4.2-6.2]	8.2 [6.3-8.9]
PCR BKV – Plasma concomitant			
Échantillons BKV-positifs	0 (0)	7 (29)	32 (100)
Charge virale *(log UI/ml)*	-	3.7 [3.7-6.4]	5.4 [4.3-6.0]

Tableau 2. **Cinétique de réplication du BK virus dans les échantillons de biopsie rénale et de plasma concomitants de la greffe au diagnostic de BKVN chez les 32 cas.**
* 8 des 15 patients avec une PBR intermédiaire (pré-BKVN) BKV-positive avaient un échantillon de plasma concomitant négatif.

A la date de la greffe, 40% (8/20) des biopsies préimplantatoires (correspondant au rein du donneur) avaient une PCR BKPyV positive (charge virale [CV] médiane : 3.7 $\log_{10}$UI/10^6 cellules, EIQ : 3.5-4.4). Les échantillons concomitants de plasma étaient négatifs dans tous les cas. En comparaison, seuls 2% (2/98) des sujets contrôle avaient une biopsie rénale BKPyV-positive au moment de la transplantation (charges virales respectives de 4.22 and 3.27 $\log_{10}$UI/10^6 cellules ; p<0.0001).

Dans les suites de la greffe, la virémie BKPyV survenait dans un délai médian de 5.3 (2.9-12.5) mois (CV médiane à la date de la 1ère virémie : 3.8 $\log_{10}$UI/ml, 3.3-4.9). Entre la transplantation et le diagnostic de BKVN, 35 PBR intermédiaires (« pré-BKVN ») chez 24 patients ont été collectées dans un délai médian de 3 (3-7) mois. La PCR BKPyV était positive chez 15/24 (62%) de ces sujets (5.0 $\log_{10}$UI/10^6 cellules, 4.2-6.2), dont 5 qui avait déjà une biopsie positive au

moment de la greffe (Tableau S1 : patients #3, #10, #11, #12 et #31). Huit des 15 patients avec une PBR pré-BKVN BKPyV-positive avaient un plasma concomitant négatif.

Toutes les biopsies BKPyV-positives avec un plasma concomitant négatif (au moment de la transplantation ou en post-greffe) ont été relues à postériori en anatomopathologie. L'examen en microscopie optique et le marquage LTAg-SV40 en IHC étaient normaux dans tous les cas, et ne retrouvaient pas de lésions viro-induites.

Au diagnostic de la BKVN, la PCR BKPyV était positive avec des charges virales élevées sur tous les prélèvements de PBR (8.2 $\log_{10}$UI/10^6 cellules, 6.3-8.9) et de plasmas (5.4 $\log_{10}$UI/ml, 4.3-6.0). La charge virale dans le rein augmentait significativement entre la date de greffe et les prélèvements intermédiaires (p=0.038), puis au diagnostic (p<0.001).

2.3. Séquençage Sanger de la protéine de capside VP1

2.3.1. Analyse des échantillons au diagnostic de la BKVN

La distribution des génotypes des souches de BKPyV identifiées par séquençage Sanger de VP1 dans la PBR et le plasma au diagnostic de BKVN est présentée dans la Figure 15. Les génotypes les plus fréquemment retrouvés étaient le BKPyV-I (16/32, 50%), le BKPyV-II (8/32, 25%) et le BKPyV-IVc2 (7/32, 23%).

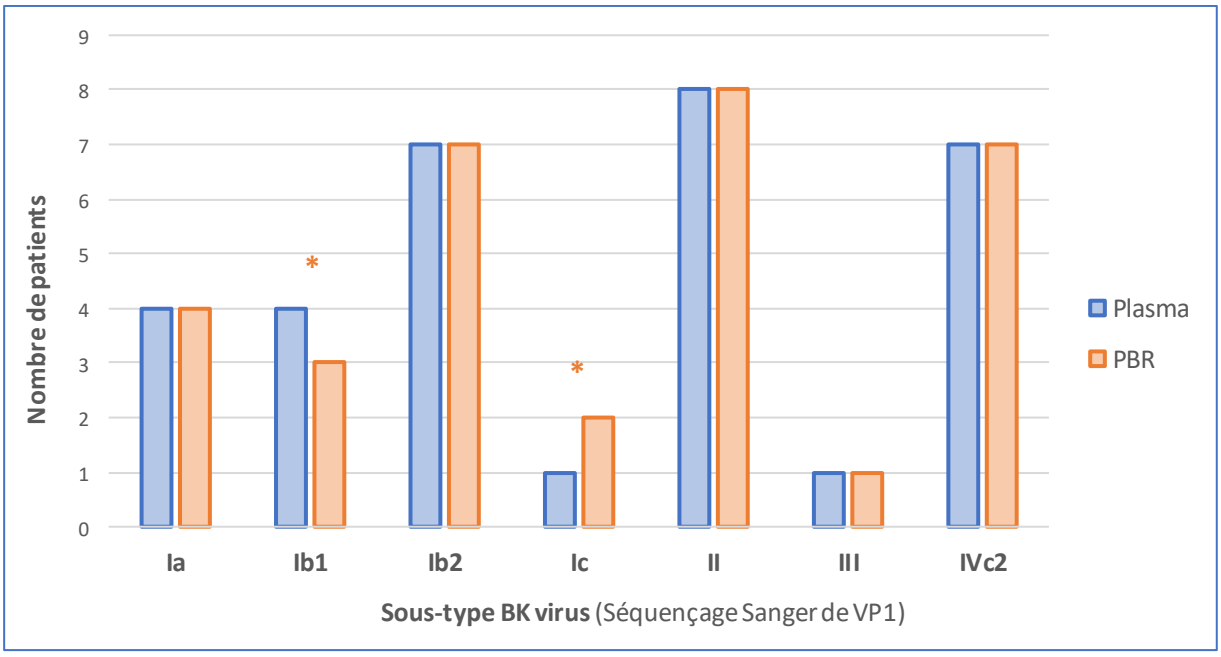


Figure 15. **Répartition des sous-types de BK virus identifiés par séquençage Sanger de VP1 dans les échantillons de PBR et de plasma au diagnostic de la BKVN.**

* Chez un patient, le séquençage Sanger de VP1 a identifié un sous-type différent dans la PBR (BKV-Ic) comparativement au plasma concomitant (BKV-Ib1).

Au diagnostic de BKVN, le séquençage VP1 retrouvait le même sous-type dans les 2 compartiments, sauf chez un patient pour lequel une souche BKPyV-Ic a été isolée dans la PBR, et une souche BKPyV-Ib1 dans le plasma concomitant (Tableau S1 : patient #20).

De plus, à la date de la BKVN, 81% (26/32) des patients présentaient des mutations non synonymes dans la séquence de VP1 dans le plasma comparativement à la séquence de référence du génotype correspondant (nombre médian : 2 ; IQR : 1-2) (Tableau 3). Dans la biopsie rénale concomitante, des mutations non synonymes étaient retrouvées dans la séquence de VP1 chez 78% (25/32) des patients comparativement à la séquence de référence du génotype correspondant (2 ; 1-3). Les mutations non synonymes étaient localisées dans la boucle BC dans respectivement 46% et 47% des cas (en gras dans le Tableau 3).

Au total, 56% (18/32) des patients présentaient la même séquence en acides aminés pour la protéine de capside VP1 dans les deux compartiments (plasma et parenchyme rénal) à la date de diagnostic de la BKVN.

Patient	**Génotype identifié en Sanger**	**Mutations non synonymes dans le gène de VP1 en Sanger** *(par rapport à la séquence de référence du génotype correspondant [VLP])*		
		Plasma 1ère virémie	**Plasma BKVN**	**Biopsie BKVN**
1	II	**D61N, N62D**	**D61N, N62D**	-
2	II		-	**D61N, N62D**
3	Ib2		**E82D**, K340R	**E82D**, K340R
4	IVc2	R215K	R215K	R215K
5	Ia		-	-
6	II		**D61N, N62D**, T210I	T210I
7	Ib2	-	**E82D**	**S77K, E82D**
8	Ib2	**E82D**	**E82D**	**E82D**
9	II		**D61N, N62D**, Q138E	**D61N, N62D**, Q138E
10	Ib2		-	-
11	Ib1		-	-
12	IVc2	R215K	R215K	**D77Y**, R215K
13	IVc2	R215K	R215K	A136V, P138E, R215K
14	Ib2	**E82D**, K340R	**E82D**, K340R	**E82D**, K340R
15	II	**D61N, N62D**	**D61N, N62D**	**D61N, N62D**
16	Ia	D158E, T171S, T219A, L225F, I329V	D158E, T171S, T219A, L225F, I329V	D158E, T171S, T219A, L225F, I329V
17	II	**D61N, N62D**	**D61N, N62D**	**D61N, N62D**, Q138E
18	Ib1	-	**E73K**	**E73K**
19	IVc2	-	-	-
20	Ib1	**E73K**	**E73K**, L211P	-
21	Ib2		K340R, L362V	K340R, L362V

22	Ic		**A72V, D82Q,** K83R	**A72V, D82Q,** K83R
23	II	**D61N, N62D**	-	**D61N, N62D**
24	II		**D61N, N62D**	**N60D, D61N, N62D**
25	III	**H62N, S71T, E77D, R83K**, R215K	**H62N, S71T, E77D, R83K**, R215K	**H62N, S71T, E77D, R83K**, R215K
26	IVc2	R215K	R215K	R215K
27	Ib2	K340R, L362V	K340R, L362V	-
28	Ia	D158E, T171S, T219A, L225F, I329V	D158E, T171S, T219A, L225F, I329V	D158E, T171S, T219A, L225F, I329V
29	Ib1	**E73K**	**E73K**	N139H
30	IVc2	**E77D**, R215K	H186Q, R215K	**E77D**, R215K
31	IVc2		R215K	R215K
32	Ia		T219A	D158E, T171S, T219A

Tableau 3**. Mutations non synonymes dans le gène VP1 en Sanger.**
Les séquences consensus obtenues en séquençage Sanger ont été comparées aux séquences de référence du génotype correspondant récupérées dans GenBank (et utilisées dans les VLPs) afin d'identifier les mutations non synonymes. Les résultats sont présentés pour les échantillons de plasmas et de biopsies rénales à la BKVN, et de plasmas à la 1ère virémie. Les cases vides correspondent aux échantillons manquants et les tirets aux échantillons pour lesquels aucune mutation non synonyme n'a été identifiée. Les mutations en gras correspondent à celles dans la boucle BC.

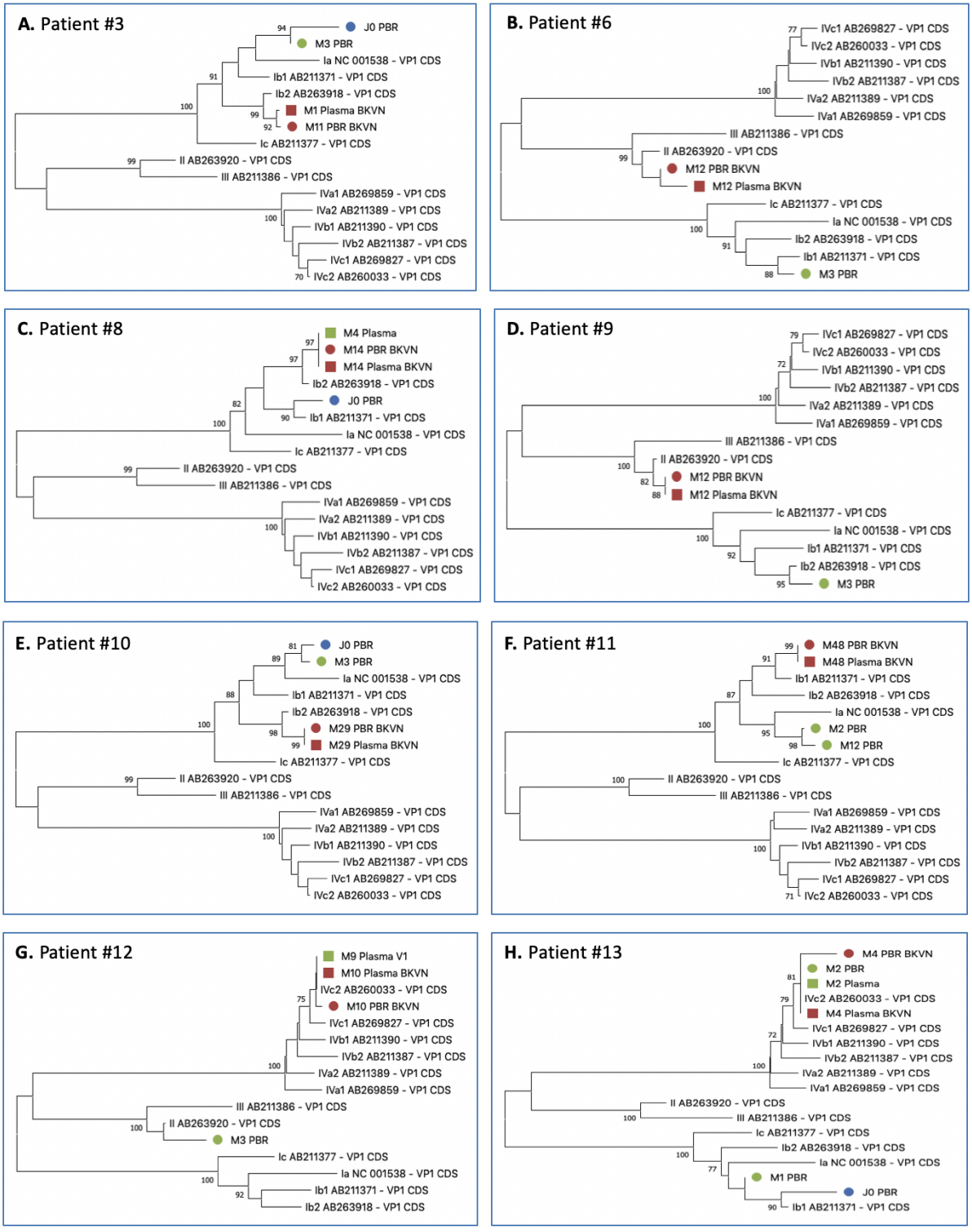
2.3.2. Analyse des échantillons de plasmas à la 1ère virémie BKPyV

Dix-neuf patients avaient un prélèvement de plasma correspondant à la date de la 1ère virémie analysable en Sanger. Le séquençage VP1 de ces échantillons a identifié le même sous-type que celui de la BKVN chez l'ensemble de ces patients. Parmi eux, 8/19 avaient eu une biopsie rénale concomitante. Dans ce cas, on retrouvait systématiquement la même souche de BKPyV dans les deux compartiments, correspondant donc à celle isolée au diagnostic de la BKVN (Tableau S1 : Patients #4, #8, #13, #23, #27, #30 and #32).

Parmi les 19 échantillons de plasmas à la date de la 1ère virémie, 89% présentaient une ou plusieurs mutation(s) non synonyme(s) dans la séquence de VP1 comparativement à la séquence de référence du génotype correspondant (nombre médian : 2 ; IQR : 1-2) (Tableau 3). Ces mutations non synonymes étaient localisées dans la boucle BC dans 47% des cas (en gras dans le Tableau 3). Au total, 84% (18/32) des patients présentaient la même séquence en acides aminés de VP1 dans le plasma à la date de la 1ère virémie et à la BKVN.

2.3.3. *Analyse des échantillons de biopsies antérieures à la BKVN*

A la date de greffe, le séquençage Sanger a été effectué pour 6 des 8 biopsies pré-implantatoires BKPyV-positives. Cinq de ces 6 échantillons avaient une souche de BKPyV différente de celle identifiée au moment de la BKVN. Un génotype différent était isolé dans le rein aux 2 dates chez les patients #13 (BKV-Ib1 vs. BKV-IVc2) et #18 (BKV-II vs. Ib1), et un sous-type BKPyV-I différent chez les 3 autres (Patients #3, #8, and #10) (Figure 16 et Tableau S1).



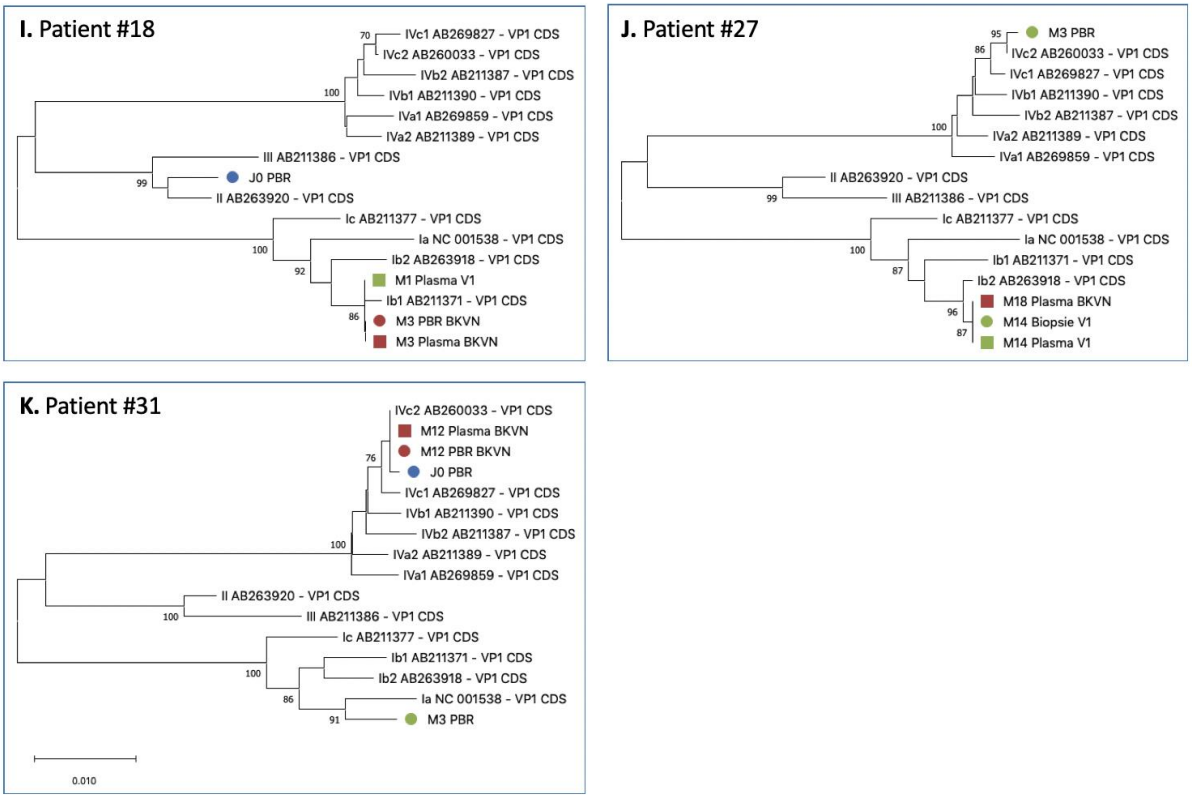


Figure 16. **Arbres phylogénétiques avec séquences Sanger VP1 des échantillons séquentiels de biopsies et de plasmas de la greffe au diagnostic de BKVN.**

Les arbres sont représentés pour les 11 patients de l'étude avec une ou plusieurs biopsies BKV-positives avant l'apparition de la virémie. Pour les 11 patients, le sous-type de BKV identifié sur la PBR à la date de greffe et/ou sur les prélèvements intermédiaires sans virémie différait du sous-type identifié à la date de BKVN (sauf pour la PBR J0 du patient #31).

Les échantillons séquencés sont identifiés par la date (J0, bleu ; pré-BKVN, vert ; BKVN, rouge) et le type (PBR, rond ; Plasma, carré) du prélèvement.

Après la transplantation, 8 patients avaient une biopsie BKPyV-positive avant l'apparition de la virémie. Le séquençage VP1 de ces échantillons retrouvait une souche différente de BKPyV à cette date comparativement à la souche de BKVN (Figure 16 et Tableau S1 : Patients #3, #6, #9, #10, #11, #12, #27 et #31). Parmi eux, 5/8 avaient également une biopsie BKPyV-positive à la date de greffe, dont deux pour lequel le séquençage des 2 échantillons retrouvait le même sous-type (Patients #3 and #10).

Au total, pour les 11 patients avec une ou plusieurs biopsies BKPyV-positive avant l'apparition de la virémie (à la date de greffe [N=8] et/ou M3 [N=7]), le séquençage VP1 a mis en évidence un switch du génotype dans le rein au moment de l'apparition de la virémie (arbres phylogénétiques pour les 11 patients en Figure 16).

2.4. Séquençage génome complet (WGS)

2.4.1. Mise au point

2.4.1.1. Sensibilité de la méthode

Afin de déterminer la sensibilité de la méthode, des échantillons purifiés de virus BK-Dunlop récoltés après infection de RPTE ont été préparés (cf. Partie 3 - Méthodes). A partir des stocks viraux, nous effectué des dilutions virales successives de 10^6 copies/ml à 10 copies/ml. Les virus ont été mélangés de l'ADN génomique humain, avant préparation des librairies et séquençage selon le protocole décrit précédemment. La technique de WGS du BKPyV avec sondes de capture permettait d'obtenir une couverture de 100% du génome du BKPyV jusqu'à une dilution de 100 copies/ml (Figure 17A), et ce malgré une profondeur de séquençage réduite pour des dilutions < 10^4 copies/ml (Figure 17B).

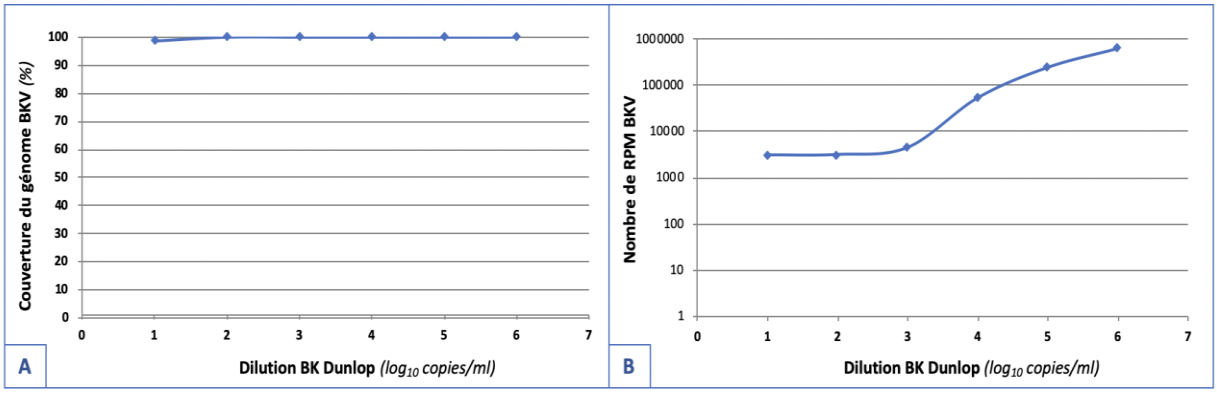


Figure 17. **Détermination de la sensibilité du WGS sur échantillons purifiés de BK-Dunlop à des dilutions successives.**
A. Pourcentage de couverture du génome BKPyV obtenu en WGS en fonction de la dilution virale.
B. Nombre de RPM (*reads* BKPyV par million soit le nombre de *reads* BKPyV/ nombre de *reads* totaux x 10^6) en fonction de la dilution virale.

2.4.1.2. Analyse de mélanges de sous-types de BKPyV

Afin de déterminer la capacité de la méthode de WGS BKPyV à discriminer la présence de différents sous-types au sein d'un même échantillon, nous avons effectué des mélanges prédéfinis de virus BKPyV produits au laboratoire. Plus précisément, nous avons réalisé des mélanges de BKPyV-Ia et Ib2 (deux sous-types du BKPyV-I), et de BKPyV-Ia et II (deux génotypes différents) dans les proportions suivantes : 10/90, 30/70, 50/50, 70/30 et 90/10. Après séquençage, la proportion des génotypes de BKPyV dans chaque mélange a été calculée en prenant en compte la profondeur d'alignement (pipeline 1).

Pour les deux types de mélanges, le WGS retrouvait la présence des deux populations virales dans des proportions proches de celles définies en amont, sauf pour le mélange Ia (10%) / II (90%) dont l'analyse ne retrouvait que du BKPyV-II (Figure 18A-B). L'analyse des *reads* permettait également d'identifier dans chaque mélange la séquence consensus du sous-type majoritaire et du sous-type minoritaire (arbres phylogénétiques en Figure 18C-D).

La technique de WGS du BKPyV avec sondes de capture avait donc une bonne capacité de discrimination des mélanges de génotypes BKPyV, y compris entre les différents sous-types (Ia versus Ib2 par exemple). Le seuil de détection d'une co-infection par deux génotypes ou sous-type était donc inférieur à 30%, et proche de 10%.

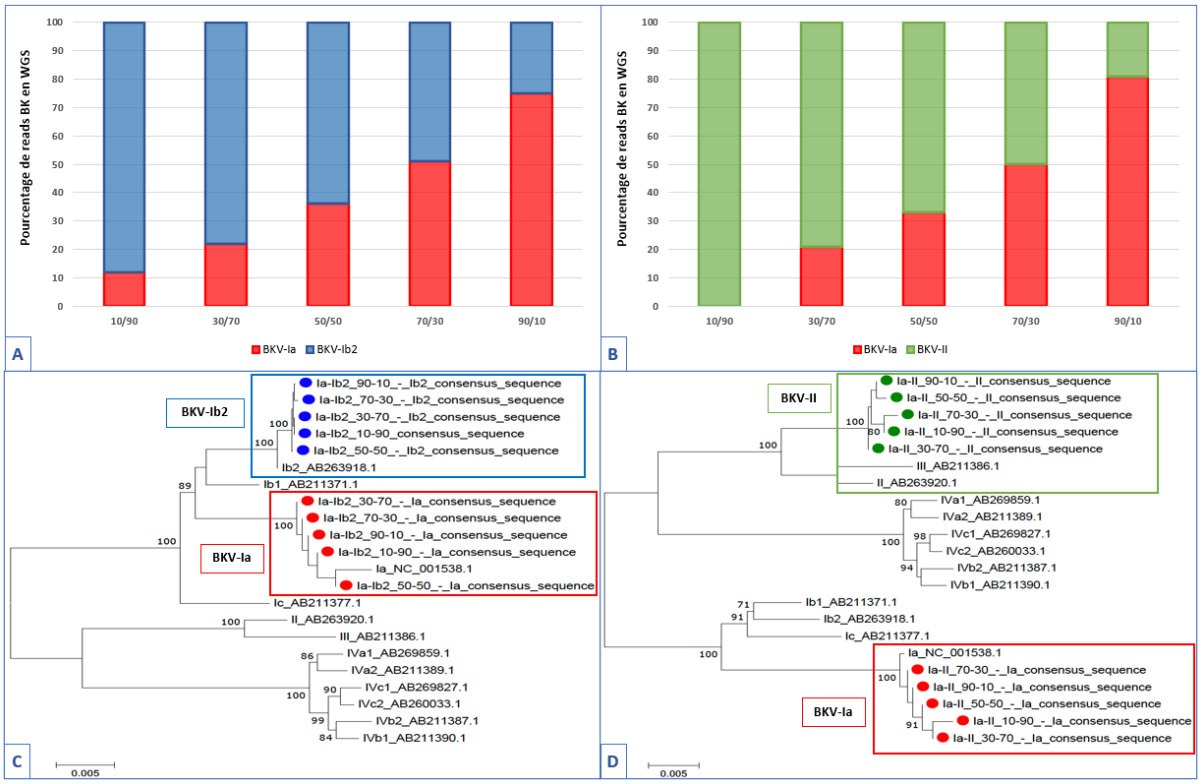


Figure 18. **Analyse des données de WGS de mélanges de BKPyV (pipeline 1).**

A-B. Pourcentage de *reads* BKPyV alignés par BLASTN sur les sous-types BKPyV-Ia/Ib2 (**A**) ou BKPyV-Ia/II (**B**), pour chacune des proportions définies en amont (indiquées en abscisse). Tous les *reads* indéterminés ont été exclus. Seuls les sous-types avec une couverture > 75% ont été pris en compte. Le calcul des proportions a été fait en prenant en compte la profondeur d'alignement des différents sous types.

C-D. Arbres phylogénétiques avec les séquences consensus du sous-type majoritaire et du sous-type minoritaire de chaque mélange (selon la méthode de Neighbor-joining).

2.4.2. Séquençage des échantillons cliniques

2.4.2.1. Données de séquençage WGS et d'alignement

Le WGS du BKPyV a été effectué sur 104 prélèvements au total dont 49 échantillons de plasmas (29 à la date de la BKVN, et 20 à la date de la 1ère virémie), et 55 échantillons de biopsies rénales (29 à la date de la BKVN, et 26 effectuées entre la greffe et le diagnostic). Les détails concernant les données de séquençage des échantillons à la date de la BKVN (charge virale BKPyV, nombre de *reads* bruts, nombre et pourcentage de *reads* alignés sur le génome du BKPyV, pourcentage de couverture et profondeur d'alignement) sont présentés dans le Tableau 4. Les données concernant les échantillons de plasmas et de biopsies antérieurs à la BKVN sont décrits dans le Tableau S2.

Au total, 93 des 104 échantillons permettaient d'obtenir une couverture du génome BKPyV supérieure à 90%, et ont été conservés pour l'analyse. Pour les échantillons de biopsie rénale à la date de la BKVN, la médiane de couverture du génome du BKPyV était de 97,9% (IQR : 97,9-98,2) et la profondeur moyenne d'alignement de 8551 (1769-11605). Pour les échantillons de plasma, les valeurs respectives étaient de 100% (99,1-100) et 6819 (423-20335) (Tableau 4). Les échantillons antérieurs à la BKVN avaient des pourcentages de couverture similaires (respectivement 99% et 100% pour les biopsies et les plasmas), mais des profondeurs d'alignement plus faibles (plasmas à la 1ère virémie : médiane 289 [81-1167] ; biopsies pré-BKVN : 70 [10-763]) (Tableau S2).

Dans tous les cas, il existait une corrélation positive entre la charge virale BKPyV de l'échantillon et la profondeur d'alignement (coefficient de corrélation de Pearson de 0,82 et 0,26 respectivement pour les échantillons de biopsie et de plasma à la BKVN [Figure S2]).

Tableau 4. **Données de séquençage WG des échantillons à la date de la BKVN.**
La charge virale BKPyV, le nombre de *reads* bruts après séquençage, le nombre de *reads* mappés sur le génome du BKPyV, le pourcentage de couverture du génome viral et la profondeur d'alignement sont indiqués pour les échantillons de plasma et de biopsie à la date de la BKVN des 29 patients analysés. Les échantillons en rouge correspondent à ceux pour lesquels la couverture virale était inférieure à 90% (et qui n'ont pas été pris en compte dans l'analyse).

Numéro patient	Biopsie BKVN						Plasma BKVN					
	PCR BKV *(logUI/10^6 cell)*	Nombre de reads bruts	Nombre de reads alignés	% reads mappés	% couverture	Profondeur moyenne	PCR BKV *(logUI/ml)*	Nombre de reads bruts	Nombre de reads alignés	% reads mappés	% couverture	Profondeur moyenne
1	4,72	54142	335	0,6%	72,5	5	5,5	2251436	1690546	75,1%	100	36152
2	6,76	215504	134086	62,2%	100	2902	4,78	1667850	1022222	61,3%	99,1	20335
3	8,53	448506	401111	89,4%	100	8552	5,19	832638	669287	80,4%	100	12853
4	8,63	401536	363834	90,6%	100	8016	6,27	1348460	1098178	81,4%	100	22514
5	9,35	637214	599435	94,1%	97,9	13689	4,6	27088	2618	9,7%	71,3	54
6	7,59	83514	24881	29,8%	98,2	531	3,12	6806	871	12,8%	70,8	19
7	10,48	742952	685940	92,3%	97,7	15021	6,44	652450	474854	72,8%	100	9314
8	9,8	602802	559702	92,9%	97,9	12806	6,01	585120	432890	74,0%	100	8782
9	7,36	395286	295901	74,9%	97,9	6355	4,06	59384	20491	34,5%	99,8	423
10	4,05	101244	984	1,0%	96,1	18	6,35	3751356	2983597	79,5%	97,6	61793
11	9,59	656564	617373	94,0%	97,9	13712	5,35	1051124	797503	75,9%	97,6	16500
12	9,48	640086	600626	93,8%	98,1	13324	4,06	3399740	2918233	85,8%	100	76005
13	5,67	227916	207398	91,0%	97,9	4591	6,09	1579206	1339632	84,8%	100	29163
14	8,88	514586	469796	91,3%	97,9	11247	4,78	1040052	261085	25,1%	100	5430
15	8,37	515986	425935	82,5%	97,9	9853	5,38	59366	2618	4,4%	99,9	55
16	4,68	461444	12021	2,6%	98,3	274	4,07	63084	25259	40,0%	99,7	582
17	8,38	474500	454116	95,7%	98	9934	5,5	2957378	1666220	56,3%	100	34099
18	5,62	211452	77635	36,7%	97,9	1769	6,57	258438	119475	46,2%	100	2380
19	8,9	564698	519121	91,9%	97,9	11605	6,72	461608	375179	81,3%	100	7562
20	4,08	134804	4956	3,7%	99,8	109	3,66	94248	2757	2,9%	93	47
21	5,36	42896	4820	11,2%	98,2	112	4,26	427480	71439	16,7%	100	1433
22	9,25	537732	509388	94,7%	99,5	11212	6,22	837944	727,832	0,1%	100	13425
23	7,89	527188	485069	92,0%	97,9	11208	4,88	232626	89707	38,6%	100	1801
27	6,43	170438	131272	77,0%	97,9	2797	5,39	25136	9964	39,6%	100	210
28	7,45	520342	527116	101,3%	97,8	10772	5,58	2113678	1490459	70,5%	100	29245
29	8,98	1257784	1182271	94,0%	97,9	25614	5,06	686754	356893	52,0%	100	6819
30	7,95	680770	635978	93,4%	98	13432	3,96	64422	14297	22,2%	98	271
31	5,87	112558	78320	69,6%	98	1698	4,27	277820	70887	25,5%	99,9	1377
32	6,45	360172	307591	85,4%	100	6509	3,83	77352	3615	4,7%	82,4	68
MÉDIANE	7,89	461444	401111	90,6%	97,9	8552	5,19	585120	261085	46,2%	100	6819
Q1	5,87	211452	78320	62,2%	97,9	1769	4,26	77352	14297	22,2%	99,1	423
Q3	8,9	564698	527116	93,4%	98,2	11605	6,01	1348460	1022222	75,1%	100	20335

2.4.2.2. Comparaison WGS / Sanger

Les séquences consensus majoritaires obtenues en WGS ont été alignées avec 36 séquences de référence de BKPyV issues de GenBank (trois par sous-type), afin d'identifier le génotype de la population virale majoritaire dans chaque échantillon. Les résultats de l'alignement pour les échantillons de plasma et de biopsie à la date de la BKVN sont présentés dans la Figure 19. Pour le typage du BKPyV, le taux de concordance entre les deux méthodes de séquençage (Sanger et WGS) était respectivement de 100% et 96% dans le plasma et le rein. Le même sous-type de BKPyV était identifié dans les 2 compartiments en WGS au diagnostic de BKVN chez tous les patients avec des échantillons concomitants analysables (Tableau 5). En particulier, la seule discordance observée en Sanger (patient #20) a été infirmée par le WGS qui retrouvait la présence du BKPyV-Ib1 dans les deux compartiments au diagnostic de BKVN, ainsi que dans le plasma à la 1ère virémie.

Pour les échantillons de biopsie et de plasmas antérieurs à la BKVN analysables en WGS, le pourcentage de concordance entre le génotype identifié en Sanger et en WGS était respectivement de 91% pour les biopsies pré-BKVN et 100% pour les plasmas à la date de la 1ère virémie. Le séquençage WGS confirmait l'évolution virale dans la biopsie rénale observée chez certains patients en Sanger, avec un switch de génotype au moment de l'apparition de la virémie (comme illustré pour les patients #3 et #13 en Figure S1).

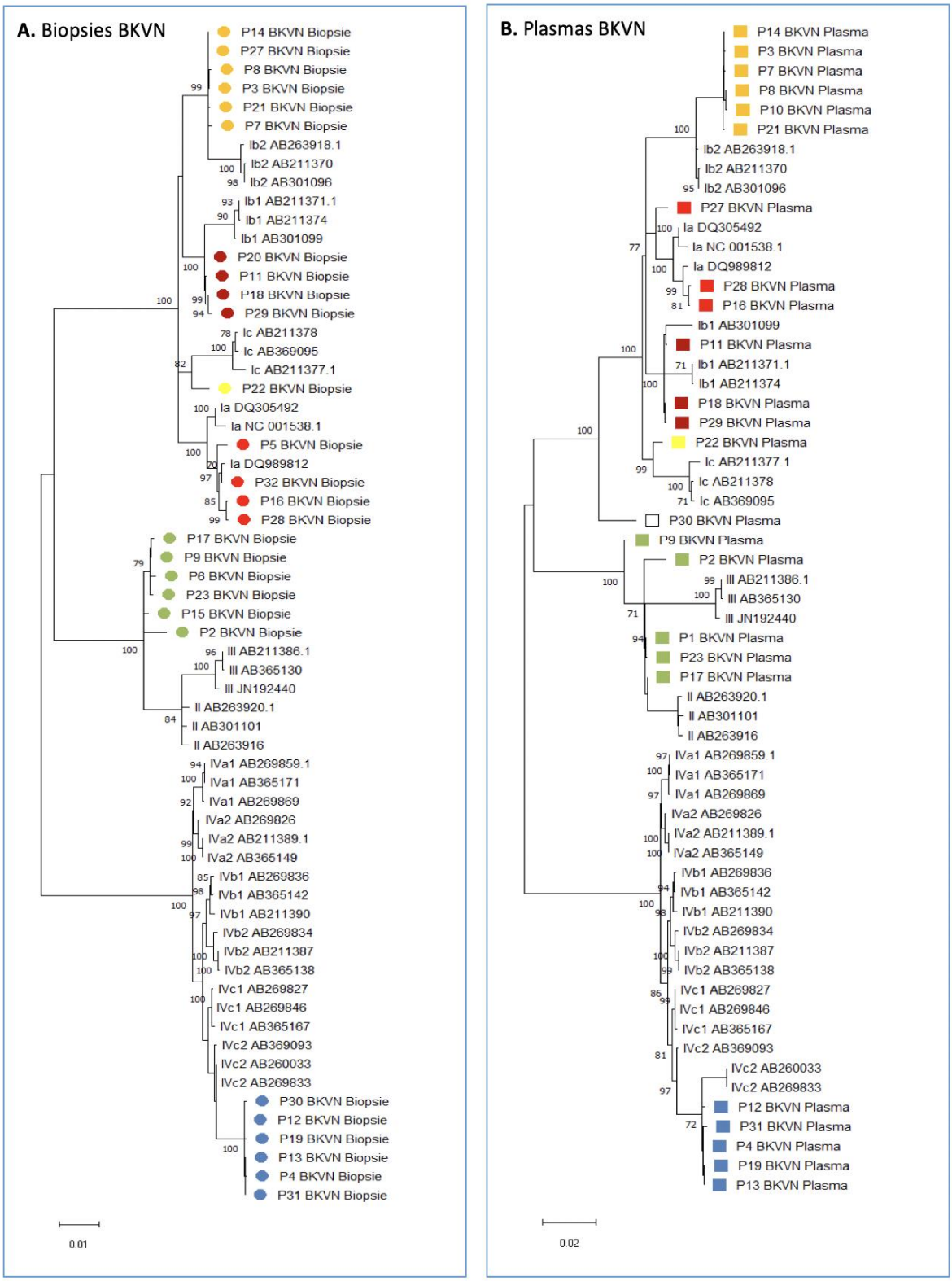


Figure 19. **Arbres phylogénétiques avec séquences consensus majoritaires en WGS des échantillons de plasmas et de biopsies à la date de la BKVN.**

Les arbres ont été construits selon la méthode Neighbor Joining (1000 réplicas de boostrap ; modèle Tamura-3, distribution gamma avec sites invariants). Le génotype correspondant à la séquence consensus majoritaire de l'échantillon est identifié par la couleur (Ia, rouge; Ib1, pourpre; Ib2, orange; Ic, jaune; II/III, vert; IVc2, bleu).

Numéro patient	Biopsie BKVN			Plasma BKVN		
	Consensus Sanger VP1	Consensus majoritaire WGS	Co-infection (WGS)	Consensus Sanger VP1	Consensus majoritaire WGS	Co-infection (WGS)
1	II	-	-	II	II	Non
2	II	II	Non	II	II	Non
3	Ib2	Ib2	Ib2 (71) / Ia (18)	Ib2	Ib2	Ib2 (76) / Ic (24)
4	IVc2	IVc2	Non	IVc2	IVc2	Non
5	Ia	Ia	Non	Ia	-	-
6	II	II	Non	II	-	-
7	Ib2	Ib2	Ib2 (71) / Ia (19)	Ib2	Ib2	Ib2 (62) / Ia (17)
8	Ib2	Ib2	Ib2 (73) / Ia (17)	Ib2	Ib2	Ib2 (52) / Ia (17)
9	II	II	Non	II	II	Non
10	Ib2	-	-	Ib2	Ib2	Ib2 (59) / Ia (18)
11	Ib1	Ib1	Ib1 (64) / Ia (21)	Ib1	Ib1	Ib1 (56) / Ia (17)
12	IVc2	IVc2	Non	IVc2	IVc2	Non
13	IVc2	IVc2	Non	IVc2	IVc2	Non
14	Ib2	Ib2	Ib2 (75) / Ia (15)	Ib2	Ib2	Ib2 (69) / Ia (19)
15	II	II	Non	II	-	-
16	Ia	Ia	Non	Ia	Ia	Non
17	II	II	Non	II	II	Non
18	Ib1	Ib1	Ib1 (75) / Ia (25)	Ib1	Ib2	Ib1 (76) / Ia (21)
19	IVc2	IVc2	Non	IVc2	IVc2	Non
20	Ic	Ib1	Non	Ib1	Ib1	Non
21	Ib2	Ib2	Non	Ib2	Ib2	Ib2 (83) / Ia (17)
22	Ic	Ic	Ic (58) / Ia (29)	Ic	Ic	Ic (42) / IVc2 (31)
23	II	II	Non	II	II	Non
27	Ib2	Ib2	Ib2 (78) / Ia (22)	Ib2	Ib2	Non
28	Ia	Ia	Non	Ia	Ia	Non
29	Ib1	Ib1	Ia (29) / Ic (58)	Ib1	Ib1	Ib1 (50) / IVc2 (31)
30	IVc2	IVc2	Non	IVc2	IVc2	Non
31	IVc2	IVc2	Non	IVc2	IVc2	Non
32	Ia	Ia	Non	Ia	-	-

Tableau 5. **Génotype majoritaire et coinfections identifiées en Sanger et WGS dans les échantillons de plasma et de biopsie à la BKVN**

Les séquences consensus correspondant au génotype majoritaire obtenues en séquençage Sanger VP1 et en WGS (variant majoritaire), ainsi que la présence ou de non de co-infections détectées en WGS (seuil > 10%) sont décrites. En cas de co-infection par plus de 2 sous-types, seuls les deux génotypes majoritaires (ainsi que leurs proportions respectives) ont été pris en compte. Les échantillons en bleu correspondent à ceux pour lesquels une discordance était observée entre les deux méthodes ; ceux avec un tiret correspondent aux échantillons non analysables.

2.4.2.3. Recherche de co-infections

Pour la recherche de co-infection, les données de séquençage WGS ont été analysées avec le pipeline 1. Seuls les sous-types de BKPyV détectés avec une proportion supérieure à 10% (correspondant au seuil de détection déterminé lors des expériences de mise au point [cf. 2.4.1.2.]) ont été pris en compte. Parmi les échantillons analysables, une co-infection par deux ou plusieurs sous-types de BKPyV était détectée dans 32% (28/86) des cas. Les résultats concernant les échantillons à la date de la BKVN sont présentés dans le Tableau 5.

Numéro patient	Date	Prélèvement	Proportions des différents sous types de BKV en WGS (%)					
			Ia	Ib1	Ib2	Ic	II	IVc2
3	J0	Biopsie	**100**		0			
	M3	Biopsie	**67**	33	0			
	BKVN (M11)	Biopsie	18		**71**	11		
		Plasma	0		**76**	24		
6	M3	Biopsie	32	**68**			0	
	BKVN (M12)	Biopsie		0			**100**	
8	J0	Biopsie	26	**74**	0			
	M4	Biopsie	18	0	**72**	10		
		Plasma		0	**100**			
	BKVN (M14)	Biopsie	17	0	**73**	10		
		Plasma	17	0	**58**	14		
9	M3	Biopsie			**100**		0	
	BKVN (M12)	Biopsie			0		**100**	
		Plasma			0		**100**	
11	M2	Biopsie	**100**	0				
	M12	Biopsie	**100**	0				
	BKVN (M48)	Biopsie	17	**56**		20		
		Plasma	21	**64**		15		
12	M3	Biopsie					**100**	0
	BKVN (M10)	Biopsie					0	**100**
		Plasma					0	**100**
13	J0	Biopsie	**100**					0
	M1	Biopsie	**62**					38
	M2	Biopsie	10					**87**
		Plasma	0					**100**
	BKVN (M4)	Biopsie						**100**
		Plasma	0					**100**

Tableau 6. **Coinfections BKPyV identifiées en WGS dans les patients avec biopsies rénales séquentielles BKV-positives.**

Les proportions des différents sous-types de BKPyV identifiés en WGS dans les biopsies rénales séquentielles de la greffe à la BKVN et les échantillons de plasmas concomitants sont présentés pour 7 des 11 patients avec un switch de génotype dans le rein identifié en Sanger. Le sous-type identifié

avant le début de la virémie est surligné en vert et le sous-type responsable de la BKVN en orange. Le sous-type majoritaire est représenté en gras.

Au diagnostic de la néphropathie, 33% des échantillons de biopsie rénale et 35% des échantillons de plasmas présentaient une confection. Il s'agissait dans tous les cas d'une co-infection par plusieurs sous-types de BKPyV-I, à l'exception de 2 patients pour lesquels l'analyse des biopsies à la BKVN -retrouvait une co-infection par le BKPyV-I et BKPyV-IV (Tableau 5 : patients #22 et #29). En cas de co-infection, les mêmes sous-types étaient le plus souvent retrouvés dans les échantillons de plasmas en cas de virémie concomitante.

Les patients avec plusieurs biopsies rénale BKPyV-positives (décrits dans la Figure 16) ont été analysés plus spécifiquement (Tableau 6). Le sous-type de BKPyV détecté dans la biopsie avant l'apparition de la virémie était retrouvé en proportion minoritaire à la date de la BKVN chez deux d'entre eux (patients #3 et #11). En revanche, le sous-type de BKPyV responsable de la BKVN n'était jamais détecté à la date de la greffe, même en faible quantité. Pour les 8 biopsies avec un plasma concomitant analysable, une co-infection était retrouvée dans les 2 compartiments pour trois d'entre elles, avec les mêmes génotypes. De façon intéressante, chez 2 patients (#8 et #13), le sous type de la BKVN est déjà détecté dans le plasma 12 et 2 mois avant, respectivement. Enfin, pour le patient #13, le WGS a mis en évidence un remplacement progressif de la souche de BKPyV-I détectée dans le rein au moment de la greffe (souche du donneur), par la souche de BKPyV-IV circulant dans le plasma dès M2 et responsable de la néphropathie à M4. Tous les échantillons pour ce dernier patient #13 avaient une profondeur d'alignement supérieure à 300 rendant interprétable l'évolution génotypique observée.

2.4.2.4. Etude de la compartimentalisation

Les séquences consensus des variants majoritaires isolés dans le plasma et la biopsie rénale à la date de diagnostic de la BKVN ont été comparées (N=21 patients avec couples de prélèvements biopsie/plasma analysables).

L'alignement des séquences consensus du plasma et de la biopsie à la date de la BKVN retrouvait un taux d'homologie supérieur à 99% dans tous les cas. Au total, 221 SNP ont été identifiés chez les 21 patients (moyenne de 10 par patient, dont 3 mutations SNP non synonymes). La localisation et le type des SNP identifiés sont représentés dans la Figure 20 (données complètes dans le Tableau S3).

Quinze des 21 patients présentaient des polymorphismes nucléotidiques entre les deux séquences, dont 8 avec une ou plusieurs mutations non synonymes. Celles-ci prédominaient dans la séquence codante des gènes de la région codante tardive à savoir la protéine Agno, et les protéines de capside VP1, VP2, et VP3.

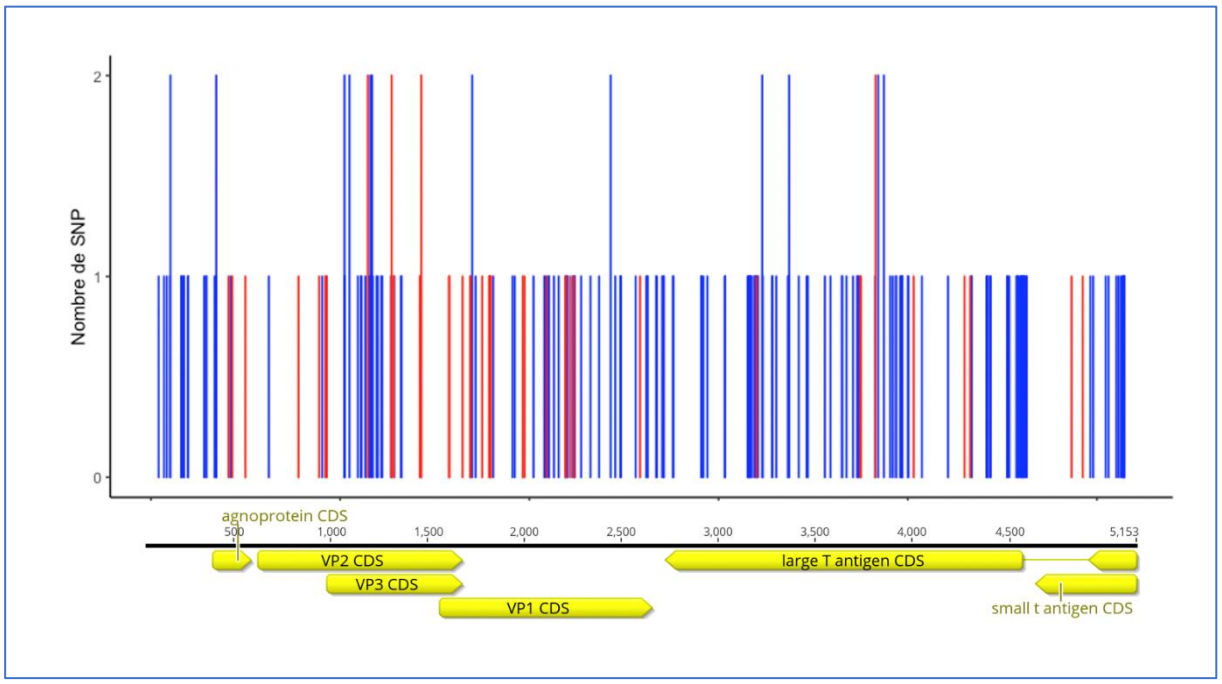


Figure 20. **Nombre et distribution des mutations synonymes et non synonymes le long du génome du BKPyV dans le plasma versus biopsie à la BKVN.**
Le nombre de mutations synonymes (en bleu) et non synonymes (en rouge) dans les séquences consensus majoritaires en WGS des échantillons de plasma versus biopsie rénale à la date de la BKVN sont indiquées pour tous les patients, ainsi sur leur position sur le génome du BKPyV.

Afin d'étudier plus précisément la diversité virale du BKPyV dans les différents compartiments biologiques et au cours du temps, la présence de variants minoritaires a également été quantifiée et étudiée. Un ou plusieurs variants minoritaires (au seuil de 1%) était retrouvés dans 62 prélèvements. La présence de variants minoritaires était détectée plus fréquemment dans les échantillons à la date de la BKVN, comparativement aux échantillons antérieurs. En particulier, 22/27 (81%) des biopsies à la BKVN avaient au moins un variant minoritaire, contre seulement 9/16 (56%) des biopsies antérieures. De même, au moins un variant minoritaire était détecté dans 73% (19/26) des plasmas à la date de la BKVN, contre 50% (8/16) à la date de la 1ère virémie. La diversité intra-échantillon des populations virales était donc plus importante au diagnostic de la BKVN, en particulier dans le rein.

La Figure 21 présente les statistiques de mutations synonymes, non-synonymes, et insertions / délétions (ou décalage de cadre de lecture) par gène et par type d'échantillon. Le nombre de mutations synonymes et non synonymes prédominaient dans les gènes codant pour les protéines VP1, VP2, LTAg, et Agno. Aucune mutation n'a été détectée dans la séquence codant pour VP3.

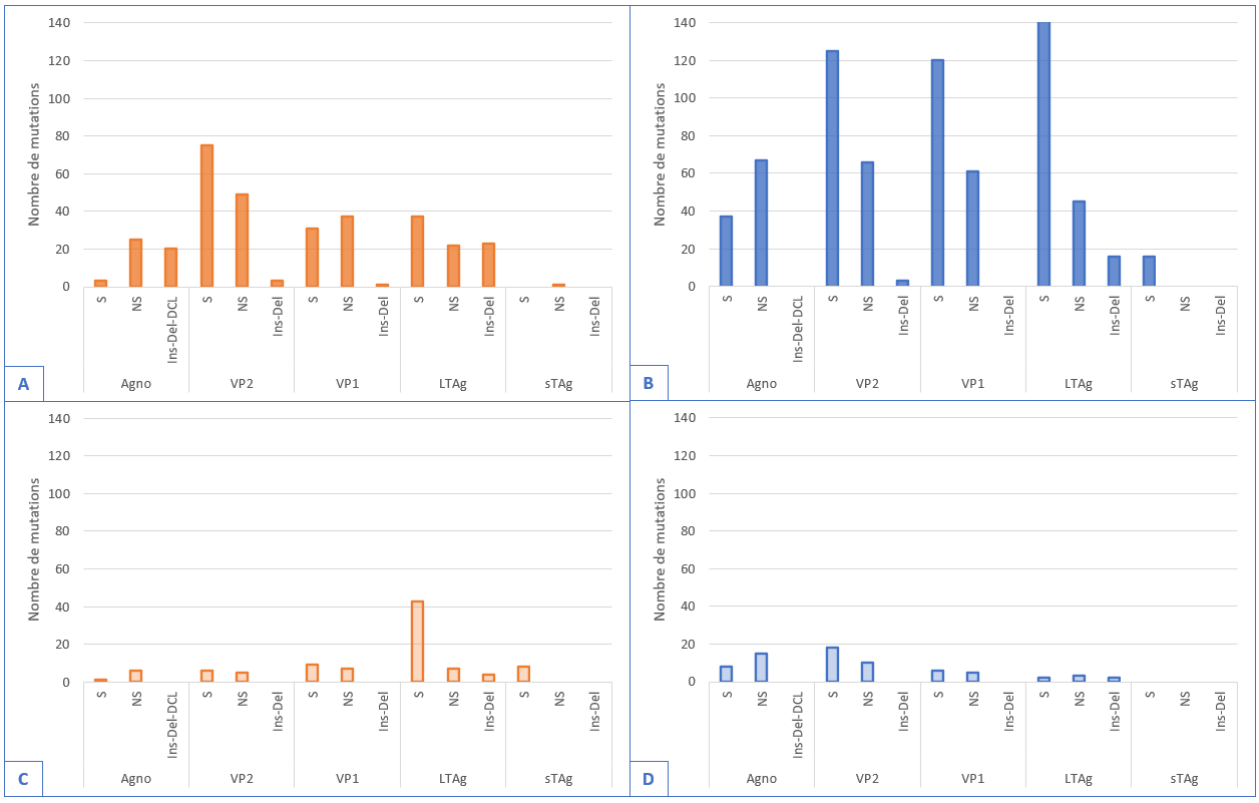


Figure 21. **Nombre et types de mutations identifiées dans les séquences codantes du génome du BKPyV après analyse des variants minoritaires en WGS des différents échantillons.**

Le nombre de mutations synonymes (S), non synonymes (NS) et d'insertion-délétion-décalage du cadre de lecture (Ins-Del-DCL) identifiées dans les séquences codantes de Agno / VP2 / VP1 / LTAg / sTAg après analyse des variants minoritaires sont représentés pour les échantillons de biopsie à la date de BKVN (**A** : N=27), de plasmas à la date de BKVN (**B** : N=26), de biopsies pré-BKVN (**C** : N=16), et de plasmas à la date de la 1ère virémie (**D** : N=16).

3. Discussion

3.1. Réplication du BKPyV dans les compartiments biologiques après greffe rénale

A la date de diagnostic de la BKVN, l'ADN du BKPyV était détecté à des charges virales élevées dans tous les échantillons de biopsie rénale et de plasmas concomitants. Le séquençage Sanger de la protéine de capside VP1 et le WGS identifiaient le même génotype dans les 2 compartiments chez tous les patients. Au diagnostic de la néphropathie, la souche de BKPyV circulant dans le plasma est donc celle qui est responsable de la néphropathie. Le génotype I était largement prédominant (50% des échantillons), devant le génotype IVc2 (23%). Ces données sont concordantes avec celles des études précédentes, confirmant la prédominance des sous-types BKPyV-I et BKPyV-IVc2 dans la population d'Europe de l'Ouest [143]. Nous avons également retrouvé une prévalence élevée d'infection par le BKPyV-II (25% des échantillons), de manière similaire à ce qui avait été observé dans une autre étude récente en Espagne [140]. Ceci pourrait être lié au fait que près d'un tiers des patients de l'étude étaient originaires d'Afrique, une région où la prévalence du génotype II est plus élevée qu'en Europe, ou en Asie [144].

A la date de greffe, 40% (8/20) des biopsies préimplantatoires (correspondant au rein du donneur) étaient positives pour la détection de l'ADN du BKPyV (sans signes histologiques de lésions viro-induites après relecture en anatomopathologie). Cette proportion était significativement plus importante comparativement à la population contrôle qui ne développait pas de néphropathie (2%, $p<0.0001$). Le tractus uro-génital étant le site de latence principal du BKPyV, la détection de l'ADN viral dans les biopsies rénales au moment de la greffe n'est pas étonnante [8]. Plusieurs études anatomopathologiques ont retrouvé la présence de l'ADN du BKPyV dans le tissu rénal de 17 à 30% de sujets sains, avec des techniques variables [43,44]. Chez les transplantés rénaux, l'analyse virologique de fragments congelés de 69 biopsies rénales préimplantatoires, retrouvait la présence d'ADN du BKPyV par PCR dans 5/57 (8.8%) des échantillons, bien qu'aucun d'entre eux n'ait développé de BKVN au décours [205]. Le taux élevé de de biopsies BKPyV-positives à la date de greffe observé dans notre population pourrait être lié à un biais d'échantillonnage, avec une proportion plus importante de prélèvements contenant de la médulla, qui constitue le site de latence principal du BKPyV. Les différences concernant les caractéristiques de la greffe entre les cas et les contrôles (score c-PRA, mismatch HLA, traitement d'induction), mais aussi les caractéristiques

des donneurs (non disponibles) pourraient également expliquer la différence entre les deux groupes.

Entre la greffe et le diagnostic de BKVN, parmi les patients avec un ou plusieurs échantillons de plasma BKPyV-positifs analysables, le séquençage a identifié le même génotype dans tous les échantillons, du début de la virémie au diagnostic de BKVN (en Sanger et WGS). Le séquençage précoce des échantillons de plasma identifie donc la souche de BKPyV ultérieurement responsable de la néphropathie, et ce dès le début de la virémie BKPyV.
Dans le compartiment rénal, l'ADN du BKPyV était détecté dans les biopsies effectuées entre la greffe et le diagnostic chez 15/24 (63%) patients, dont 8 avant le début de la virémie. De même qu'à la date de greffe, la relecture de ces échantillons en anatomopathologie ne retrouvait pas de lésions viro-induites suggérant que le BKPyV y est présent à l'état latent. Les données concernant l'évaluation de la charge virale intra-rénale sur les biopsies effectuées au cours du suivi sont limitées. Pourtant, du fait du risque de faux négatifs lors de la PBR (jusqu'à 30%), la détection de l'ADN du BKPyV dans le tissu rénal pourrait permettre un diagnostic plus précoce de l'infection. Dans une étude rétrospective monocentrique, Randhawa et al. retrouvaient que 38% (19/50) des biopsies de patients avec BKVN réalisées entre la greffe et le diagnostic étaient positives pour la détection du BKPyV [206]. Plus récemment, dans une étude rétrospective française, chez 8 patients avec BKVN ayant eu une PBR avant le diagnostic, la PCR BKV *in situ* était déjà positive chez 5 (62.5%) d'entre eux dans un délai médian de 7 mois avant le diagnostic et avec une charge virale déjà élevée [207].

Au total, notre étude démontre que l'ADN du BKPyV est détectable de manière précoce dans le greffon des patients transplantés rénaux qui vont développer une BKVN, dès la date de transplantation et/ou avant la survenue de la virémie chez certains d'entre eux. L'analyse de la souche circulant dans le plasma lors de l'apparition de la virémie permet quant à elle d'identifier la souche ultérieurement responsable de la BKVN. L'analyse longitudinale comparée de la PCR BKPyV dans le plasma et dans le parenchyme rénal (possible dès le jour de la greffe et qui n'est actuellement pas effectuée en routine), pourrait donc permettre de mieux comprendre la dynamique de réplication du BKPyV chez le transplanté rénal et son impact sur la survenue éventuelle de la BKVN.

3.2. Evolution virale du BKPyV dans le rein des patients avec BKVN

Chez les patients transplantés rénaux, l'origine de la souche responsable de la BKVN reste débattue. Comme évoqué en introduction, sur la base de données épidémiologiques et sérologiques, et du fait de la persistance du BKPyV dans le tractus uro-génital, le greffon est considéré comme étant la source principale de transmission du BKPyV [116]. Cependant, bien qu'une nouvelle souche de BKPyV puisse être transmise par le donneur lors de la greffe, la souche de BKPyV latente chez le receveur reste largement prédominante dans la vessie, les reins natifs, et les uretères où le BKPyV est distribué à la suite de la primo-infection [44]. Récemment, l'analyse d'échantillons urinaires de couples donneurs vivant / receveurs, a montré que plus de 60% des transplantés rénaux avec une virurie BKPyV avaient une ou plusieurs souche(s) virales distinctes de celles du donneur [208].

Notre étude était la première à analyse de manière longitudinale et comparative des échantillons de plasma et de rein (qui constitue le site de latence et de réplication principal du BKPyV). Le séquençage Sanger des biopsies BKPyV-positives effectuées avant le début de la virémie identifiait un génotype de BKPyV différent de celui responsable de la BKVN dans tous les cas sauf un. Ainsi, chez 11 des 32 patients de notre étude, la souche de BKPyV isolée dans le rein avant la virémie en particulier à la date de greffe (correspondant à la souche du donneur), n'était pas celle responsable de la BKVN. En revanche, une fois la virémie BKPyV détectable, le génotype identifié dans le rein était le même que dans le plasma, à savoir celui responsable de la BKVN. Ces données ont été confirmées par le WGS, qui retrouvaient également un switch génotypique de la souche de BKPyV isolée dans le rein, au moment de l'apparition de la virémie.
De plus, l'analyse en WGS retrouvait une co-infection par plusieurs sous-types chez près d'un tiers des patients. En particulier, le génotype identifié à la date de greffe était retrouvé en proportion minoritaire chez deux d'entre eux à la date de greffe. De plus, on observait chez un patient, le remplacement progressif de la souche de BKPyV-I isolée dans la biopsie pré-implantatoire, par la souche de BKPyV-IV circulant dans le plasma et responsable de la néphropathie *in fine*.

Sur la base des données de ce travail de thèse, nous émettons l'hypothèse qu'au décours de la transplantation rénale, du fait du déficit immunitaire cellulaire et humoral induit par les traitements anti-rejets, la ou les souches de BKPyV latentes du receveur sont susceptibles de

se réactiver, et de coloniser secondairement le greffon suite à une phase de virémie. Ce mécanisme pourrait expliquer le switch génotypique ainsi que les coinfections observées dans notre étude chez une partie des patients.

Ces résultats demandent à être confirmés de manière prospective par l'analyse d'une plus large cohorte de patients, en séquençant de manière systématique les échantillons positifs pour la détection du BKPyV dans les différents compartiments biologiques au cours du temps. Une telle approche pourrait permettre de mieux élucider les mécanismes d'évolution virale en post-greffe chez les transplantés rénaux

3.3. Compartimentalisation et diversité du BKPyV chez les greffés rénaux avec BKVN

Bien que le BKPyV soit un virus à ADN double brin, les données récentes d'études de WGS retrouvaient une diversité virale intra et interindividuelle importante en particulier dans les urines, avec un taux de substitution élevé (10^{-4} substitution/site/an), plus proche de celui des virus à ARN que des taux classiquement décrits pour les virus à ADN double brin (10^{-8} s/s/a) [148]. Chez les patients transplantés rénaux, cette variabilité a principalement été décrite dans la région non codante (NCCR) et dans le gène codant pour VP1. L'ensemble des études ayant analysé la diversité génétique du BKPyV suggèrent qu'une réplication virale élevée et prolongée favorise l'émergence de variants viraux (ou « quasi-espèces ») par accumulation de mutations, notamment dans la région NCCR et la séquence de VP1 [153,209]. Cependant, la quasi-totalité d'entre elles ont analysé des échantillons urinaires [210]. Une virurie BKPyV est observée chez 30 à 50% des transplantés rénaux, et est faiblement prédictive de la survenue ultérieure d'une virémie et/ou d'une BKVN. En revanche, peu d'études ont analysé de manière comparative les souches de BKPyV dans les différents compartiments biologiques d'un même patient, en particulier dans le rein.

Dans notre étude, au diagnostic de la BKVN, 81% des échantillons de biopsie rénale présentaient une ou plusieurs mutations dans la séquence de VP1 obtenue en Sanger comparativement aux séquences de référence. Ces données confirment celles obtenues dans des études anatomopathologiques anciennes avec des techniques de PCR amplifiant des fragments du gène de VP1 [156,157]. Les mutations non synonymes que nous avons identifiées étaient localisées pour plus de la moitié d'entre elles dans la boucle BC (acides aminés 61 à 83), de manière similaire aux résultats observés par Luo et al. [209]. De plus, les modifications nucléotidiques observées dans la boucle BC (D62N/Y, E73K/Q, D77H/N), étaient

identiques à celles décrites dans l'étude de Peretti et al., et compatibles avec les mutations signatures de l'enzyme APOBEC3B [163].

La comparaison entre les échantillons de plasma et de biopsie rénale à la date de BKVN identifiait le même sous-type majoritaire dans les 2 compartiments avec les deux techniques de séquençage. De plus, le séquençage Sanger retrouvait une séquence en acides aminés de VP1 en séquençage Sanger identique dans 56% des cas. En WGS, l'analyse comparative des séquences consensus majoritaire retrouvées dans les deux compartiments retrouvaient des SNP sur l'ensemble du génome, mais en faible nombre (10 en moyenne).
Nos données ne mettent donc pas en évidence de compartimentalisation forte du BKPyV chez les greffés rénaux avec une BKVN, la même population virale majoritaire étant retrouvée dans le plasma et le rein. Ceci pourrait être lié au fait que le rein est un organe largement vascularisé, expliquant que les souches de BKPyV identifiées dans la biopsie soient identiques à celles retrouvées dans le plasma (y compris en cas de co-infection). Cependant, l'analyse des séquences consensus en WGS retrouvait des mutations non synonymes dans la souche rénale comparativement à la souche plasmatique chez plus de la moitié des patients, en particulier dans les protéines de capside VP1 et VP2. Ces résultats démontrent donc qu'il existe des pressions de sélection différentes probablement immunitaires dans les différents compartiments biologiques, expliquant les différences observées.

4. Apport du WGS dans l'analyse de la diversité virale

Afin d'analyse de manière plus fine la diversité du BKPyV dans les échantillons biologiques, nous avons mis au point une technique de WGS basée sur l'utilisation de sondes de capture, et construits des pipelines bio-informatiques d'analyse spécifiques.
Les données obtenues en WGS étaient concordantes avec celles du séquençage Sanger de la protéine de capside VP1 dans tous les cas. Ainsi, pour le génotypage des souches majoritaires de BKPyV présents dans les échantillons cliniques, le séquençage Sanger VP1 constitue une technique valide et robuste.
Par ailleurs, le WGS nous a permis d'apporter des informations complémentaires et nouvelles sur la diversité virale et la compartimentalisation, grâce à une profondeur de séquençage et une couverture du génome viral élevées. Tout d'abord, nous avons pu mettre en évidence la présence de co-infections chez plus d'un tiers des patients, le plus souvent par plusieurs sous-types de BKPyV-I. Il est possible que ces résultats soient en partie liés à un manque de

spécificité de la méthode, les sous-types de BKPyV-I présentant des homologies de séquences nucléotidiques importantes. Cependant, les expériences de mise au point avec le séquençage de virus purs (BK-Dunlop ou mélanges de sous-types) ne retrouvaient pas d'autres souches de BKV que celles utilisées. Ainsi, sous réserve des limites de spécificité de la méthode de WGS, le WGS nous a permis de mettre en évidence le dynamisme de la réplication du BKPyV dans le plasma et le rein chez les patients greffés rénaux. De plus, l'analyse des variants minoritaires retrouvait une proportion plus importante dans les échantillons à la date de la BKVN comparativement aux échantillons antérieurs. La diversité intra-échantillon des populations virales était donc plus élevée au diagnostic de la BKVN, en particulier dans le rein, où l'accumulation de mutations serait favorisée par la réplication virale persistante.

Des analyses complémentaires sont en cours afin d'analyser plus précisément la diversité du BKV dans notre cohorte de patients. Tout d'abord, nous avons prévu d'étudier les modifications éventuelles dans la région non codante (NCCR) au cours du temps et entre les différents compartiments. En effet, des modifications au sein de cette région (en particulier dans les souches rr-NCCR) ont été démontrées comme associées à une pathogénicité accrue [151]. De plus, il serait intéressant de déterminer les pressions de sélection sur les différentes séquences codantes du génome du BKPyV (rapport dN/dS), et comparer les résultats à ceux observés par l'équipe de Strasbourg, pour qui seul le gène codant pour Agno n'était pas soumis à une contrainte sélective [148]. Enfin, à plus long terme, il serait également intéressant de comparer l'analyse de la diversité virale des patients avec une BKVN prouvée histologiquement comme décrit précédemment, à celle d'échantillons de patients transplantés rénaux avec une virémie BKPyV transitoire n'évoluant pas vers la BKVN.

Etude de la réponse humorale anti-BKPyV chez les patients transplantés rénaux avec BKVN

Le rôle de la réponse humorale dans le contrôle de la virémie et la survenue de la néphropathie reste débattu. En lien avec l'existence de différentes sous-populations virales, des anticorps neutralisants (AcN) spécifiques de chacun des sérotypes de BKPyV peuvent coexister chez les transplantés rénaux. De plus, des études récentes suggèrent un lien potentiel entre la variabilité génétique du BKPyV (notamment au niveau de la région de VP1), et l'échappement à la réponse anticorps neutralisante.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié la réponse humorale anti-BKPyV-VP1 dans la même population de transplantés rénaux avec un diagnostic de BKVN. Pour cela, nous avons mis au point des tests de neutralisation spécifiques des principaux génotypes de BKPyV, afin d'étudier la cinétique comparative des AcN vis-à-vis des différentes souches de BKPyV.

1. Méthodes

1.1. Amplification des plasmides

Les plasmides contenant des séquences modifiées des protéines de capside VP1, VP2 et VP3 ont été fournis par le laboratoire de Christopher B. Buck (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland), avec l'aimable collaboration de Diana Pastrana. En particulier, nous avons récupéré les plasmides exprimant les protéines de capside VP1 des principaux génotypes de BKV (liste complète dans le Tableau 7). Les protéines de capsides mineures VP2 et VP3 n'étant pas exposées à la surface du virion (et n'étant pas la cible des anticorps neutralisants), seuls les plasmides codant pour les protéines VP2 et VP3 de l'isolat A-66H (génotype IVc2) ont été utilisés pour la production de toutes les VLP.

Chacun des plasmides a été amplifié de façon clonale par transformation bactérienne (One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli, Invitrogen). Vingt-cinq microlitres de bactéries ont été transformés avec 2 µg de plasmide par choc thermique de 30 s à 42°C. Les bactéries ont ensuite été cultivées en milieu S.O.C (Invitrogen) pendant 1h à 30°C sous agitation, puis ensemencées sur gélose LB Agar contenant de la Zéocine (1/2000). Après incubation pendant la nuit à 30°C, les colonies isolées Zéocine-R (correspondant aux clones transformés) ont été mises en miniculture sur milieu LB + Zéocine (1/2000) à 30°C durant la nuit sous agitation. À partir de la miniculture, une mini-préparation (Mini-Prep) a été réalisée à l'aide du kit GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Fischer Scientific), selon les instructions du fabricant. Les

plasmides purifiés ont été quantifiés par spectrophotométrie (NanoDrop™ One, Thermo Fisher Scientific). Afin de contrôler le bon déroulement de la transformation, les plasmides obtenus par Mini-Prep ont été digérés avec les enzymes de restriction adéquates, et la taille des fragments obtenus après digestion vérifiée par migration sur gel d'agarose 1%. Après avoir validé la transformation, une maxi-préparation (Maxi-Prep) a été effectuée à l'aide du kit QIAfilter Plasmid Midi and Maxi (Qiagen), afin de produire une quantité suffisante des différents plasmides pour les productions de VLP.

Plasmide	Nom	Résistance ATB	Inserts (taille / isolat / numéro GenBank)
VP1	**pIaw**	Zéocine	BKV **VP1 Ia** (1089pb / BK Dunlop / JF894228)
	pBK ESD	Zéocine	BKV **VP1 Ib-2** (1089pb / PittVR2 / DQ989796)
	pIcw	Zéocine	BKV **VP1 Ic** (1089pb / RYU-2 / AB211377)
	pIIw	Zéocine	BKV **VP1 II** (1089pb / GBR-12 / AB263920)
	pIIIw	Zéocine	BKV **VP1 III** (1089pb / KOM-3 / AB211386)
	pIVb1w	Zéocine	BKV **VP1 IVb-1** (1089pb / THK-8 / AB211390)
	pwB	Zéocine	BKV **VP1 IVc-2** (1089pb / A-66H / AB369093)
VP2	**ph2b**	Zéocine	BKV **VP2** (1055pb / A-66H / AB369093)
VP3	**ph3b**	Zéocine	BKV **VP3** (698pb / A-66H / AB369093)

Tableau 7. **Liste des plasmides utilisés pour la production des VLP-BKPyV** (avec la collaboration de C. Buck et D. Pastrana, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland)
Les cartes détaillées des plasmides sont disponibles sur le site du laboratoire d'oncologie cellulaire du National Institute of Health (Bethesda, Maryland, USA) accessible au lien suivant : http://home.ccr.cancer.gov/LCO/.

1.2. Production des VLP

Le protocole détaillé suivi pour la production des VLP est accessible sur le site du laboratoire d'oncologie cellulaire du National Institute of Health (Bethesda, Maryland, USA) au lien suivant : http://home.ccr.cancer.gov/LCO/.

En bref, des cellules HEK-293FT ont été co-transfectées à l'aide de la trousse Lipofectamine™ 3000 reagent (Thermo Fischer Scientific) avec les plasmides codant pour la protéine VP1 d'intérêt, les protéines VP2 et VP3, ainsi qu'un plasmide rapporteur codant pour le gène de la *Gaussia* luciférase (*Gluc*). Après 48h d'incubation à 37°C, les cellules ont été détachées à l'aide

d'une solution de Trypsine 0.05% + EDTA (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), et resuspendues dans du Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (D-PBS, Sigma-Aldrich). Une solution de Neuraminidase V (Sigma) a été ajoutée à la concentration finale de 2U/ml, avant incubation de 15 min à 37°C. Après ajout d'un tampon Tris 1M (pH 8), les suspensions cellulaires ont été lysées avec une solution de Brij-58 (Sigma) à la concentration finale de 0.5%. Le lysat cellulaire a été traité par un mélange de ribonucléases 0.1% (RNase Cocktail™ Enzyme Mix, Invitrogen), avant ajout d'un tampon d'ammonium sulfate 1M (pH 9) à 25mM de concentration finale. Les échantillons ont été incubés durant la nuit à 37°C afin de permettre la maturation des capsides. Les lysats ont ensuite été clarifiés par plusieurs cycles de lavage et centrifugation (5000 g, 5 min, 4°C) ainsi qu'un cycle de congélation / décongélation. Les surnageants obtenus ont été déposés sur gradient d'iodixanol 27 / 33/ 39% (OptiPrep, Sigma), avant ultracentrifugation à 234 000 g (3h30, 16°C). Entre 11 et 14 fractions de 250 µl de gradient ont été récoltées.

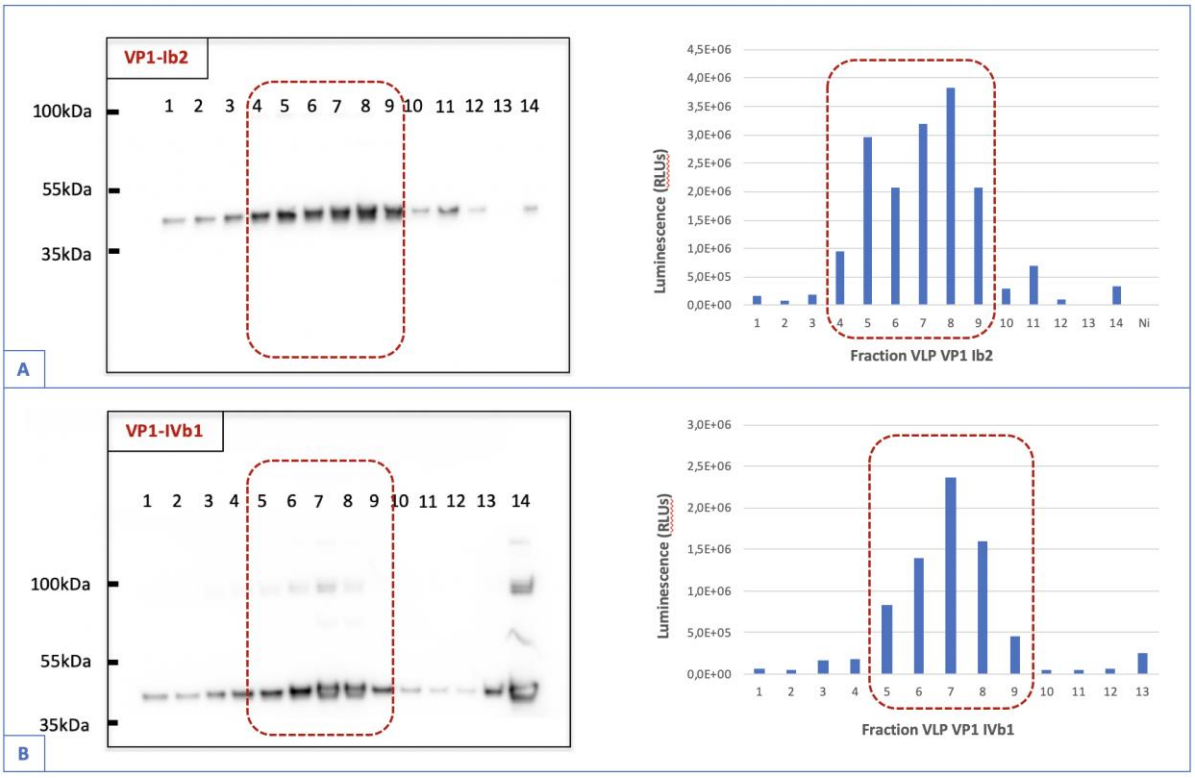


Figure 22. **Analyse des fractions obtenues après ultracentrifugation sur gradient d'OptiPrep™ pour la production de VLP-BK VP1-Ib2 (A) et VP1-IVb1 (B).**

Pour chaque production de VLP, toutes les fractions obtenues après ultracentrifugation sur gradient d'OptiPreP ont été testées : 1) en Western blot pour quantification de l'expression de VP1 (marquage anti-VP1 au 1/2000, révélation West Dura 1s) ; 2) avec le kit Nanoglo® luciférase pour quantification de la luminescence. Seules les fractions enrichies en VP1 et avec une activité luminescence suffisante (délimitées en pointillés rouges) ont été conservées, poolées et aliquotées pour la réalisation ultérieure des tests de neutralisation.

Afin d'isoler les fractions les plus enrichies en VLP, la quantité de VP1 dans chacun des aliquots a été estimée par Western blot avec marquage par un anticorps anti-VP1 au 1/2000ème (BKPyVgp4, Réf. SAB1412996-100UG, Sigma), et révélation avec le kit SuperSignal™ West Dura (Thermo Fisher Scientific). En parallèle, nous avons quantifié l'expression de *Gluc* dans les différentes fractions par infection de cellules 293FT selon le protocole décrit ci-dessous. Pour chaque production de VLP, les fractions enrichies en VP1 et à forte activité de luciférase ont été regroupées, et conservées en aliquots de 50 µL à -80°C (Figure 22).

1.3. Tests de neutralisation

Les tests de détection des anticorps neutralisants (AcN) ont été effectués comme précédemment décrits par l'équipe de Christopher B. Buck (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland) [211,212] (Figure 23A).

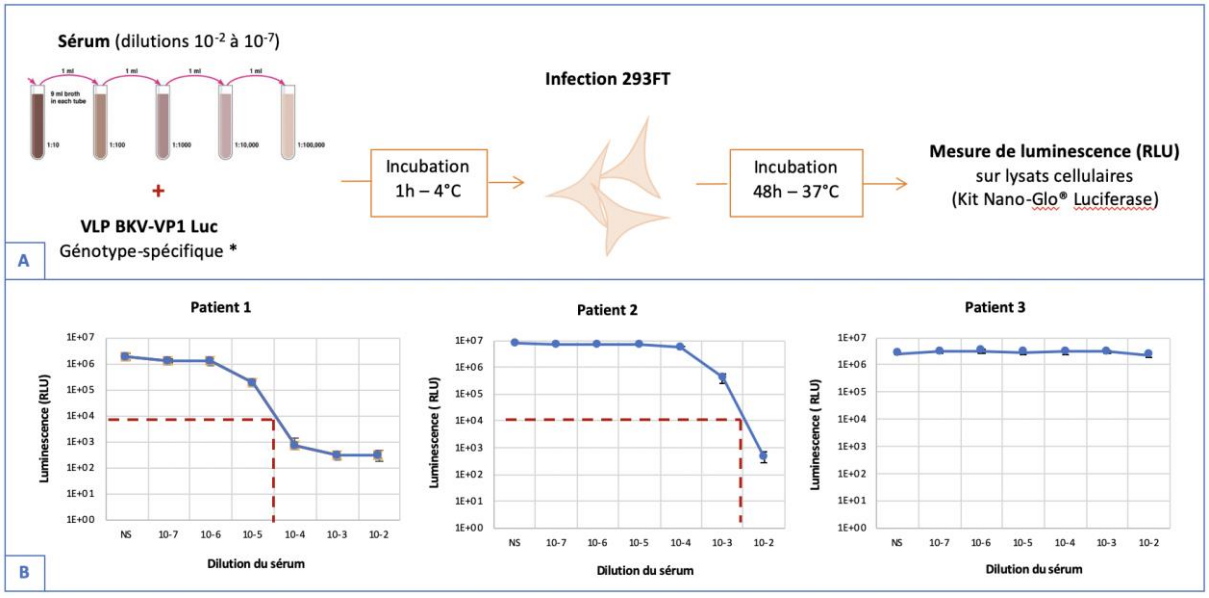


Figure 23. **Tests de neutralisation pour la détection des anticorps neutralisants du BKPyV.**
A. Protocole simplifié des tests de neutralisation.
* Pour chaque sérum, les tests étaient réalisés avec les VLP BKPyV-VP1 Luc du ou des génotype(s) d'intérêt parmi la liste suivante : BKPyV-Ia, Ib2, Ic, BKPyV-II, BKPyV-III, BKPyV-IVb1 ou IVc2.
Le protocole détaillé est disponible sur le site du laboratoire d'oncologie cellulaire du National Institute of Health au lien suivant : http://home.ccr.cancer.gov/LCO/.
B. Exemples de courbes de luminescence obtenus après analyse sur PRISM pour 3 patients ayant un titre de neutralisation (log_{10} IC_{50}) élevé (Patient 1 : 4.5), faible (Patient 2 : 2.5) ou nul (Patient 3). Les tirets rouges indiquent la dilution du sérum permettant de réduire de 50% la luminescence (IC50) comparativement à la condition contrôle sans sérum (NS).

Brièvement, les VLP-BKPyV VP1 du génotype d'intérêt étaient diluées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Gibco™, Thermo Fisher Scientific) selon leur infectiosité (entre 0.04 et 1 µl de stock de VLP déposé par puits). Afin de minimiser la variabilité entre les tests, un seul de stock de VLP pour chaque sous-type de BKPyV a été utilisé pour tous les tests. En parallèle, les échantillons de sérums de patients à tester étaient également dilués dans du milieu DMEM (de 10^{-2} à 10^{-6}), puis incubés pendant 1h sur glace à 4°C avec les solutions de VLP. Les complexes sérum-VLP étaient ensuite été déposées sur des cellules HEK-293T ensemencées la veille en plaque P96 (15.000 cellules par puits). Chacune des conditions a été testée en triplicat, et les contrôles suivants ont été effectués pour tous les tests : VLP sans sérum, VLP avec sérum contrôle positif (correspondant à un pool de sérums avec titres d'anticorps neutralisants élevés vis-à-vis de tous les génotypes), sérum contrôle négatif (issu de patients pédiatriques séronégatifs vis-à-vis du BKPyV). Les sérums contrôles positif et négatif ont été fournis par le Dr Étienne Brochot à Amiens (Université de Picardie). Après 48h d'incubation à 37°C, le surnageant était retiré, les cellules lavées avec du PBS 1X, et l'expression de *Gluc* dans les cellules HEK-293T quantifiée à l'aide du kit Nano-Glo® Luciferase (Promega) selon les recommandations du fabricant. L'activité luciférase (RLUs : relative light units) de chaque puit a été mesurée sur un appareil TriStar LB 942 Multimode Reader (Berthold technologies). Pour chaque échantillon de sérum, la dilution permettant d'inhiber 50% du signal luciférase (IC_{50}) a été déterminée à l'aide du logiciel PRISM v8 (après ajustement sur une courbe de modèle sigmoïdale dose-réponse). Le titre de neutralisation de chaque sérum était défini comme le $\log_{10}$ IC50 (Figure 23B). Un $\log_{10}$ IC_{50} > 2 a été choisi comme seuil de neutralisation vis-à-vis du BKV, comme proposé par Pastrana et al [212].

1.4. Test ELISA

Les tests ELISA pour la détection des IgG anti-BKPyV vis-à-vis des génotypes Ia, Ib2, II et IVc2 ont été réalisés au laboratoire de virologie du CHU d'Amiens avec l'aimable collaboration du Dr Etienne Brochot (Université de Picardie), selon un protocole précédemment décrit [114].
Dans un premier temps, les VLP BKV pour les génotypes d'intérêt ont été produites sur des cellules d'insecte SF21 à l'aide de baculovirus recombinants. Après purification, les VLP ont été diluées à 1µg/mL, puis 100 µl déposés dans chaque puits d'un plaque 96 puits Polysorp (NunC immune-plate, Thermo Scientific), avant incubation à 4°C durant la nuit.
Pour chaque test ELISA, la plaque était saturée avec du sérum fœtal bovin. Après lavage au PBS 1X (Dulbecco w/o Ca^{2+} & w/o Mg^{2+}), 200 µl de chaque échantillon de sérum dilué à 1/100

était déposé dans le premier puits, puis dilué de 2 en 2. Après une heure d'incubation, la plaque était lavée avant d'ajouter un anticorps secondaire anti-IgG Fc couplé à la HRP (horse radish peroxidase, Southern Biotech). La révélation était effectuée par ajout d'o-phenylenediamine di-hydrochloride et de peroxyde d'hydrogène dans l'obscurité pendant 30 min. La réaction était interrompue avec 100 µl d'acide sulfurique 1M, avant lecture de la densité optique (DO) à 492 nm sur un spectrophotomètre ELISA (TECAN® Sunrise). Dans chaque plaque étaient inclus 3 puits de normalisation contenant un anticorps commercial anti-BKPyV (Sigma-Aldrich, Cat.# SAB1412996) dilué à 1/5000. Seules les plaques dont la DO des puits de normalisation était comprise entre 0.7 et 1.5 ont été pris en compte afin d'assurer la reproductibilité inter-tests. Pour chaque échantillon, la DO corrigée était calculée comme suit : (DO échantillon – DO contrôle négatif) / DO puits de normalisation. Un sérum était considéré comme séropositif si la DO était positive pour des dilutions ≥ 200.

2. Résultats

2.1. Détection des anticorps anti-BKPyV à J0

Trente des 32 patients avec un diagnostic de BKVN avaient un échantillon de sérum à la date de transplantation (J0) disponible pour analyse. Tous avaient des IgG anti-BKPyV détectables en ELISA contre au moins un des 4 génotypes de BKPyV testés (séroprévalence de 100%). Plus spécifiquement, le pourcentage d'échantillons avec des IgG anti-BKPyV positifs vis-à-vis des génotypes Ia/Ib1, Ib2, II et IVc2 était respectivement de 60%, 80%, 93% et 97% (Figure 24A). La majorité des patients avaient des IgG anti-BKPyV positifs vis-à-vis de 3 ou 4 génotypes différents (respectivement 53 et 40%) (Figure 24B). Le titre d'IgG vis-à-vis du génotype IVc2 était significativement plus élevé comparativement aux autres génotypes (tests non paramétriques du signe de Wilcoxon, $P<0.01$) (Figure 24C).

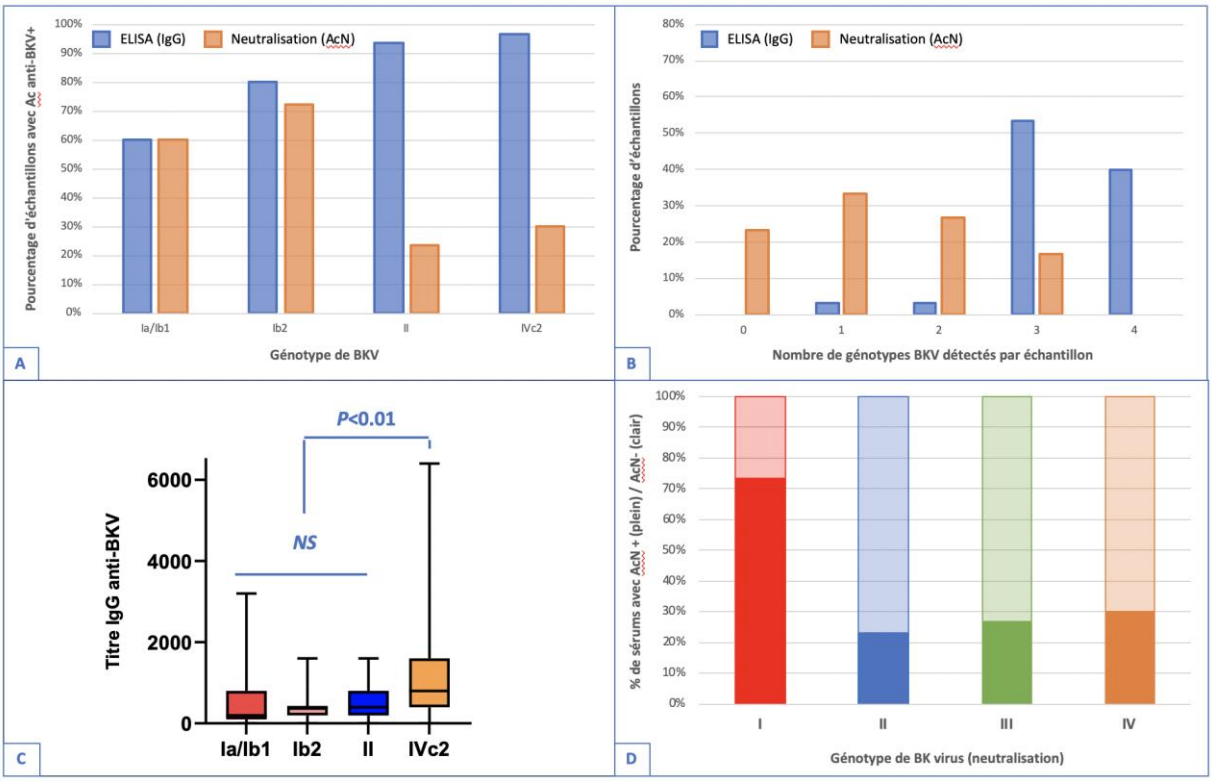


Figure 24. **Détection des anticorps anti-BKV en ELISA et neutralisation sur les sérums à J0.**
Tous les sérums disponibles à J0 (N=30) ont été testés pour la détection des Ac anti-BKPyV vis à vis des génotypes suivants : Ia/Ib1, Ib2, II et IVc2 (et III pour les AcN)
A. Pourcentage de sérums avec des anticorps anti-BKPyV détectables en ELISA et neutralisation.
B. Pourcentage de sérums avec des anticorps anti-BKPyV détectables en ELISA et neutralisation vis-à-vis de 0, 1 ou plusieurs génotypes de BKPyV virus parmi les génotypes suivants : Ia/Ib1, Ib2, II et IVc2
C. Titre d'IgG anti-BKPyV spécifiques de chaque génotype en ELISA.
D. Proportion de sérums avec AcN positifs (cadre plein) ou négatifs (cadre clair) à J0.

Les 30 échantillons de sérums à J0 ont également été testés pour la détection des anticorps neutralisants vis-à-vis des mêmes génotypes testés en ELISA (ainsi que du BKPyV-III). Seuls 23/30 (77%) des échantillons avaient des AcN positifs vis-à-vis d'au moins un sous-type de BKPyV. Le pourcentage d'échantillons avec des AcN spécifiques des génotypes Ia et Ib2 était respectivement de 60% et 72%, similaire à celui observé en ELISA pour la détection des IgG. En revanche, seuls 23% des sérums avaient des AcN anti-BKPyV-II, et 30% des AcN anti-BKPyV-IVc2 (Figure 24A). Le pourcentage d'échantillons avec des AcN positifs vis à vis du génotype I était significativement plus élevé comparativement aux autres génotypes (test du Chi-2 apparié, $P<0.001$) (Figure 24D). Au total, seuls 44% des patients testés à J0 avaient des AcN détectables vis-à-vis de 2 (N=8) ou 3 (N=5) génotypes différents (Figure 24B).

Enfin, des anticorps étaient détectés à J0 vis-à-vis du génotype ultérieurement responsable de la BKVN chez 80% (24/30) des patients en ELISA (titre d'IgG médian : 800, IQR : 400-1600), et 53% (16/30) en tests de neutralisation ($log_{10}IC_{50}$ médiane, IQR : 2.81, 2.65-3.21 versus 2.73, 2.49-3.07 pour les souches non BKVN).

2.2. Réponse anticorps neutralisante chez les patients avec BKVN

2.2.1. Détection des anticorps neutralisants à la date de la BKVN

Au diagnostic de la BKVN, tous les échantillons de sérums avaient des AcN détectables vis-à-vis des 4 principaux génotypes de BKPyV. Le titre d'AcN augmentait significativement comparativement à J0 pour tous les génotypes (Tableau 8).

Génotype de BKPyV	**J0 - Date de greffe** *(N=30)*	**BKVN** *(N=31)*	*P*-value
I	2.55 [1.97-2.90]	4.75 [4.01-5.78]	< 0.0001
II	0 [0-1.92]	3.69 [3.21-4.77]	< 0.0001
III	0 [0-2.17]	4.50 [3.86-4.87]	< 0.0001
IVc2	0 [0-2.10]	3.77 [3.40-4.22]	< 0.0001

Tableau 8**. Comparaison des titres d'anticorps neutralisants à J0 et à la BKVN.**
Les valeurs médianes [IQR] des titres d'AcN pour les 4 génotypes de BKPyV sont présentés à J0 (N=30) et à la date de BKVN (N=31). Les tests de comparaison (test du signe de Wilcoxon) ont pris en compte la corrélation des données.

En revanche, le titre d'AcN ne différait pas d'un génotype à l'autre. En particulier, le titre d'AcN vis à vis du génotype de la BKVN (souche réplicante) n'était pas statistiquement différent comparativement à celui vis-à-vis des autres génotypes ($log_{10}IC_{50}$ médian : 3.85, IQR : 3.63-4.88 versus 4.47, 3.76-4.88) (Figure 25).

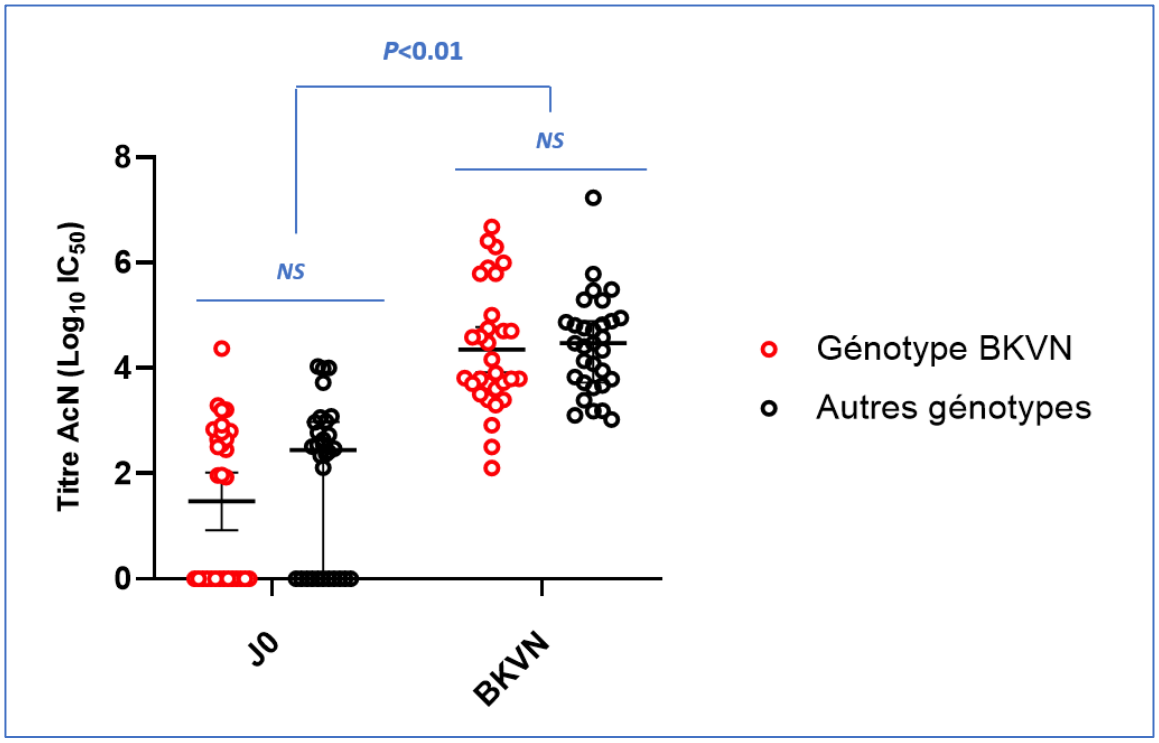


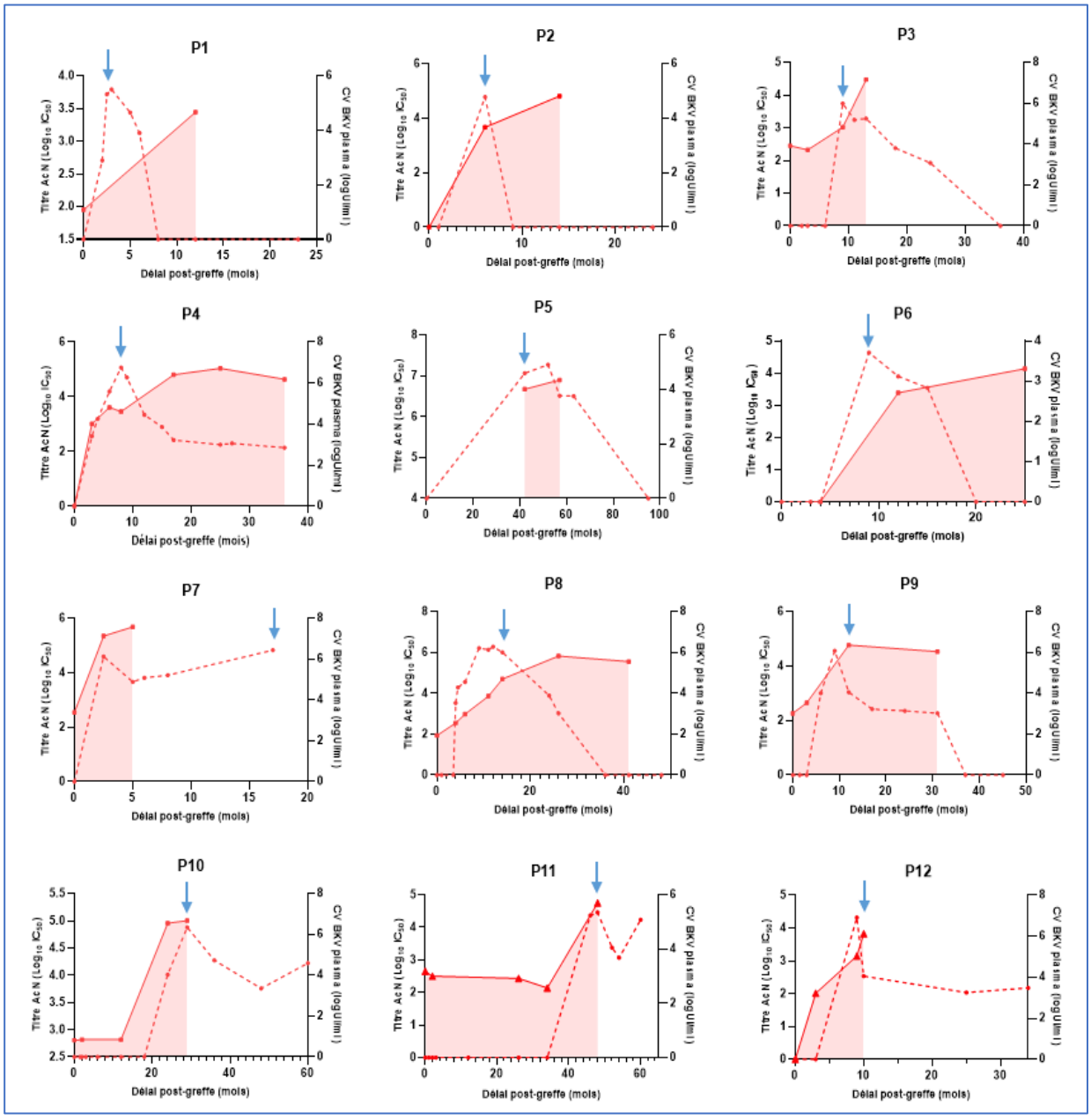
Figure 25. **Comparaison des titres d'anticorps neutralisants vis-à-vis de la souche responsable de la BKVN comparativement aux autres.**

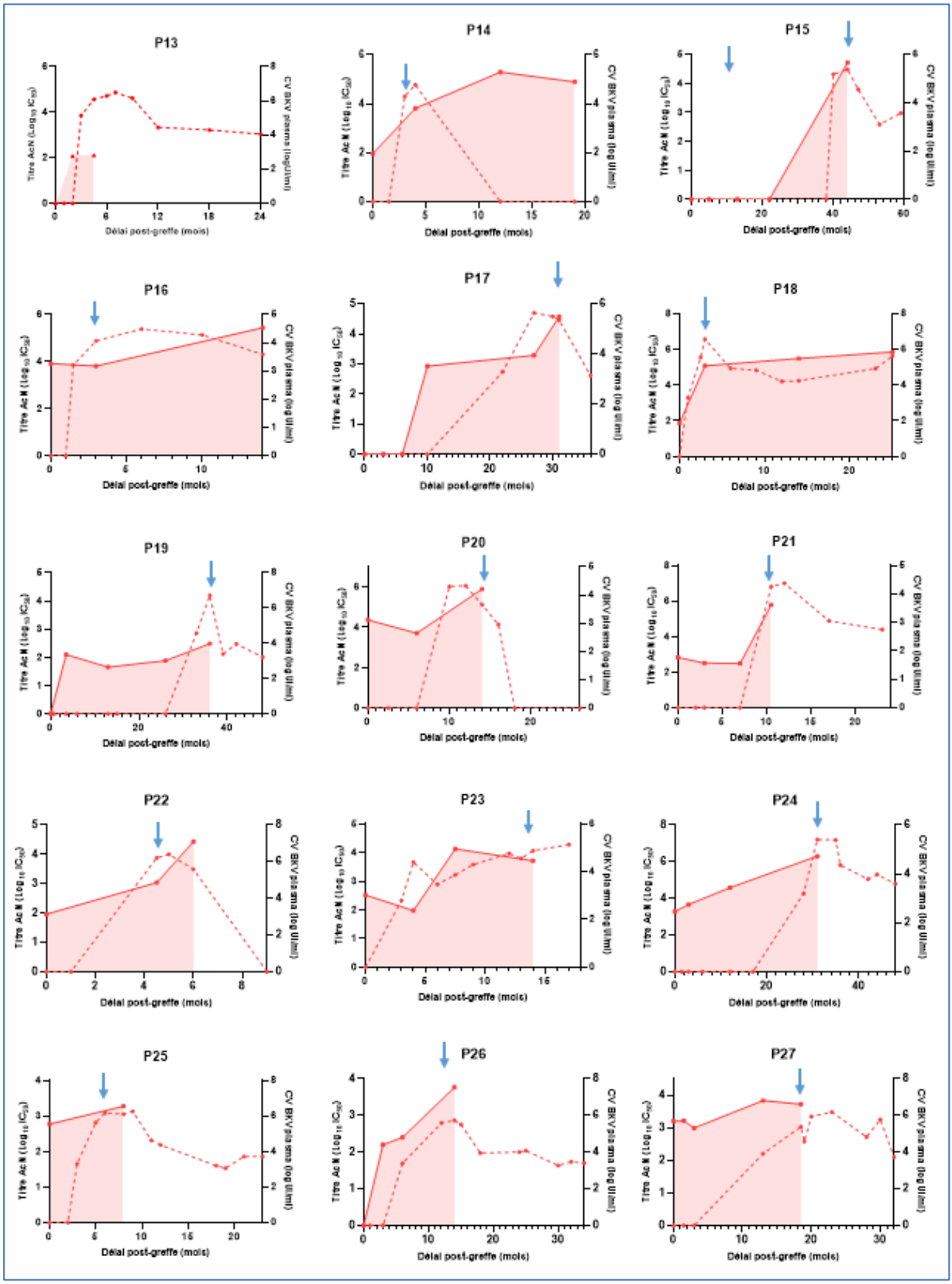
Le titre d'AcN vis-à-vis de la souche responsable de la BKVN (en rouge) a été comparé à la moyenne du titre d'AcN vis-à-vis des trois autres génotypes (en noir) à la date de greffe (N=30 sérums) et à la date de BKVN (N=31 sérums). Chaque point correspond à la valeur obtenue sur un sérum. Les tests de comparaison (test du signe de Wilcoxon) ont pris en compte la corrélation des données.

2.2.2. Cinétique des anticorps neutralisants chez les patients avec BKVN

L'évolution détaillée du titre d'AcN vis-à-vis de la souche réplicante (responsable de la BKVN) et de la virémie BKPyV concomitante est détaillée pour 6 patients sur la Figure 26. L'analyse longitudinale des sérums de la greffe au diagnostic de BKVN a mis en évidence que la hausse du titre d'anticorps neutralisants coïncidait avec le début de la virémie BK chez tous les patients. Il existait cependant de grandes variabilités d'un patient à l'autre. Pour certains, l'ascension du titre d'AcN était associée à une clairance de la virémie BKVN rapide (P6), ou plus lente (P32). En revanche, pour d'autres, la virémie BKPyV persistait malgré la hausse du titre de neutralisation vis-à-vis de la souche réplicante (P16, P18, P23 et P30). Au total, l'ascension des titres d'AcN était associée à une clairance de la virémie chez 15/32 (47%) des patients.

Seize patients présentaient un titre d'AcN > 2 $log_{10}IC_{50}$ vis-à-vis de la souche réplicante dès J0, à des titres faibles (P23) ou élevés (P16), ce qui ne les a pas empêchés de développer une virémie. Celle-ci était également associée à une hausse modérée du titre d'AcN.




P13
P14
P15
P16
P17
P18
P19
P20
P21
P22
P23
P24
P25
P26
P27
Délai post-greffe (mois)

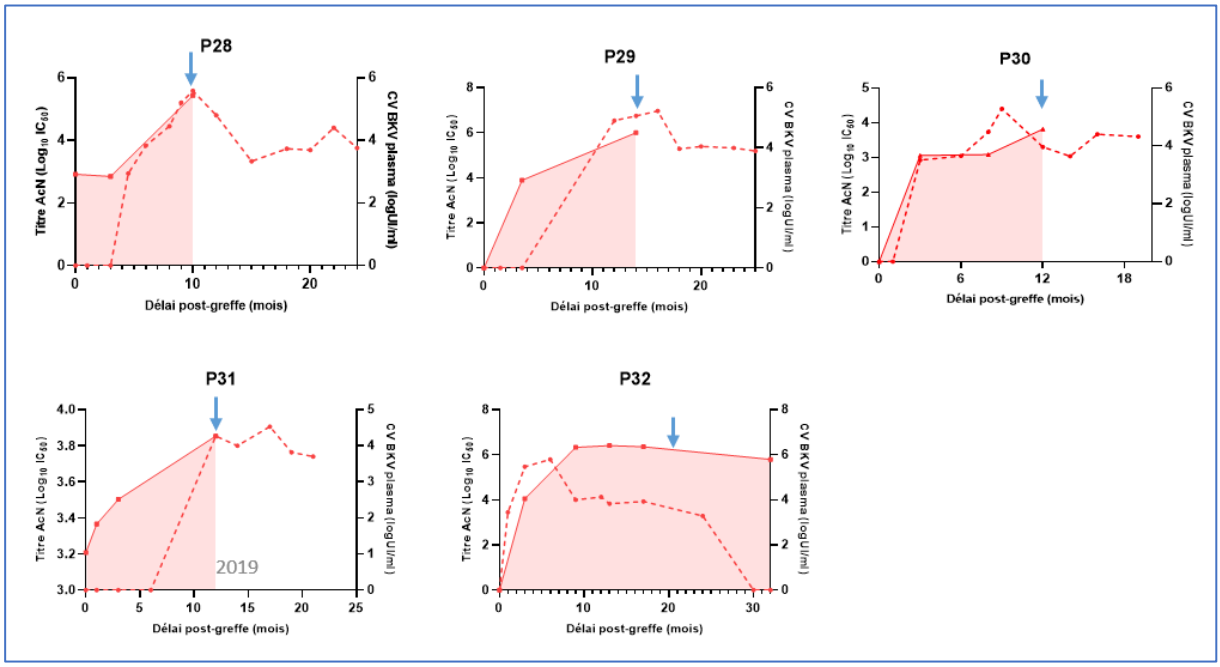


Figure 26. **Cinétique du titre d'AcN vis-à-vis de la souche réplicante et de la charge virale BKPyV plasmatique chez les 32 patients avec un diagnostic de BKVN.**
Pour chacun des patients, la charge virale plasmatique du BKPyV (logUI/ml) est représentée en trait pointillés et le titre d'anticorps neutralisants vis-à-vis de la souche correspondante ($Log_{10}IC_{50}$) en trait plein. La flèche correspond à la date de diagnostic histologique de confirmation de la BKVN.

3. Discussion

3.1. Séroprévalence à J0 : IgG et AcN anti-BKPyV

Dans notre population, la séroprévalence de l'infection à BKPyV chez les receveurs à la date de transplantation était de 100%, tous les patients ayant des IgG détectables vis-à-vis d'au moins un génotype. Ces résultats sont concordants avec ceux d'autres études retrouvant des taux de séroprévalence élevés chez les donneurs et receveurs en transplantation rénale. Ainsi, dans une étude récente cohorte ayant inclus 551 transplantés, la séroprévalence (évaluée par le même test ELISA que celui utilisé dans notre étude) était respectivement de 88.4% et 76.7% pour les sérotypes I et IV (6.8% seulement des patients étant séronégatifs pour les deux sérotypes) [114]. De même, dans une large cohorte de 386 couples donneurs vivants / receveurs, plus de 80% des receveurs avaient des IgG détectables vis-à-vis de tous les génotypes de BKPyV en utilisant un test Luminex [213]. En revanche, le taux de séroréactivité était plus élevé vis-à-vis du génotype I, contrairement aux résultats de notre étude qui

retrouvent un titre d'IgG significativement plus élevé vis-à-vis du génotype IV. Cette discordance pourrait s'expliquer par la différence d'origine géographique des patients inclus.
Si tous les sujets de notre étude avaient des IgG anti-BKPyV, seuls 77% avaient des AcN détectables vis-à-vis du BKPyV, le plus souvent vis-à-vis d'un seul génotype. La différence entre les deux tests de détection des anticorps avait déjà été mise en évidence, en particulier chez les receveurs développant une infection à BKPyV en post-greffe. En effet, dans une étude rétrospective ayant analysé les sérums pré-greffe de 116 couples D/R, Abend et al. retrouvait une séroprévalence de l'infection par le BKPyV de 89% en ELISA, mais seulement 33% des sérums positif en ELISA avaient des AcN détectables vis-à-vis du BKPyV-I [185]. De même, dans l'étude de Solis et al., parmi les 52 patients de la cohorte ayant présenté une infection à BKPyV en post-greffe, les AcN vis-à-vis des génotypes I, II et IV n'étaient détectés respectivement que chez 58%, 13% et 4% des patients en pré-greffe [214]. De manière générale, les virus sont soumis à une pression de sélection importante pour accumuler des mutations au niveau des épitopes reconnus par les anticorps capables de neutraliser l'infection (principalement situés dans la protéine de capside VP1 dans le cas du BKPyV). A contrario, il existe une pression de sélection moindre au niveau des régions de la capside reconnues par des anticorps qui ne neutralisent pas l'infection. Par conséquence, les épitopes liés par les anticorps non neutralisants (détectés en ELISA) sont donc davantage susceptibles d'être conservés entre les différents génotypes, tandis que les épitopes liés par les anticorps neutralisants sont plus susceptibles d'être divergents [212]. Ces données peuvent expliquer le fait que la plupart des patients présentent des IgG anti-BKPyV dirigés contre plusieurs génotypes en ELISA, comparativement aux AcN.
L'analyse des sérums à J0 a également révélé une différence dans le profil de la réponse humorale en fonction de génotypes. En effet, les IgG anti-BKPyV-I correspondaient quasiment tous à des AcN, alors que la proportion d'AcN parmi les IgG anti-BKPyV-II ou IV était beaucoup plus faible. Le génotype I étant prédominant dans la population générale, une plus forte exposition (et donc stimulation antigénique) pourrait expliquer que le taux d'IgG soit similaire au taux d'AcN. Une hypothèse alternative serait que les épitopes ciblés sont les mêmes.

3.2. Titre d'anticorps anti-BKPyV à J0 et prédiction du risque d'infection à BKPyV

L'intérêt majeur de réaliser un dosage des anticorps anti-BKPyV en pré-greffe réside dans la capacité potentielle à prédire le risque ultérieur d'infection à BKPyV.

Connaissant le génotype responsable de la BKVN grâce au séquençage des échantillons de plasma et de biopsie au diagnostic de la néphropathie, nous avons pu montrer que dès J0, 80% des patients avaient des IgG et 53% des AcN détectables vis-à-vis du génotype responsable de la BKVN. La présence de ces anticorps au moment de la transplantation est donc le témoin d'une immunité préexistante chez le receveur vis-à-vis de la souche ultérieurement responsable de la BKVN. Ces résultats constituent un argument supplémentaire en faveur d'un rôle de la réactivation du virus latent du receveur dans le développement de la néphropathie.

Les titres d'AcN observés à J0 vis-à-vis de la souche de la BKVN étaient faibles le plus souvent (médiane $\log_{10}IC_{50}$ à 2.81), sauf pour deux patients qui avaient un titre supérieur à 4 $\log_{10}IC_{50}$ (Figure 5 : P16 et P20). Ces données concordent avec les résultats de Solis et al. qui retrouvaient que tous les patients avec une BKVN avaient un titre d'AcN à J0 vis-à-vis de la souche réplicante < 4 $\log_{10}IC_{50}$ sauf un [214]. Inversement, dans cette même étude, un titre d'AcN > 4 $\log_{10}IC_{50}$ était considéré comme protecteur vis-à-vis de l'infection par le BKPyV. Ainsi, l'administration précoce d'IgIV pourrait s'avérer bénéfique dans la prévention de la réactivation virale en augmentant significativement le titre d'AcN contre le BKPyV notamment vis-à-vis du génotype I [215]. Une étude rétrospective récente a démontré qu'un traitement précoce par IgIV administré dans les 3 premiers mois post-greffe, était associé à une réduction significative de l'incidence de la virémie BKPyV et de la BKVN à 1 an post-greffe chez les patients à haut risque (définis par un titre d'AcN à J0 < 4 $\log_{10}IC_{50}$) [137]. Sur la base de ces résultats, un PHRC national mené par l'équipe du Pr Fafi-Kremer est actuellement en cours afin d'évaluer de manière prospective le bénéfice de cette stratégie préventive.

Au total, nos résultats démontrent que des AcN sont détectés au moment de la greffe chez la majorité des receveurs, le plus souvent à des titres faibles. La souche répliquant en post-greffe n'est pas nécessairement celle pour laquelle le titre d'AcN initial est faible ou absent. Inversement, certains patients avec un titre d'AcN élevé à J0, n'étaient pas protégés de la survenue ultérieure de la virémie. Un titre élevé d'AcN à J0 pourrait donc être nécessaire pour empêcher la survenue de la virémie, mais probablement pas suffisant. Le titrage des AcN à J0 chez le receveur ne semble donc pas suffisant à lui seul pour prédire la survenue ultérieure d'une infection à BKPyV chez le patient transplanté rénal.

3.3. Cinétique de la réponse AcN chez les patients avec BKVN

Dans notre cohorte, la hausse des titres d'AcN coïncidait avec le début de la virémie, ce qui conforte les données descriptives obtenues précédemment avec l'analyse de la cinétique des IgG anti-BKPyV [178,179]. L'exposition aux antigènes viraux stimule la réponse humorale, expliquant l'ascension des titres d'AcN, particulièrement élevée chez les patients avec virémie persistante et/ou élevée.

Au diagnostic de la BKVN, tous les patients de notre étude avaient des AcN anti-BKPyV détectables à titre élevé, et vis-à-vis de tous les génotypes. De même, dans l'étude de Solis et al., parmi les 52 patients avec une infection à BKPyV (dont 13 avec BKVN), 92% avaient des anticorps détectables contre 2 ou 3 génotypes à la fin du suivi [214]. En revanche, dans cette même étude, le titre d'AcN vis-à-vis de la souche réplicante était significativement plus élevé par rapport aux autres génotypes, contrairement à nos résultats. Cette discordance pourrait s'expliquer par le fait que dans l'étude précédemment citée, une majorité de patients avec infection à BKPyV présentaient seulement une virurie (les données spécifiques des patients ayant une BKVN n'étant pas détaillées par ailleurs). Nos données sont issues d'une population homogène de sujets ayant tous un diagnostic prouvé de BKVN. La néphropathie constitue le stade ultime de l'infection à BKPyV chez le greffé rénal, et résulte d'une réplication virale élevée et/ou prolongée. Celle-ci stimule un large pool de lymphocytes B mémoires capables de neutraliser différents génotypes de BKPyV. En effet, dans une étude récente, l'analyse de la réponse humorale anti-BKPyV chez des individus sains, a révélé que le répertoire des Ig anti-BKPyV comprend une proportion importante d'anticorps capables de neutraliser plusieurs sous-types de BKPyV ainsi que le JCPyV [138]. Ceci pourrait notamment s'expliquer par la présence d'un épitope viral conservé à la jonction entre les pentamères de VP1 constituant la capside virale (Figure 6).

Ainsi, les AcN détectés à titre élevé au diagnostic de la BKVN, sont issus d'un large pool de LB suite à une stimulation antigénique prolongée, expliquant leur importante cross-réactivité. Ils sont donc capables de neutraliser les différents génotypes de BKPyV, qui partageant un grand nombre d'épitopes en particulier dans la boucle BC de VP1 [216].

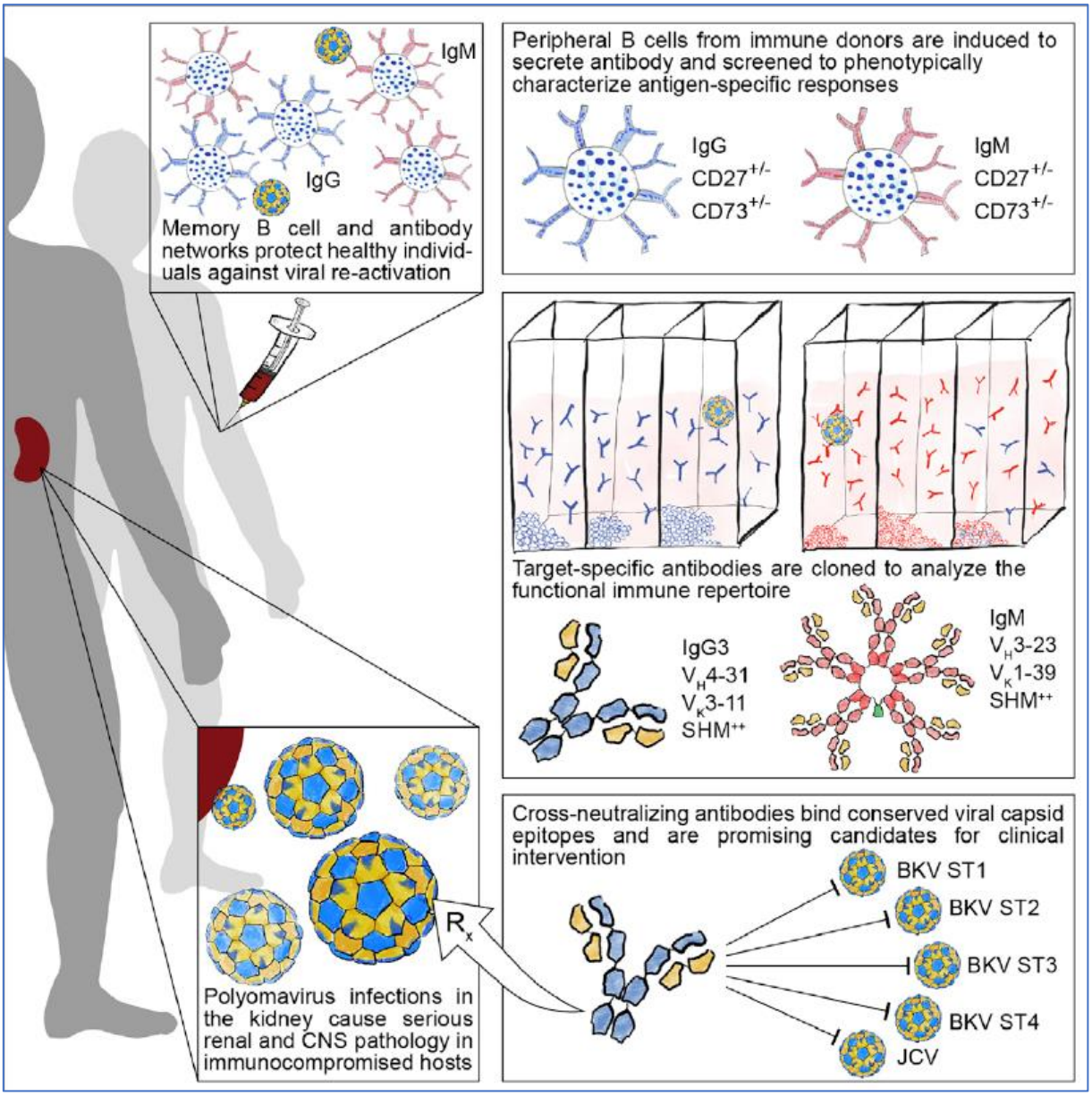


Figure 27. **Les Lymphocytes B mémoires contiennent des anticorps anti-BKPyV capables de cross-neutraliser plusieurs sous-types de BKPyV en liant des épitopes viraux conservés entre les différentes souches** (abstract graphique tiré de Lindner et al. [138])

3.4. Facteurs associés à la survenue de la BKVN et à la persistance de la virémie

En dépit d'une hausse significative du titre d'AcN chez tous les patients, celle-ci n'empêchait pas la survenue de la BKVN, et n'était pas systématiquement associée à la clairance de la virémie. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la survenue de la néphropathie et/ou la persistance de la virémie malgré la hausse du titre d'AcN.

Un premier élément est la diminution concomitante du traitement immunosuppresseur. En effet, celle-ci permet la restauration de l'immunité cellulaire anti-BKPyV, qui joue un rôle clé dans le contrôle de la réplication virale [199]. En absence de traitement antiviral spécifique,

la levée de l'immunosuppression est actuellement la seule stratégie thérapeutique qui a fait la preuve de son efficacité dans la prise en charge de l'infection à BKPyV chez le transplanté rénal [124]. Dans notre étude, la totalité des patients a eu une baisse de l'immunosuppression suite à l'apparition de la virémie selon les recommandations décrites en introduction, et de manière relativement homogène (tous les patients étant suivis dans le même centre et sur une période courte). Le fait que certains d'entre eux aient malgré tout présenté une virémie persistante démontre qu'il existe d'autres facteurs impliqués dans la persistance ou non de la réplication virale, en dehors de la restauration de l'immunité cellulaire.

Parmi les autres facteurs, la variabilité génétique du BKPyV observée en cas de réplication élevée et persistante semble essentielle. En particulier, l'accumulation de mutations dans la séquence de VP1 notamment au niveau de la boucle BC pourrait être associée à un échappement à la réponse anticorps neutralisante. Dans une étude ayant analysé de manière exhaustive les prélèvements séquentiels de deux transplantés rénaux avec un diagnostic de BKVN, le séquençage Sanger de la protéine VP1 sur les urines à la date de diagnostic de BKVN identifiait des variants avec des mutations non synonymes majeures dans la boucle BC de VP1 (D62N, D77N, E73K). Les VLP spécifiques de ces mutants avaient une résistance relative à la neutralisation par les anticorps (maximale pour les mutants E73K et D77H) [163]. Plus récemment, McIlroy et al. ont retrouvé des résultats similaires sur une cohorte de 24 transplantés rénaux avec virurie persistante ou transitoire. Dans cette étude, les VLP de variants isolés en cas de virurie persistante (et résultant de l'accumulation de mutations dans VP1), était associés chez 3 patients à des titres de neutralisation plus faibles comparativement aux souches sauvages [210]. Ces données suggèrent que la persistance de la virémie pourrait également associée à un échappement à la réponse anticorps neutralisante. Cependant, les différences de titres de neutralisation observés entre les variants et les souches de référence dans les 2 études précédemment citées étaient faibles (< 1 $\log_{10}IC_{50}$). L'impact *in vivo* de ces mutations sur la modification de la réponse humorale reste donc inconnue. De plus, les variants étudiés étaient détectés dans les urines où la pression de sélection est moins importante que dans le plasma ou le rein. Dans notre étude, le séquençage Sanger de la protéine de capside VP1 retrouvait également dans la majorité des cas des SNP comparativement aux séquences de référence dans les échantillons de plasma et de rein. N'ayant pas effectué des tests de neutralisation avec des VLP spécifiques des variants isolés *in vivo* à la date de la BKVN, nous ne pouvons exclure qu'ils soient moins sensibles aux AcN. Cependant, dans le contexte de virémie persistante avec BKVN associée, au vu de la cross-

réactivité importante observée au moment de la néphropathie, un échappement des variants isolés à la réponse humorale semble peu probable.

Au total, suite à la réactivation virale, les anticorps anti-BKPyV semblent conférer une protection incomplète vis-à-vis d'une infection sévère à BKPyV. Les titres élevés d'AcN observés au cours de la virémie peuvent participer à sa clairance. En revanche, l'impact de la réponse humorale sur la prévention des lésions de néphropathie reste incertain, probablement du fait de la faible diffusion des IgG anti-BKPyV jusque dans les tubules rénaux pour empêcher la propagation virale.

Identification de facteurs cellulaires essentiels au cycle de réplication du BKPyV

Le BKPyV est un virus dont l'acquisition survient précocement dans l'enfance, et qui persiste de manière latente dans l'organisme au décours, principalement au niveau de l'urothélium. Les déterminants du tropisme cellulaire du BK virus, et les mécanismes contrôlant la persistance et la réactivation virale sont mal connus.

Dans la troisième et dernière partie de ce travail, nous avons cherché à identifier des facteurs cellulaires essentiels au cycle de réplication du BKPyV, en utilisant la technologie du crible CRISPR-Cas9 génome complet.

1. Méthodes

1.1. Culture cellulaire

Les cellules RPTE hTERT (Renal Proximal Tubular Epithelial immortalisées) ont été cultivées dans du milieu DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's Medium, Sigma), supplémenté avec la trousse hTERT Immortalized RPTEC Growth Kit (ATCC), et de la généticine (ThermoFisher Scientific) à la concentration finale de 0.1 mg/ml. Lorsque les cellules atteignaient environ 70% de confluence, elles étaient dissociées à l'aide d'une solution de Trypsine 0.25% (Gibco™, ThermoFisher Scientific) inactivée après 5min à 37°C par une solution de neutralisation de la trypsine (TNS, Clonetics™, Lonza). La suspension cellulaire était centrifugée à 300g pendant 5 min, puis les cellules du culot resuspendues et remises en culture du milieu DMEM/F12. Les cellules RPTE-hTERT ont été utilisées pour la production et le titrage des stocks viraux, et la réalisation du crible CRISPR-Cas9.

Les cellules 769P dérivant d'adénocarcinome rénal humain (ATCC) ont été cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium, ThermoFisher Scientific) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Pan Biotech), 1% de pénicilline et streptomycine (Pen Strep, Gibco™, ThermoFisher Scientific), 1% de L-alanyl-L-glutamine (GlutaMAX™, Gibco™, ThermoFisher Scientific) et 25nM de tampon HEPES (Gibco™, ThermoFisher Scientific). Lorsque les cellules atteignaient environ 70% de confluence, elles étaient dissociées à l'aide d'une solution de Trypsine 0.05% (Gibco™, ThermoFisher Scientific). La suspension cellulaire était centrifugée à 1300 rpm pendant 5 min, puis les cellules du culot resuspendues et remises en culture du milieu RPMI. Les cellules 769P ont été utilisées pour la génération des cellules

knock-out (KO) pour l'expression de SURF4 et FITM2, et pour les expériences de trans-complémentation (addback).

Les cultures cellulaires étaient incubées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO_2.

1.2. Production virale, purification et titration des stocks viraux

Les virus BKPyV-Ia, BKPyV-Ib2, et BKPyV-II ont été produits à partir d'échantillons d'urines de patients transplantés rénaux présentant une virurie BKPyV > 10^9 copies/ml, récupérés au sein de la collection biologique du service de virologie de l'hôpital APHP Saint Louis. Un millilitre d'urines ont été diluées dans 14ml de milieu DMEM/F12 complet puis filtrées avec un filtre de 0.45 µm de diamètre. Des cellules RPTE-hTERT ensemencées à 4 x 10^6 cellules en flasque de 150 cm^2 ont été infectées pendant 6h avec la dilution virale (avant ajout de milieu complémentaire). Les RPTE-hTERT infectées étaient ensuite amplifiées à 70-80% de confluence par passages successifs. Tous les 7 jours, le surnageant était récolté jusqu'à ce que la monocouche cellulaire soit entièrement détruite. Le surnageant était centrifugé à 700 g (5 min, température ambiante), puis filtré à l'aide d'un filtre de 0.45 µm de diamètre. Après transfert dans des tubes Ultra-Clear Centrifuge (Beckman Coulter), les particules virales étaient concentrées sur une solution de tampon HNE (5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) contenant 20% de saccharose par ultracentrifugation à 80 000 g (2h, 4°C). Les virus récoltés étaient resuspendus dans 100 µl de tampon HNE pendant 1h à 4°C avant conservation à -80°C par aliquots de 10 µl.

Les titres viraux ont été réalisés en inoculant des RPTE-hTERT ensemencées en plaque de culture de 24 puits à une densité de 80 000 cellules/puits, avec des dilutions en séries des stocks viraux. À 72h post-infection, les cellules étaient fixées et marquées avec un anticorps anti-LTag de SV40 selon le protocole décrit ci-dessous. Le pourcentage de cellules infectées dans chaque puits était quantifié par cytométrie de flux sur un cytomètre Attune NxT Flow (Thermo Fischer Scientific). Pour chaque dilution du stock viral, le titre viral était calculé selon la formule suivante : Titre (FIU/ml) = (nombre de cellules avant infection x pourcentage de cellules infectées x facteur de dilution x 1000) / 100. Seules les conditions avec un pourcentage d'infection entre 1 et 30% ont été prises en compte pour la moyenne et le calcul du titre viral de chaque stock.

1.3. Crible CRISPR-Cas9 sur cellules RPTE hTERT

Les principales étapes du crible CRISPR-Cas9 sont décrites dans la Figure 28A. Brièvement, des cellules RPTE-hTERT ont été transduites avec la libraire A GeCKOv2 human CRISPR contenant 61 700 sgRNA (single guide RNA) ciblant 19 050 gènes [217]. Les cellules transduites ont été sélectionnées avec de la puromycine à une concentration finale de 1 µg/ml. Après sélection phénotypique, les cellules RPTE-hTERT contenant la librairie A de sgRNA et des cellules RPTE-hTERT parentales (contrôles) ont été infectées avec la souche de référence BK-Dunlop (génotype Ia) à la MOI (multiplicity of infection) de 5. Les clones résistants à l'infection ont été récoltés puis amplifiés. L'ADN génomique des clones résistants à l'infection (et des cellules RPTE-hTERT transduites non infectées) a été extrait à l'aide du kit d'extraction QIAmp DNA column (Qiagen). Les séquences des sgRNA insérées ont été amplifiées et séquencées en NGS sur un séquenceur Illumina Miseq (Plateforme MGX, Institut Génomique Fonctionnelle, Montpellier). Les séquences ont été analysées et l'enrichissement a été déterminé à l'aide du logiciel MAGeCK, selon une méthode précédemment décrite [218].

1.4. Génération de cellules KO et trans-complémentation

Les sgRNA ciblant SURF4 (Surfeit Locus Protein 4) et FITM2 (Fat storage Inducing Trans-Membrane protein 2) ont été générés à l'aide du logiciel CRISPOR (http://crispor.org) puis commandés sur Addgene. Les sgRNAs construits ont été clonés dans le plasmide lentiCRISPRv2 (Addgene) selon le protocole du laboratoire de Zhang et al. (https://media.addgene.org/data/plasmids/52/52961/52961-attachment_B3xTwla0bkYD.pdf).

Les plasmides contenant les sgRNA ont été transfectés dans des cellules 769P avec la trousse Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific), et les cellules transfectées sélectionnées à la puromycine. Avant amplification. L'ADN génomique des clones résistants à l'infection a été extrait à l'aide du kit d'extraction QIAmp DNA column (Qiagen), puis séquencé afin de valider l'inactivation des deux gènes ciblés (SURF4 et FITM2).

Pour les expériences de trans-complémentation, les séquences codantes de SURF4 et FITM2 avec un tag HA ont été construites, puis sous-clonées dans un vecteur pLVX-EF1α-IRES-puromycine après digestion par les enzymes de restriction BamHI et Not1. Les vecteurs pLVX-EF1α-IRES-puromycine contenant les séquences codantes SURF4-HA et FITM2-HA ont été transfectées dans de cellules HEK-293T au phosphate de calcium pour production de VLPs spécifiques. Les VLPs pLVX-EF1α-IRES-puromycine FITM2-HA et SURF4-HA ont ensuite été

utilisées pour transduire les cellules 769P SURF4^{KO} et FITM2^{KO}. Les VLPs étaient diluées dans du milieu RPMI contenant 8 µg/ml de polybrène, et déposées sur les cellules KO ensemencées la veille en plaques 12 puits (150 000 cellules par puits). Les cellules transduites étaient sélectionnées avec de la puromycine 4µg/ml jusqu'à ce que toutes les cellules non transduites soient mortes. La transduction a été vérifiée par cytométrie de flux avec un marquage HA.

1.5. Tests d'infection

Les tests d'infection ont été réalisées sur les cellules RPTE-hTERT pour la titration des stocks viraux, et sur les cellules 769P^{KO} ou addback (trans-complémentées) pour la caractérisation des clones SURF4 et FITM2.

Dans les deux cas, les cellules étaient ensemencées la veille en plaque de culture 24 puits à une densité de 80 000 cellules par puits. Le jour de l'infection, le milieu de culture était retiré des puits et les dilutions virales en série déposée à raison de 100µl dans chaque puits. Après 2h d'incubation à 37°C, 100 µl milieu de culture était ajouté dans chaque puits, et les cellules infectées remises en incubation à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO_2. Les cellules étaient fixées à 72h post-infection avec une solution de PBS + PFA (para-formaldéhyde) 2%, puis perméabilisées avec un tampon de PBS contenant du triton à une concentration finale de 1%. Les cellules étaient ensuite lavées avec un tampon de FACS (fluorescence activated cell sorting) (PBS contenant du sérum de veau fœtal au 1/20ème, du sodium azide NaN_3 10% au 1/500ème, et du Tween 0.05%), puis marquées avec un anticorps anti-LTAg du SV40 (PAb416, Abcam) à une concentration finale de 2 µg/ml (incubation 1h à 4°C). La révélation était effectuée avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome A488 dilué au 1/1000ème (Jackson ImmunoResearch). Le pourcentage de cellules infectées dans chaque puits était quantifié par cytométrie de flux sur un cytomètre Attune NxT Flow (Thermo Fischer Scientific), en comptabilisant le nombre de cellules positives pour la détection de l'antigène grand T.

2. Résultats

2.1. Résultats du crible CRISPR-Cas9 sur cellules RPTE-hTERT

Afin d'identifier des facteurs cellulaires essentiels au cycle de réplication du BKPyV, nous avons réalisé un crible CRISPR-Cas9 génome complet sur des cellules RPTE- hTERT (Figure 28A). Les résultats de l'analyse de l'enrichissement des cellules transduites et sélectionnées après infection par le virus BK-Dunlop sont présentés dans la Figure 28B (logiciel MAGeCK, Plateforme MGX, Institut Génomique Fonctionnelle, Montpellier).

Les gènes codant pour les protéines SURF4, FITM2, et dans une moindre mesure PALM2 (paralemmin 2) et PALM2-AKAP2 (A-Kinase Anchoring protein 2), étaient significativement enrichis dans le crible. Aucune de ces molécules n'avait précédemment été décrite comme étant associée à l'infection par le BKPyV. Dans la suite du projet, nous avons choisis de nous focaliser sur les protéines SURF4 et FITM2.

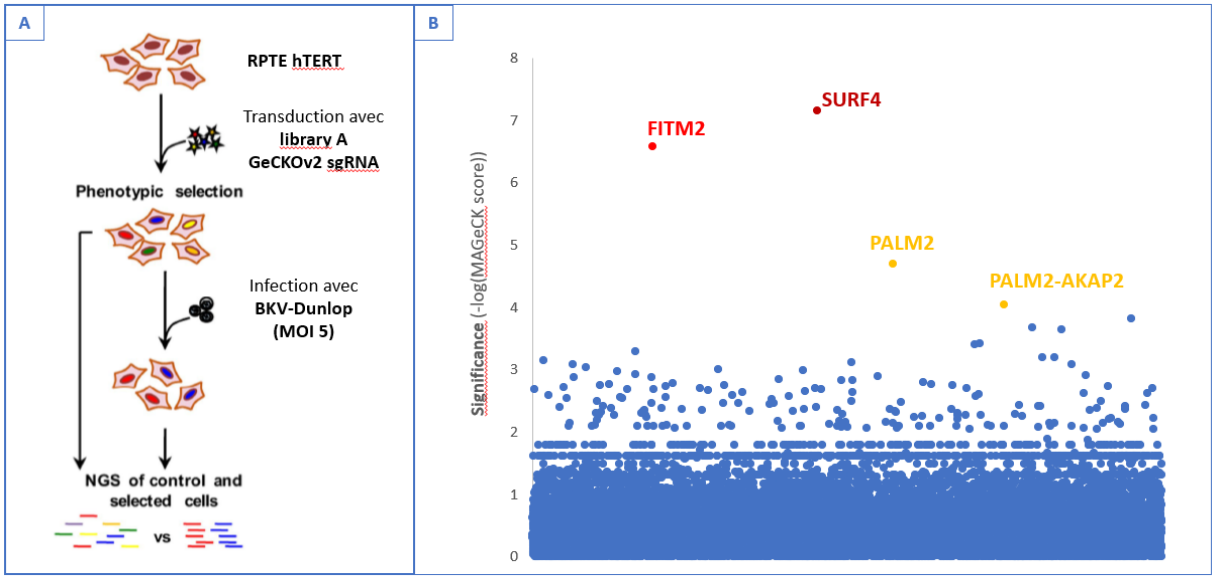


Figure 28. **Crible CRISPR Cas9 génome complet sur cellules RPTE-hTERT**
A. Représentation schématique du protocole utilisé pour la réalisation du crible.
B. Résultats de l'analyse de l'enrichissement des séquences de sgRNA isolées à partir des cellules RPTE-hTERT transduites avec la librairie A après infectionpar le virus BK-Dunlop, comparativement à des cellules RPTE-hTERT parentales non infectées.

SURF4 (Surfeit Locus Protein 4) est une protéine transmembranaire de 269 AA localisée à la fois dans la membrane du RE et de l'ERGIC (Endoplasmic Reticulum – Golgi Intermediate Comprtment). Elle est impliquée dans le transport de protéines cargo entre le RE et l'ERGIC [219,220]. Un rôle de la protéine SURF4 a été déjà été mis en évidence dans la réplication des virus à ARN simple brins, en particulier le virus de l'hépatite C. Au cours de l'infection par le

VHC, elle est recrutée par la protéine NS4B pour permettre la formation des vésicules à double membrane (DMV) dont elle contribue à l'intégrité structurale, et qui constituent les sites de réplication virale [221]. SURF-4 pourrait également jouer un rôle dans le cycle viral du virus de la dengue [222].

FITM2 (Fat storage Inducing TransMembrane protein 2), est un membre d'une famille de protéines hautement conservées chez les eucaryotes [223]. Il s'agit d'une protéine de 262 AA contenant 5 domaines transmembranaires, et qui est principalement localisée dans la membrane du RE de nombreux types cellulaires. Elle joue un rôle essentiel dans la formation et le budding des particules lipidiques (« lipid droplets »), en recrutant au niveau de la membrane du RE plusieurs partenaires lipidiques (triglycérides, diacylglycérol) [224]. Elle jouerait également un rôle dans la régulation de l'architecture de la membrane du RE.

2.2. Effets de la perte de fonction de SURF4 et FITM2 sur l'infection par le BK virus dans les cellules 769P

Afin de valider l'importance de SURF4 et/ou FITM2 comme facteurs cellulaires essentiels à la réplication du BKPyV, nous avons inactivé l'expression de ces deux gènes dans des cellules 769P à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 (génération des lignées769P FITM2^{KO} et SURF4^{KO}). Les cellules 769P sont des cellules dérivées d'adénocarcinome rénal humain, dont la culture cellulaire et la transfection est plus aisée que les cellules RPTE-hTERT. Nous avons donc choisi dans un premier temps de valider les deux hits identifiés lors du crible sur cette lignée cellulaire.

Après transfection des cellules 769P avec les plasmides lentiCRISPRv2, l'inactivation de FITM2 et SURF4 a été confirmée par séquençage de l'ADN génomique dans deux clones cellulaires pour FITM2 (sg2C2 et sg2C6), et deux clones pour SURF4 (sg2C11 et sg2C16). En absence d'anticorps commercial disponible et fiable pour ces deux protéines, nous n'avons pas pu valider les lignées cellulaires 76P KO en Western blot ni en immunofluorescence. Les cultures cellulaires des cellules FITM2^{KO} et SURF4^{KO} montraient que l'inactivation de ces deux gènes n'avaient pas d'impact sur la viabilité ou la croissance cellulaire. Les cellules 769P SURF^{KO} et FITM2^{KO} ont ensuite été infectées avec la souche de BK-Dunlop à des MOI croissantes (0.2, 1 et 5). L'infection des clones 769P SURF^{KO} et FITM2^{KO} était significativement réduite comparativement aux cellules 769P parentales, ou à des cellules transfectées avec un vecteur vide (sg-GFP) (Figure 29A et 29B). La trans-complémentation des cellules KO avec des cDNA

codant pour FITM2-HA et SURF4-HA restaurait le pourcentage d'infection par le BK virus à un niveau identique à celui des cellules 769P parentales.

Les surnageants des différentes lignées cellulaires infectées par le BK-Dunlop (cellules parentales, lignées KO et addback avec cDNA ou vecteur vide) ont été récoltés, et dilués au ½ pour infecter des cellules 769P parentales. Le pourcentage d'infection avec le surnageant des clones SURF^{KO} et FITM2^{KO} était diminué comparativement aux surnageant des cellules parentales (Figure 29C et 29D). Le surnageant des cellules FITM2^{KO} addback permettait de restaurer un taux d'infection similaire aux cellules parentales, mais pas le surnageant des cellules SURF4^{KO} addback. Seule la restauration de l'expression de FITM2 dans les cellules KO permettait donc au BK virus de réaliser un cycle de réplication complet et produire des virions infectants dans le surnageant.

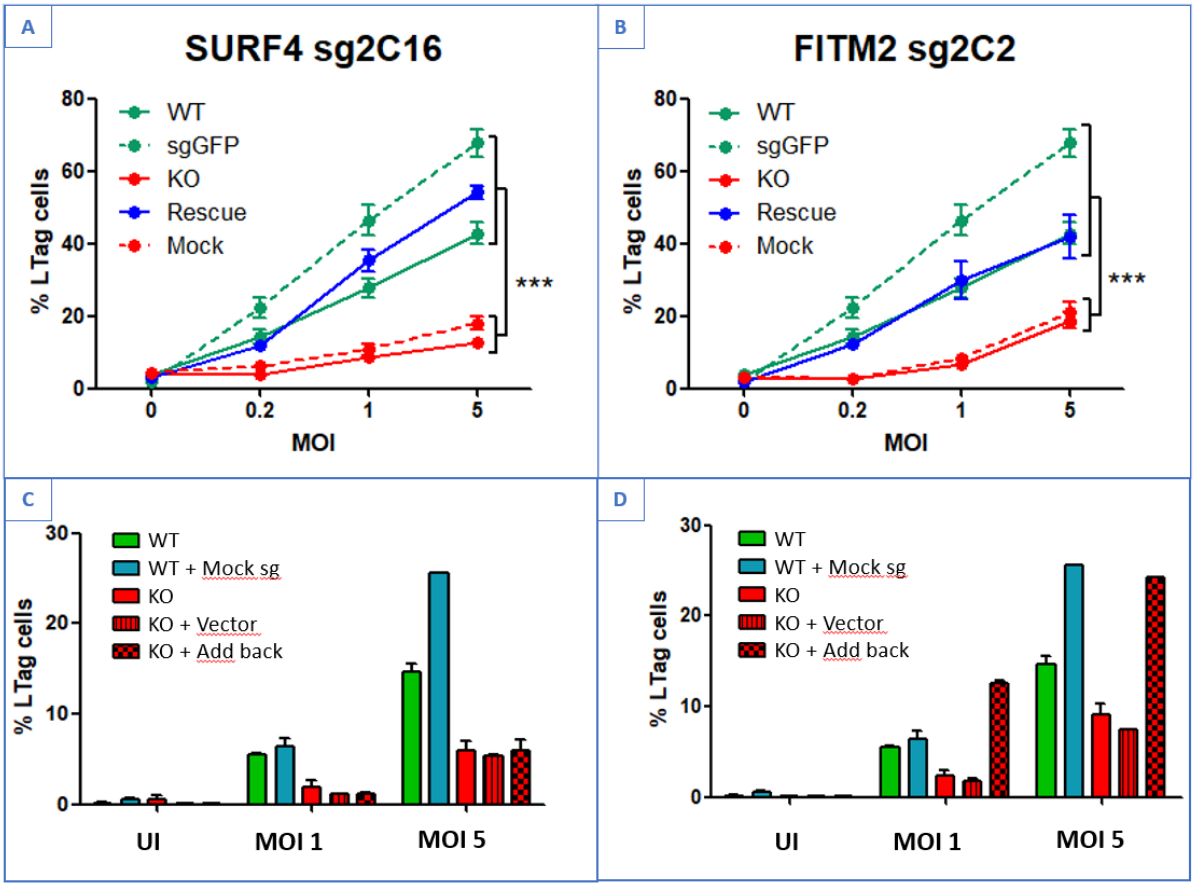


Figure 29. **SURF4 et FITM2 sont des facteurs proviraux essentiels pour l'infection à BKPyV dans les cellules 769P**

A-B. Pourcentage d'infection des clones 769P SURF4^{KO} sg2c16 (A) et FITM2^{KO} sg2C2 (B) avant et après addback avec virus BK-Dunlop à différentes MOI. Pour chaque MOI, les expériences ont été réalisées 3 (MOI 0.2) ou 4 fois (MOI 0, 1 et 5) : les moyennes et écarts types sont représentés.
*** p<0.001 (Two-way ANOVA)

C-D. Pourcentage d'infection de cellules 769P parentales avec les surnageants des différentes lignées cellulaires infectées par le virus BK-Dunlop en Figure A et B : SURF4^{KO} sg2c16 (C) et FITM2^{KO} sg2C2 (D) avant et après addback. Les expériences ont été effectuées une ou deux fois selon les conditions (les moyennes et écarts types des expériences sont présentées pour celles réalisées deux fois).

Au total, ces résultats démontrent que la perte d'expression de SURF4 et FITM2 est responsable du phénotype de résistance à l'infection observée dans les cellules 769P SURF4KO et FITM2KO.

2.3. SURF4 et FITM2 interviennent à la phase précoce du cycle d'infection par le BKPyV dans les cellules 769P

Afin de déterminer à quelle étape du cycle de réplication viral les protéines SURF4 et/ou FITM2 interviennent, nous avons réalisé des tests d'infection des différentes lignées cellulaires décrites précédemment avec des pseudo-particules virales (VLPs) exprimant la protéine de capside du virus BKPyV-IVb1 et le gène rapporteur de la Gaussia luciférase (protocole détaillé de production des VLP décrits dans la Partie 2 – Méthodes). Les VLPs ne contiennent pas de matériel génétique viral, et ne sont donc pas capables de réaliser un cycle complet d'infection contrairement aux particules virales natives. Elles permettent donc d'étudier la phase précoce du cycle d'infection par le BKPyV (attachement aux récepteurs des cellules cibles, endocytose, décapsidation et transfert dans le noyau).

Des quantités croissantes de VLP BKPyV-VP1-IVb1 (0, 1 ou 5 µL) étaient déposées sur les cellules 769P ensemencées la veille en plaque P96 (15 000 cellules par puits). Après 48h d'incubation, l'expression du gène rapporteur (*Gluc*) était quantifiée à l'aide du kit Nano-Glo® Luciferase (Promega) comme décrit précedemment (Partie 2 – Méthodes). Les résultats sont présentés dans la Figure 30.

Le signal luciférase 48h après infection par les VLP-BKPyV était plus faible dans les cellules 769P^{KO} pour l'expression de FITM2 et SURF4 comparativement aux cellules parentales. Dans les lignées addback, la restauration de l'expression des deux protéines était associée à un taux d'infection proche de celui des cellules parentales, en particulier pour FITM2.

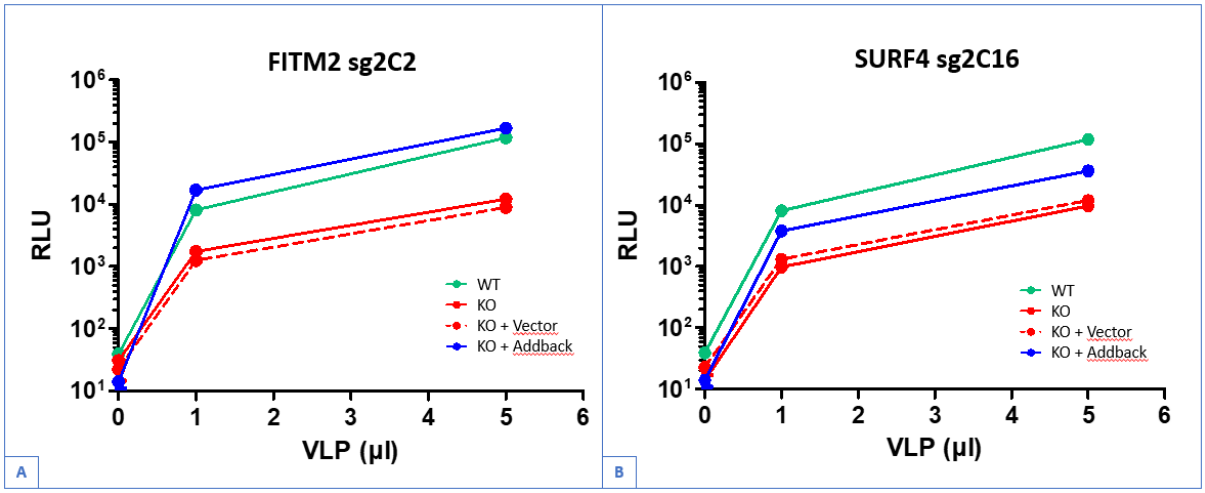


Figure 30. **SURF4 et FITM2 interviennent à la phase précoce du cycle d'infection par le BKPyV dans les cellules 769P**

La quantification du signal luciférase (RLU : relative light units) après 48h d'infection des différentes lignées cellulaires par les VLP BKPyV-VP1-IVb1 est représentée. L'expérience a été réalisée une seule fois ; chaque valeur correspond à la moyenne de chaque condition testée en triplicate.

Ces résultats préliminaires suggèrent que les protéines SURF4 et FITM2 interviennent à la phase précoce du cycle d'infection par le BKPyV, puisque leur inactivation est également associée à une baisse de l'infection par les VLP, comme observé pour des particules virales complètes.

3. Discussion

Dans cette troisième et dernière partie du travail de thèse, nous présentons pour la première fois les résultats d'un crible CRISPR-Cas9 génome complet effectué sur des cellules rénales primaires infectées par le BK virus. Ce dernier nous a permis d'identifier deux « top hits », les protéines FITM2 et SURF4, dont l'expression était significativement enrichie dans le crible, et qui pourraient constituer des facteurs cellulaires essentiels à l'infection par le BKPyV.

La validation du rôle de ces protéines dans le cycle de réplication du BKPyV est en cours et les résultats présentés dans cette partie sont encore préliminaires. En effet, l'étude de ces deux facteurs se heurte à de nombreuses difficultés expérimentales.

En premier lieu, la culture des cellules rénales primaires immortalisées RPTE-hTERT utilisées pour la réalisation du crible est difficile et longue. De plus, le taux de transfection de ces

cellules était très faible, et ce malgré l'utilisation de différentes méthodes expérimentales (trousse Lipofectamine 3000 [ThermoFisher Scientific], kit TransfeX [ATCC], ou phosphate de calcium). Nous n'avons donc pas pu générer des lignes cellulaires RPTE-hTERT KO pour l'expression des protéines SURF4 et FITM2.

De plus, il n'existe à ce jour pas d'anticorps commercial fiable pour la quantification de l'expression des protéines SURF4 ou FITM2 en immunofluorescence ou en Western Blot. Les lignées cellulaires 769P^{KO} pour les gènes SURF4 et FITM2 ont donc été validées par analyse génétique confirmant les modifications de séquence liées à la transfection des sgRNA. Mais nous n'avons pas pu confirmer la diminution de l'expression des protéines dans les cellules. Une autre alternative a été de générer des protéines SURF4 et FITM2 avec un tag HA (hémagglutinine) pour les expériences de transcomplémentation. Cependant, nous ne pouvons exclure que la présence du tag HA modifie la conformation de la protéine, altérant san fonction au cours du cycle de réplication viral.

Malgré ces écueils expérimentaux, les résultats présentés suggèrent un rôle important pour les protéines SURF4 et FITM2, en tant que facteurs proviraux essentiels au cycle de réplication du BKPyV. En effet, l'inactivation de ces deux gènes dans les cellules d'adénocarcinome rénal 769P étaient associées à une réduction significative du taux d'infection par le virus BK Dunlop. De plus, la restauration de l'expression de ces protéines dans les lignées 769P^{KO} avec des cDNA codant pour SURF4-HA et FITM2-HA était de nouveau à une sensibilité des lignées cellulaires vis-à-vis de l'infection par le BKPyV.

L'effet observés semblait plus important pour la protéine FITM2. De plus, les surnageants des cellules 769P FITM2^{KO} addback permettaient d'infecter à nouveau des cellules 769P parentales. Cela démontre que la restauration de l'expression de FITM2 dans les cellules 76P^{KO} pour l'expression de ce gène, permet de restaurer un cycle viral complet, aboutissant à la production de particules virales capables d'infecter à nouveau d'autres cellules.

Enfin, les expériences d'infection avec les VLP BKPyV permettent de supposer que les protéines SURF4 et FITM2 interviennent à la phase précoce du cycle d'infection par le BKPyV, puisque le taux d'infection avec les VLP était également réduit dans les cellules 769P FITM2^{KO} et 769P SURF4^{KO}.

Le rôle proviral de FITM2 et SURF4 dans l'infection à BKPyV doit cependant être validé avec plusieurs expériences complémentaires.

Dans un premier temps, l'effet observé dans les cellules 769P suite à l'inactivation de l'expression des deux protéines doit être confirmé dans les cellules utilisées pour la réalisation du crible CRISPR-Cas9, à savoir les cellules RPTE-hTERT. Du fait des difficultés à transfecter ces cellules, l'utilisation de techniques d'électroporation pour le transfert des sgRNA, et la génération de cellules RPTE-hTERT FITM2^{KO} et SURF4^{KO} pourrait être envisagée.

De plus, des tests d'infection des clones 769P FITM2^{KO} et SURF4^{KO} avec d'autres virus incluant d'autres souches de BKPyV que la BK-Dunlop (BKV-II, Ib1, et Ic produites au laboratoire à partir d'urines de patients), d'autres PyV (JCPyV, MCPyV), ainsi que d'autres types de virus (dengue, chikungunya, mayaro). Ces tests d'infection devraient nous permettre de déterminer si l'effet de l'inactivation de SURF4 et/ou FITM2 est spécifique à l'infection par le BKPyV et/ou par les autres polyomaviridae.

Enfin, le rôle potentiel de SURF4 et de FITM2 dans le cycle de réplication du BKPyV nécessite la mise en évidence d'une interaction entre ces deux molécules et les protéines virales. Pour cela, des expériences de co-immunoprécipitation avec les protéines SURF4 et FITM2 (tag HA) et les protéines virales Agno / VP1 / VP2 et VP3 (tag Flag) sont prévues.

Même si le rôle de SURF4 et FITM2 dans le cycle de réplication du BKPyV reste à démontrer de manière certaine, la localisation cellulaire, la fonction de ces protéines, et leur implication dans le cycle de réplication d'autres virus en fait des candidats potentiels intéressants.

FITM2 et SURF4 sont toutes deux principalement localisées dans le réticulum endoplasmique, où se déroule une des étapes clé du cycle de réplication du BKPyV (décapsidation partielle avant transfert dans le noyau). En particulier, plusieurs données expérimentales suggèrent que le BKPyV pourrait utiliser la machinerie ERAD pour sortir du reticulum endoplasmique après décapsidation partielle et avant transfert dans le noyau [30,225]. FITM2 et SURF4 pourrait donc être impliqué dans l'interaction avec un ou plusieurs partenaires protéiques de la machinerie ERAD pour faciliter le transfert des particules virales.

Une autre hypothèse concernant le rôle potentiel de FITM2 dans le cycle viral, pourrait être en lien avec sa fonction dans la formation et le « budding » des particules lipidiques (« lipid droplets ») [224]. En effet, des travaux précédents ont mis en évidence une colocalisation de la protéine Agno avec les lipid droplets [10]. FITM2 pourrait donc intervenir à la phase plus tardive du cycle cellulaire lors de la maturation des particules virales et de leur exocytose.

Conclusion et perspectives

Le BKPyV est un pathogène opportuniste, dont la réactivation chez les patients transplantés rénaux, peut conduire à la survenue d'une néphropathie (BKVN) dont le pronostic rénal est sombre en absence d'arme thérapeutique. Le diagnostic précoce, la prévention et le traitement de l'infection à BKPyV constituent des enjeux majeurs en transplantation rénale afin de réduire la morbidité associée. Pour cela, une meilleure compréhension des mécanismes virologiques, immunologiques et cellulaires associés à la réactivation du BKPyV est indispensable.

Dans ce travail de thèse, nous décrivons de manière précise la cinétique de réplication du BKPyV et son évolution génétique dans le plasma et le rein de patients transplantés rénaux avec une infection à BKPyV évoluant vers une BKVN prouvée histologiquement, à l'aide techniques variées et innovantes. En parallèle, nous avons analysé la réponse anticorps neutralisante à l'aide de tests de neutralisation spécifiques des génotypes de BKPyV. Enfin, les données expérimentales issues du cribles CRISPR-Cas9 ont identifié deux protéines qui pourraient jouer un rôle clé dans le cycle de réplication du BKPyV. Les résultats obtenus apportent des informations nouvelles sur l'infection à BKPyV, de la compréhension du cycle viral à la physiopathologie de la néphropathie virale chez les greffés rénaux.

La réactivation du BKPyV est un évènement fréquent chez les greffés rénaux, en particulier dans le compartiment urinaire. L'identification de **déterminants virologiques** de la progression de la virurie vers une virémie persistante et/ou une BKVN pourraient permettre de mieux identifier les patients transplantés à risque de développer des complications liées à l'infection par le BKPyV.

Tout d'abord, la connaissance de l'origine de la souche de BKPyV se réactivant en post-greffe pourrait permettre de proposer un screening ciblé du donneur et/ou du receveur en amont de la transplantation. Actuellement, la plupart des études suggèrent que le virus responsable des lésions rénales en cas de BKVN est issu du donneur, et transmis par l'intermédiaire du greffon au cours de la transplantation rénale. Notre étude est la première à avoir analysé de manière longitudinale l'évolution des populations virales majoritaires et minoritaires dans le plasma et le rein de la greffe au diagnostic de BKVN. Nos résultats ont révélé que chez une partie des patients, le virus issu du donneur (isolé dans le rein au moment de la greffe), n'était pas celui responsable de la néphropathie. En particulier, on observait chez un sujet le remplacement progressif de la souche présente dans le rein à la date de greffe, par la souche

détectée dans le plasma à partir du début de la virémie et détectée dans le rein au moment de la néphropathie. Ces données démontrent donc que l'infection par le BKPyV chez les greffés rénaux peut résulter au moins en partie de la réplication d'une souche de BKPyV qui n'est pas celle transmise par le donneur. Elle pourrait correspondre à la souche du receveur (qui se réactive à partir du réservoir que constitue le tractus uro-génital [vessie, uretères, reins natifs]), ou à une autre souche acquise *de novo* en post-greffe. De plus, la souche circulant dans le plasma, même précocement était identique à celle retrouvée dans le rein au diagnostic de BKVN. Nous suggérons donc que chez le greffé rénal, la ou les souches de BKPyV latentes du receveur dans la vessie sont susceptibles de se réactiver sous l'effet des immunosuppresseurs, dans le compartiment urinaire initialement. En cas de réactivation persistante, les mêmes souches peuvent circuler dans le plasma et infecter secondairement le greffon.

Il est probable que les différents mécanismes (transmission par le donneur, réactivation chez le receveur, acquisition *de novo*) ne soient pas mutuellement exclusifs. Notre hypothèse demande cependant à être confirmée sur une plus large cohorte de patients. Une analyse prospective des populations de BKPyV dans les différents compartiments biologiques en pré- et post-greffe rénale chez les donneurs et receveurs, pourrait permettre d'élucider la contribution de chacun des mécanismes décrits précédemment à l'infection par le BKPyV.

Parmi les facteurs déterminants la sévérité d'une infection virale, la variabilité génétique du virus constitue un élément majeur. L'acquisition de mutations au cours du temps peuvent permettre au virus d'augmenter sa « fitness », en lui permettant selon les cas d'échapper à la réponse immunitaire innée ou adaptative, de modifier les mécanismes d'entrée dans la cellule, et/ou de favoriser la réplication virale. Si les virus à ADN comme le BKPyV ont une variabilité génétique moindre que les virus à ARN, des études récentes ont mis en évidence une variabilité inter et intra-individuelle plus importante qu'initialement soupçonnée, suggérant que ce mécanisme pourrait avoir un impact *in vivo* sur la sévérité de l'infection à BK virus chez les greffés rénaux. Les résultats de l'analyse des sous-populations de BKPyV en WGS présentés dans notre étude n'ont pas mis en évidence de compartimentalisation forte, le même génotype majoritaire de BKPyV étant retrouvée dans le rein et le plasma concomitant. Cependant la présence de mutations non synonymes entre les séquences des populations virales, suggère malgré tout l'existence de pressions de sélections différentes entre le plasma et le rein. Le compartiment rénal pourrait en effet être moins accessible aux anticorps neutralisants, et le BKPyV y est donc soumis uniquement à une pression de sélection

immunitaire cellulaire innée et adaptative. Cette pression de sélection immunitaire différentielle pourrait expliquer les différences observées entre les populations des deux compartiments, et le fait que les lésions histologiques de BKVN peuvent persister malgré la clairance de la virémie dans le plasma.

Enfin, l'analyse fine des sous-populations virale en NGS retrouvait la présence de co-infections dans plus d'un tiers des échantillons. Sous réserve des limites de spécificité de la technique, ces résultats originaux sont intéressants à plusieurs titres. Tout d'abord, la présence de plusieurs sous-types viraux est un argument supplémentaire en faveur du rôle de la réactivation de(s) souche(s) de BKPyV du receveur dans la physiopathologie de l'infection virale chez les greffés rénaux. La présence de deux ou trois sous-types de BKPyV au diagnostic de BKVN dans le rein et le plasma pourrait être lié à la réactivation des souches acquises par le receveur en amont de la greffe, sous l'effet des immunosuppresseurs. De plus, la co-infection par plusieurs sous-types viraux constitue le plus souvent un marqueur de sévérité d'une infection virale. Il serait donc intéressant de comparer les résultats observés dans notre cohorte de patients avec une BKVN prouvée histologiquement, à des patients présentant une virémie et/ou une virurie isolée, afin de déterminer si la présence de co-infections est corrélée à la sévérité de l'infection.

Au total, les résultats de l'analyse de la diversité virale présentés dans cette étude demandent à être confirmés sur une plus large cohorte de patients. Le séquençage prospectif des échantillons de plasmas et de biopsie rénale à l'aide des outils mis au point et développés au cours de ce travail, pourrait permettre d'éclairer davantage les mécanismes d'évolution virale du BKPyV *in vivo* chez les transplantés rénaux.

Outre les potentiels déterminants virologiques (évolution virale au cours du temps, compartimentalisation, coinfections), des **déterminants immunologiques** pourraient également expliquer la survenue de la néphropathie. La coexistence de plusieurs sous-types de BKPyV dans les échantillons biologiques, qui peuvent constituer des sérotypes différents suggèrent que l'échappement à la réponse immunitaire humorale pourrait jouer un rôle. Cette hypothèse avait également été proposée par des travaux récents qui retrouvaient une neutralisation moins importante de certaines souches de BKPyV détectées dans les urines de patients transplantés rénaux avec une réplication virale persistante.

Dans notre étude, l'analyse exhaustive des réponses anticorps-neutralisantes vis-à-vis des différents sous-types de BKPyV retrouvaient une cross-réactivité importante de la réponse humorale anti-BKV chez les patients avec une BKVN. Le titre d'AcN vis-à-vis de la souche responsable de la BKVN n'était pas plus faible comparativement aux autres souches. Même si nous n'avons pas réalisé de tests de neutralisation avec des VLPs contenant les variants détectés en Sanger ou en WGS, nos résultats suggèrent que l'échappement à la réponse humorale des variants détectés dans le plasma et/ou le rein au moment de la BKVN ne constitue pas un mécanisme prépondérant expliquant la survenue de la néphropathie.

La réponse humorale semble avant tout être le reflet de la réplication virale (et de la stimulation antigénique associée). Son rôle effecteur dans la clairance du virus et la régression des lésions de néphropathie en cas de virémie persistante n'est pas démontré. Dans ce contexte, l'immunité cellulaire joue un rôle prédominant. N'ayant pas pu analyser cette composante à partir des échantillons de sérums collectés de manière rétrospective, un projet est en cours afin d'évaluer de manière prospective la réponse immune cellulaire anti-BKPyV à l'aide de tests ELISpot chez les patients greffés rénaux avec ou sans virémie BK virus. Cet outil pourrait nous permettre de mieux identifier les patients à risque de persistance de la virémie BKPyV et/ou d'évolution vers la BKVN, afin de moduler rapidement les traitements immunosuppresseurs.

Sur le plan thérapeutique, la cross-réactivité observée chez les patients avec une réplication virale prolongée suggère que l'administration d'anticorps neutralisants produits par des clones de LB isolés chez ces patients pourrait prévenir la survenue d'une infection à BKPyV chez des patients. L'administration précoce d'IgIV (qui contiennent des AcN dirigés contre le BK virus [génotype I en particulier]) a démontré un bénéfice dans la réduction du risque de survenue ultérieure d'une virémie chez les patients avec un titre d'AcN faible ou nul en pré-greffe [137]. L'administration d'anticorps neutralisants pan génotypique pourrait permettre de prévenir l'infection virale quel que soit le sous type.

Enfin, l'identification de **facteurs cellulaires** impliqués dans la réactivation du BKPyV est un élément clé dans la compréhension de la physiopathologie de l'infection virale. Nous avons réalisé pour la première fois un crible CRISPR-Cas9 sur des cellules rénales primaires. Le crible a permis d'identifier deux « top-hits », les protéines FITM2 et SURF4, dont l'inactivation est associée à une réduction significative du taux d'infection par le BKPyV. La validation du rôle de ces deux protéines dans le cycle de réplication du virus demande à être confirmée, mais

les premières données semblent confirmer le rôle potentiel de ces facteurs (en particulier FITM2) dans l'étape de décapsidation du virus dans le réticulum endoplasmique

En dépit de la fréquence de l'infection après la transplantation rénale, il n'existe à ce jour aucune molécule antivirale disponible pour le traitement de l'infection par le BK virus. Ceci est en grande partie lié à une mauvaise connaissance du cycle de réplication viral. A ce titre, l'identification de FITM2 et SURF4 comme facteurs cellulaires essentiels au cycle de réplication du BKPyV fait de ces deux protéines des cibles thérapeutiques potentielles, d'autant que l'effet observé sur la baisse de l'infection virale en cas d'inactivation de ces molécules semble spécifique aux PyV. Afin d'identifier au plus vite des candidats thérapeutiques, la réalisation de cribles de molécules antivirales est une approche alternative plus rapide et pragmatique. Nous avons pour objectif de développer ce projet en collaboration avec la société Hybrigenics SA, afin de tester l'effet de plusieurs centaines de molécules sur l'infection de cellules rénales primaires RPTE par le BKPyV,.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis d'améliorer notre compréhension de l'infection par le BKPyV chez les transplantés rénaux, en particulier la diversité des populations virales dans les différents compartiments au cours de l'infection, et la cinétique de la réponse anticorps neutralisante. Nos travaux ont également permis de découvrir deux protéines qui semblent jouer un rôle clé dans le cycle de réplication viral, et qui pourraient à terme constituer des cibles thérapeutiques potentielles, aucun traitement antiviral n'existant à ce jour pour la prise en charge de l'infection par le BKPyV.

Références

1. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet **1971**; 1:1253–1257.
2. Furmaga J, Kowalczyk M, Zapolski T, et al. BK Polyomavirus-Biology, Genomic Variation and Diagnosis. Viruses **2021**; 13:1502.
3. Buck CB, Van Doorslaer K, Peretti A, et al. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. PLoS Pathog **2016**; 12:e1005574.
4. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. Clinical Microbiology Reviews **2017**; 30:503–528.
5. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. Lancet Infect Dis **2003**; 3:611–623.
6. Hurdiss DL, Morgan EL, Thompson RF, et al. New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. Structure **2016**; 24:528–536.
7. Hurdiss DL, Frank M, Snowden JS, Macdonald A, Ranson NA. The Structure of an Infectious Human Polyomavirus and Its Interactions with Cellular Receptors. Structure **2018**; 26:839-847.e3.
8. Helle F, Brochot E, Handala L, et al. Biology of the BKPyV: An Update. Viruses **2017**; 9.
9. Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. Virology **2013**; 437:63–72.
10. Unterstab G, Gosert R, Leuenberger D, Lorentz P, Rinaldo CH, Hirsch HH. The polyomavirus BK agnoprotein co-localizes with lipid droplets. Virology **2010**; 399:322–331.
11. Leuenberger D, Andresen PA, Gosert R, et al. Human polyomavirus type 1 (BK virus) agnoprotein is abundantly expressed but immunologically ignored. Clin Vaccine Immunol **2007**; 14:959–968.
12. Panou M-M, Prescott EL, Hurdiss DL, et al. Agnoprotein Is an Essential Egress Factor during BK Polyomavirus Infection. Int J Mol Sci **2018**; 19.
13. Darbinyan A, Siddiqui KM, Slonina D, et al. Role of JC virus agnoprotein in DNA repair. J Virol **2004**; 78:8593–8600.
14. Johannessen M, Myhre MR, Dragset M, Tümmler C, Moens U. Phosphorylation of human polyomavirus BK agnoprotein at Ser-11 is mediated by PKC and has an important regulative function. Virology **2008**; 379:97–109.
15. Bethge T, Hachemi HA, Manzetti J, Gosert R, Schaffner W, Hirsch HH. Sp1 sites in the noncoding control region of BK polyomavirus are key regulators of bidirectional viral early and late gene expression. J Virol **2015**; 89:3396–3411.
16. Moens U, Van Ghelue M. Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. Virology **2005**; 331:209–231.
17. Groux-Degroote S, Guérardel Y, Delannoy P. Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. Chembiochem **2017**; 18:1146–1154.
18. Savas B, Astarita G, Aureli M, Sahali D, Ollero M. Gangliosides in Podocyte Biology and Disease. Int J Mol Sci **2020**; 21.
19. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. J Virol **2006**; 80:1361–1366.
20. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. J Virol **2005**; 79:14442–14445.

21. Zhao L, Marciano AT, Rivet CR, Imperiale MJ. Caveolin- and clathrin-independent entry of BKPyV into primary human proximal tubule epithelial cells. Virology **2016**; 492:66–72.
22. Swimm AI, Bornmann W, Jiang M, Imperiale MJ, Lukacher AE, Kalman D. Abl family tyrosine kinases regulate sialylated ganglioside receptors for polyomavirus. J Virol **2010**; 84:4243–4251.
23. Holthöfer H, Reivinen J, Miettinen A. Nephron segment and cell-type specific expression of gangliosides in the developing and adult kidney. Kidney Int **1994**; 45:123–130.
24. Eash S, Querbes W, Atwood WJ. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. J Virol **2004**; 78:11583–11590.
25. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. Update on BK virus entry and intracellular trafficking. Transpl Infect Dis **2006**; 8:62–67.
26. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, Cubitt CL, Ramos E. BK polyoma virus allograft nephropathy: ultrastructural features from viral cell entry to lysis. Am J Transplant **2003**; 3:1383–1392.
27. Chong PP, Handler L, Weber DJ. A Systematic Review of Safety and Immunogenicity of Influenza Vaccination Strategies in Solid Organ Transplant Recipients. Clin Infect Dis **2018**; 66:1802–1811.
28. Eash S, Atwood WJ. Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. J Virol **2005**; 79:11734–11741.
29. Dupzyk A, Tsai B. How Polyomaviruses Exploit the ERAD Machinery to Cause Infection. Viruses **2016**; 8.
30. Bennett SM, Jiang M, Imperiale MJ. Role of cell-type-specific endoplasmic reticulum-associated degradation in polyomavirus trafficking. J Virol **2013**; 87:8843–8852.
31. Inoue T, Dosey A, Herbstman JF, Ravindran MS, Skiniotis G, Tsai B. ERdj5 Reductase Cooperates with Protein Disulfide Isomerase To Promote Simian Virus 40 Endoplasmic Reticulum Membrane Translocation. J Virol **2015**; 89:8897–8908.
32. Geiger R, Andritschke D, Friebe S, et al. BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Nat Cell Biol **2011**; 13:1305–1314.
33. Ravindran MS, Bagchi P, Inoue T, Tsai B. A Non-enveloped Virus Hijacks Host Disaggregation Machinery to Translocate across the Endoplasmic Reticulum Membrane. PLoS Pathog **2015**; 11:e1005086.
34. Bennett SM, Zhao L, Bosard C, Imperiale MJ. Role of a nuclear localization signal on the minor capsid proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. Virology **2015**; 474:110–116.
35. Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Global effects of BKV infection on gene expression in human primary kidney epithelial cells. Virology **2010**; 397:73–79.
36. Justice JL, Needham JM, Thompson SR. BK Polyomavirus Activates the DNA Damage Response To Prolong S Phase. J Virol **2019**; 93.
37. Jiang M, Entezami P, Gamez M, Stamminger T, Imperiale MJ. Functional reorganization of promyelocytic leukemia nuclear bodies during BK virus infection. MBio **2011**; 2:e00281-00210.
38. Evans GL, Caller LG, Foster V, Crump CM. Anion homeostasis is important for non-lytic release of BK polyomavirus from infected cells. Open Biol **2015**; 5.
39. Handala L, Blanchard E, Raynal P-I, et al. BK polyomavirus hijacks extracellular vesicles for en bloc transmission. J Virol **2020**;
40. Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. J Med Virol **1982**; 10:91–99.
41. Vanchiere JA, Abudayyeh S, Copeland CM, Lu LB, Graham DY, Butel JS. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. J Clin Microbiol **2009**; 47:2388–2391.

42. Chatterjee M, Weyandt TB, Frisque RJ. Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. J Med Virol **2000**; 60:353–362.
43. Chesters PM, Heritage J, McCance DJ. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. J Infect Dis **1983**; 147:676–684.
44. Boldorini R, Veggiani C, Barco D, Monga G. Kidney and urinary tract polyomavirus infection and distribution: molecular biology investigation of 10 consecutive autopsies. Arch Pathol Lab Med **2005**; 129:69–73.
45. Simon-Santamaria J, Rinaldo CH, Kardas P, et al. Efficient uptake of blood-borne BK and JC polyomavirus-like particles in endothelial cells of liver sinusoids and renal vasa recta. PLoS One **2014**; 9:e111762.
46. Sundsfjord A, Flaegstad T, Flø R, et al. BK and JC viruses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons: prevalence, excretion, viremia, and viral regulatory regions. J Infect Dis **1994**; 169:485–490.
47. Dörries K, Vogel E, Günther S, Czub S. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. Virology **1994**; 198:59–70.
48. Haghighi MF, Seyyedi N, Farhadi A, et al. Polyomaviruses BK and JC DNA infection in peripheral blood cells from blood donors. Braz J Infect Dis **2019**; 23:22–26.
49. Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, et al. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. J Gen Virol **2000**; 81:1967–1973.
50. Burger-Calderon R, Madden V, Hallett RA, Gingerich AD, Nickeleit V, Webster-Cyriaque J. Replication of oral BK virus in human salivary gland cells. J Virol **2014**; 88:559–573.
51. Vago L, Cinque P, Sala E, et al. JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of AIDS patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **1996**; 12:139–146.
52. Broekema NM, Imperiale MJ. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. Proc Natl Acad Sci USA **2013**; 110:8200–8205.
53. 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 **2009**; 199:837–846.
54. McClure GB, Gardner JS, Williams JT, et al. Dynamics of pregnancy-associated polyomavirus urinary excretion: a prospective longitudinal study. J Med Virol **2012**; 84:1312–1322.
55. Zhong S, Zheng H-Y, Suzuki M, et al. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. J Clin Microbiol **2007**; 45:193–198.
56. Ghosh A, Tan TT, Linn YC, et al. What We Learned From Plasma BK-Virus Monitoring in Allogeneic Hematopoietic Transplant Recipients. Transplantation **2016**; 100:e17-18.
57. Laskin BL, Denburg MR, Furth SL, et al. The Natural History of BK Polyomavirus and the Host Immune Response After Stem Cell Transplantation. Clin Infect Dis **2020**; 71:3044–3054.
58. Cesaro S, Dalianis T, Hanssen Rinaldo C, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother **2018**; 73:12–21.
59. Saade A, Styczynski J, Cesaro S, Infectious Disease Working party of EBMT. BK virus infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation: An update on pathogenesis, immune responses, diagnosis and treatments. J Infect **2020**; 81:372–382.
60. Cesaro S, Dalianis T, Hanssen Rinaldo C, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother **2018**; 73:12–21.

61. Gilis L, Morisset S, Billaud G, et al. High burden of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant **2014**; 49:664–670.
62. Saade A, Gras J, Darmon M, et al. Incidence, risk factors and outcome of BK virus hemorrhagic cystitis following allogenic hematopoietic cell transplantation: a retrospective cohort study. Bone Marrow Transplant **2022**;
63. Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. Oncogene **2003**; 22:5192–5200.
64. Papadimitriou JC, Randhawa P, Rinaldo CH, Drachenberg CB, Alexiev B, Hirsch HH. BK Polyomavirus Infection and Renourinary Tumorigenesis. Am J Transplant **2016**; 16:398–406.
65. Jin Y, Zhou Y, Deng W, et al. Genome-wide profiling of BK polyomavirus integration in bladder cancer of kidney transplant recipients reveals mechanisms of the integration at the nucleotide level. Oncogene **2021**; 40:46–54.
66. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. Lancet Oncol **2012**; 13:339–340.
67. Dharnidharka VR, Cherikh WS, Abbott KC. An OPTN Analysis of National Registry Data on Treatment of BK Virus Allograft Nephropathy in the United States: Transplantation **2009**; 87:1019–1026.
68. Sharma R, Tzetzo S, Patel S, Zachariah M, Sharma S, Melendy T. BK Virus in Kidney Transplant: Current Concepts, Recent Advances, and Future Directions. Exp Clin Transplant **2016**; 14:377–384.
69. Sharif A, Alachkar N, Bagnasco S, et al. Incidence and outcomes of BK virus allograft nephropathy among ABO- and HLA-incompatible kidney transplant recipients. Clin J Am Soc Nephrol **2012**; 7:1320–1327.
70. Gabardi S, Townsend K, Martin ST, Chandraker A. Evaluating the impact of pre-transplant desensitization utilizing a plasmapheresis and low-dose intravenous immunoglobulin protocol on BK viremia in renal transplant recipients. Transpl Infect Dis **2013**; 15:361–368.
71. 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 **2002**; 347:488–496.
72. Funk GA, Gosert R, Comoli P, Ginevri F, Hirsch HH. Polyomavirus BK replication dynamics in vivo and in silico to predict cytopathology and viral clearance in kidney transplants. Am J Transplant **2008**; 8:2368–2377.
73. Babel N, Fendt J, Karaivanov S, et al. Sustained BK viruria as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. Transplantation **2009**; 88:89–95.
74. Hirsch HH, Randhawa P, the AST Infectious Diseases Community of Practice. BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation: BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation. American Journal of Transplantation **2013**; 13:179–188.
75. Ramos E, Drachenberg CB, Wali R, Hirsch HH. The Decade of Polyomavirus BK-Associated Nephropathy: State of Affairs: Transplantation **2009**; 87:621–630.
76. Bicalho CS, Oliveira RDR, David DR, et al. Determination of viremia cut-off for risk to develop BKPyV-associated nephropathy among kidney transplant recipients. Transpl Infect Dis **2018**; 20:e12969.
77. Trofe J, Hirsch HH, Ramos E. Polyomavirus-associated nephropathy: update of clinical management in kidney transplant patients. Transplant Infectious Disease **2006**; 8:76–85.
78. Gallais F, Benotmane I, Velay A, Solis M, Fafi-Kremer S. Le BK virus en greffe rénale. Revue Francophone des Laboratoires **2019**; 2019:44–52.

79. Varella RB, Almeida JR, Lopes P de F, Matos JPS de, Menezes P, Lugon JR. BK polyomavirus in kidney transplant recipients: screening, monitoring and clinical management. J Bras Nefrol **2014**; 36:529–534.
80. Demey B, Tinez C, François C, et al. Risk factors for BK virus viremia and nephropathy after kidney transplantation: A systematic review. Journal of Clinical Virology **2018**; 109:6–12.
81. Kayler L, Zendejas I, Schain D, Magliocca J. Ureteral stent placement and BK viremia in kidney transplant recipients. Transpl Infect Dis **2013**; 15:202–207.
82. Hirsch HH, Vincenti F, Friman S, et al. Polyomavirus BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study. Am J Transplant **2013**; 13:136–145.
83. Masutani K, Ninomiya T, Randhawa P. HLA-A2, HLA-B44 and HLA-DR15 are associated with lower risk of BK viremia. Nephrol Dial Transplant **2013**; 28:3119–3126.
84. Dogan SE, Celebi ZK, Akturk S, et al. Prevalence and Risk Factors of BK Viremia in Patients With Kidney Transplantation: A Single-Center Experience From Turkey. Transplant Proc **2017**; 49:532–536.
85. Molnar MZ, Potluri VS, Schaubel DE, et al. Association of donor hepatitis C virus infection status and risk of BK polyomavirus viremia after kidney transplantation. Am J Transplant **2022**; 22:599–609.
86. Sood P, Senanayake S, Sujeet K, et al. Lower prevalence of BK virus infection in African American renal transplant recipients: a prospective study. Transplantation **2012**; 93:291–296.
87. Maliakkal JG, Brennan DC, Goss C, et al. Ureteral stent placement and immediate graft function are associated with increased risk of BK viremia in the first year after kidney transplantation. Transpl Int **2017**; 30:153–161.
88. Theodoropoulos N, Wang E, Penugonda S, et al. BK virus replication and nephropathy after alemtuzumab-induced kidney transplantation. Am J Transplant **2013**; 13:197–206.
89. Knight RJ, Gaber LW, Patel SJ, DeVos JM, Moore LW, Gaber AO. Screening for BK viremia reduces but does not eliminate the risk of BK nephropathy: a single-center retrospective analysis. Transplantation **2013**; 95:949–954.
90. Wunderink HF, Haasnoot GW, de Brouwer CS, et al. Reduced Risk of BK Polyomavirus Infection in HLA-B51-positive Kidney Transplant Recipients. Transplantation **2019**; 103:604–612.
91. Dvir R, Paloschi V, Canducci F, et al. IL28B rs12979860 genotype as a predictor marker of progression to BKVirus Associated nephropathy, after kidney transplantation. Sci Rep **2017**; 7:6746.
92. Jacobi J, Prignitz A, Büttner M, et al. BK viremia and polyomavirus nephropathy in 352 kidney transplants; risk factors and potential role of mTOR inhibition. BMC Nephrol **2013**; 14:207.
93. Wunderink HF, van der Meijden E, van der Blij-de Brouwer CS, et al. Pretransplantation Donor-Recipient Pair Seroreactivity Against BK Polyomavirus Predicts Viremia and Nephropathy After Kidney Transplantation. Am J Transplant **2017**; 17:161–172.
94. Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, et al. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. Am J Transplant **2005**; 5:2213–2221.
95. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK Cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection. Science **2004**; 305:872–874.
96. Prince O, Savic S, Dickenmann M, Steiger J, Bubendorf L, Mihatsch MJ. Risk factors for polyoma virus nephropathy. Nephrol Dial Transplant **2009**; 24:1024–1033.

97. Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, et al. Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus. Am J Transplant **2007**; 7:1506–1514.
98. Manitpisitkul W, Drachenberg C, Ramos E, et al. Maintenance immunosuppressive agents as risk factors for BK virus nephropathy: a case-control study. Transplantation **2009**; 88:83–88.
99. Benavides C, Pollard V, Mauiyyedi S, Podder H, Knight R, Kahan B. BK Virus–Associated Nephropathy in Sirolimus-Treated Renal Transplant Patients: Incidence, Course, and Clinical Outcomes. Transplantation **2007**; 84:83–88.
100. Moscarelli L, Caroti L, Antognoli G, et al. Everolimus leads to a lower risk of BKV viremia than mycophenolic acid in de novo renal transplantation patients: a single-center experience. Clinical Transplantation **2013**; 27:546–554.
101. Liacini A, Seamone ME, Muruve DA, Tibbles LA. Anti-BK virus mechanisms of sirolimus and leflunomide alone and in combination: toward a new therapy for BK virus infection. Transplantation **2010**; 90:1450–1457.
102. Lanot A, Bouvier N, Chatelet V, et al. Infections à BK virus en transplantation rénale. Néphrologie & Thérapeutique **2016**; 12:76–85.
103. Borni-Duval C, Caillard S, Olagne J, et al. Risk Factors for BK Virus Infection in the Era of Therapeutic Drug Monitoring. Transplantation Journal **2013**; 95:1498–1505.
104. Drachenberg C, Hirsch H, Papadimitriou J, et al. Polyomavirus BK Versus JC Replication and Nephropathy in Renal Transplant Recipients: A Prospective Evaluation. Transplantation **2007**; 84:323–330.
105. Hsiao C-Y, Pilmore HL, Zhou L, de Zoysa JR. Outcomes of renal transplant recipients with BK virus infection and BK virus surveillance in the Auckland region from 2006 to 2012. World J Nephrol **2016**; 5:497–506.
106. Mindlova M, Boucek P, Saudek F, et al. Prevalence and risk factors of polyomavirus BK replication in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients from a single transplant center. Clin Transplant **2012**; 26:267–274.
107. Wingate JT, Brandenberger J, Weiss A, Scovel LG, Kuhr CS. Ureteral stent duration and the risk of BK polyomavirus viremia or bacteriuria after kidney transplantation. Transpl Infect Dis **2017**; 19.
108. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al. Incidence of BK with Tacrolimus Versus Cyclosporine and Impact of Preemptive Immunosuppression Reduction. American Journal of Transplantation **2005**; 5:582–594.
109. Hashim F, Rehman S, Gregg JA, Dharnidharka VR. Ureteral Stent Placement Increases the Risk for Developing BK Viremia after Kidney Transplantation. J Transplant **2014**; 2014:459747.
110. Egli A, Helmersen DS, Taub K, Hirsch HH, Johnson A. Renal Failure Five Years After Lung Transplantation Due to Polyomavirus BK-Associated Nephropathy: BKV Nephropathy in Native Kidneys After Lung Transplantation. American Journal of Transplantation **2010**; 10:2324–2330.
111. Loeches B, Valerio M, Pérez M, et al. BK virus in liver transplant recipients: a prospective study. Transplant Proc **2009**; 41:1033–1037.
112. Mallavarapu RK, Sanoff SL, Howell DN, Roberts JK. BK virus nephropathy in non-renal solid organ transplant recipients: Are we looking hard enough? Clin Transplant **2021**; 35:e14265.
113. Barton TD, Blumberg EA, Doyle A, et al. A prospective cross-sectional study of BK virus infection in non-renal solid organ transplant recipients with chronic renal dysfunction. Transpl Infect Dis **2006**; 8:102–107.

114. François C, Tinez C, Brochot E, et al. Impact of pre-graft serology on risk of BKPyV infection post-renal transplantation. Nephrol Dial Transplant **2022**; 37:781–788.
115. Verghese PS, Schmeling DO, Knight JA, Matas AJ, Balfour HH. The impact of donor viral replication at transplant on recipient infections posttransplant: a prospective study. Transplantation **2015**; 99:602–608.
116. Schwarz A, Linnenweber-Held S, Heim A, Framke T, Haller H, Schmitt C. Viral Origin, Clinical Course, and Renal Outcomes in Patients With BK Virus Infection After Living-Donor Renal Transplantation. Transplantation **2016**; 100:844–853.
117. Tan SK, Huang C, Sahoo MK, et al. Impact of Pretransplant Donor BK Viruria in Kidney Transplant Recipients. J Infect Dis **2019**; 220:370–376.
118. Vera-Sempere FJ, Rubio L, Felipe-Ponce V, et al. Renal donor implication in the origin of BK infection: analysis of genomic viral subtypes. Transplant Proc **2006**; 38:2378–2381.
119. Atencio IA, Shadan FF, Zhou XJ, Vaziri ND, Villarreal LP. Adult mouse kidneys become permissive to acute polyomavirus infection and reactivate persistent infections in response to cellular damage and regeneration. J Virol **1993**; 67:1424–1432.
120. Liang B, Tikhanovich I, Nasheuer HP, Folk WR. Stimulation of BK virus DNA replication by NFI family transcription factors. J Virol **2012**; 86:3264–3275.
121. Lamarche C, Orio J, Collette S, et al. BK Polyomavirus and the Transplanted Kidney: Immunopathology and Therapeutic Approaches. Transplantation **2016**; 100:2276–2287.
122. Drachenberg CB, Hirsch HH, Ramos E, Papadimitriou JC. Polyomavirus disease in renal transplantation: review of pathological findings and diagnostic methods. Hum Pathol **2005**; 36:1245–1255.
123. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. Am J Transplant **2004**; 4:2082–2092.
124. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. Clin Transplant **2019**; 33:e13528.
125. Nickeleit V, Singh HK, Randhawa P, et al. The Banff Working Group Classification of Definitive Polyomavirus Nephropathy: Morphologic Definitions and Clinical Correlations. JASN **2018**; 29:680–693.
126. Celik B, Randhawa PS. Glomerular changes in BK virus nephropathy. Hum Pathol **2004**; 35:367–370.
127. Chen X-T, Yang S-C, Chen W-F, et al. Glomerular Parietal Epithelial Cells Infection Is Associated With Poor Graft Outcome in Kidney Transplant Recipients With BK Polyomavirus-Associated Nephropathy. J Infect Dis **2019**; 219:1879–1886.
128. Johnston O, Jaswal D, Gill JS, Doucette S, Fergusson DA, Knoll GA. Treatment of Polyomavirus Infection in Kidney Transplant Recipients: A Systematic Review: Transplantation **2010**; 89:1057–1070.
129. Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, et al. Reducing Immunosuppression Preserves Allograft Function in Presumptive and Definitive Polyomavirus-Associated Nephropathy: Preservation of Allograft Function in BKV-Infection. American Journal of Transplantation **2010**; 10:2615–2623.
130. Sood P, Senanayake S, Sujeet K, et al. Management and outcome of BK viremia in renal transplant recipients: a prospective single-center study. Transplantation **2012**; 94:814–821.
131. Mallat SG, Tanios BY, Itani HS, et al. CMV and BKPyV Infections in Renal Transplant Recipients Receiving an mTOR Inhibitor-Based Regimen Versus a CNI-Based Regimen: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. Clin J Am Soc Nephrol **2017**; 12:1321–1336.

132. Vu D, Shah T, Ansari J, Naraghi R, Min D. Efficacy of Intravenous Immunoglobulin in the Treatment of Persistent BK Viremia and BK Virus Nephropathy in Renal Transplant Recipients. Transplantation Proceedings **2015**; 47:394–398.
133. Williams JW, Javaid B, Kadambi PV, et al. Leflunomide for Polyomavirus Type BK Nephropathy. New England Journal of Medicine **2005**; 352:1157–1158.
134. Kuypers DRJ, Vandooren A-K, Lerut E, et al. Adjuvant Low-Dose Cidofovir Therapy for BK Polyomavirus Interstitial Nephritis in Renal Transplant Recipients. American Journal of Transplantation **2005**; 5:1997–2004.
135. Tzannou I, Papadopoulou A, Naik S, et al. Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. J Clin Oncol **2017**; 35:3547–3557.
136. Lamarche C, Orio J, Georges-Tobar V, et al. Clinical-Scale Rapid Autologous BK Virus-Specific T Cell Line Generation From Kidney Transplant Recipients With Active Viremia for Adoptive Immunotherapy. Transplantation **2017**; 101:2713–2721.
137. Benotmane I, Solis M, Velay A, et al. Intravenous immunoglobulin as a preventive strategy against BK virus viremia and BKV-associated nephropathy in kidney transplant recipients-Results from a proof-of-concept study. Am J Transplant **2021**; 21:329–337.
138. Lindner JM, Cornacchione V, Sathe A, et al. Human Memory B Cells Harbor Diverse Cross-Neutralizing Antibodies against BK and JC Polyomaviruses. Immunity **2019**; 50:668-676.e5.
139. Pastrana DV, Ray U, Magaldi TG, Schowalter RM, Çuburu N, Buck CB. BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. J Virol **2013**; 87:10105–10113.
140. Muñoz-Gallego I, Díaz-Madridano N, Moral N, et al. Detection of BK polyomavirus genotypes to predict the development of BK polyomavirus-associated complications in kidney transplant recipients: A retrospective analysis. Transpl Infect Dis **2021**; :e13615.
141. Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, et al. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. J Gen Virol **2009**; 90:144–152.
142. Nishimoto Y, Zheng H-Y, Zhong S, et al. An Asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis. J Mol Evol **2007**; 65:103–111.
143. Yogo Y, Sugimoto C, Zhong S, Homma Y. Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications. Rev Med Virol **2009**; 19:185–199.
144. Zheng H-Y, Nishimoto Y, Chen Q, et al. Relationships between BK virus lineages and human populations. Microbes Infect **2007**; 9:204–213.
145. Jin L. Molecular methods for identification and genotyping of BK virus. Methods Mol Biol **2001**; 165:33–48.
146. Morel V, Martin E, François C, et al. A Simple and Reliable Strategy for BK Virus Subtyping and Subgrouping. J Clin Microbiol **2017**; 55:1177–1185.
147. Wunderink HF, de Brouwer CS, van der Meijden E, et al. Development and evaluation of a BK polyomavirus serotyping assay using Luminex technology. J Clin Virol **2019**; 110:22–28.
148. Domingo-Calap P, Schubert B, Joly M, et al. An unusually high substitution rate in transplant-associated BK polyomavirus in vivo is further concentrated in HLA-C-bound viral peptides. PLOS Pathogens **2018**; 14:e1007368.
149. Stoner GL, Alappan R, Jobes DV, Ryschkewitsch CF, Landry ML. BK virus regulatory region rearrangements in brain and cerebrospinal fluid from a leukemia patient with tubulointerstitial nephritis and meningoencephalitis. Am J Kidney Dis **2002**; 39:1102–1112.

150. Olsen G-H, Andresen PA, Hilmarsen HT, et al. Genetic variability in BK Virus regulatory regions in urine and kidney biopsies from renal-transplant patients. J Med Virol **2006**; 78:384–393.
151. Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, et al. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. The Journal of Experimental Medicine **2008**; 205:841–852.
152. Olsen G-H, Hirsch HH, Rinaldo CH. Functional analysis of polyomavirus BK non-coding control region quasispecies from kidney transplant recipients. J Med Virol **2009**; 81:1959–1967.
153. Liimatainen H, Weseslindtner L, Strassl R, Aberle SW, Bond G, Auvinen E. Next-generation sequencing shows marked rearrangements of BK polyomavirus that favor but are not required for polyomavirus-associated nephropathy. J Clin Virol **2020**; 122:104215.
154. Virtanen E, Seppälä H, Helanterä I, et al. BK polyomavirus microRNA expression and sequence variation in polyomavirus-associated nephropathy. J Clin Virol **2018**; 102:70–76.
155. Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewley JP. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. J Med Virol **1993**; 39:50–56.
156. Randhawa PS, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky PA, et al. DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. Transplantation **2002**; 73:1090–1094.
157. Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA, Stoner GL, Ryschkewitsch CF, Randhawa P. Molecular genotyping of BK and JC viruses in human polyomavirus-associated interstitial nephritis after renal transplantation. Am J Kidney Dis **2001**; 38:354–365.
158. Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, et al. Genomic mutations of viral protein 1 and BK virus nephropathy in kidney transplant recipients. J Med Virol **2009**; 81:1385–1393.
159. Luo C, Hirsch HH, Kant J, Randhawa P. VP-1 quasispecies in human infection with polyomavirus BK. J Med Virol **2012**; 84:152–161.
160. Chen Y, Sharp PM, Fowkes M, Kocher O, Joseph JT, Koralnik IJ. Analysis of 15 novel full-length BK virus sequences from three individuals: evidence of a high intra-strain genetic diversity. J Gen Virol **2004**; 85:2651–2663.
161. Sahoo MK, Tan SK, Chen SF, et al. Limited Variation in BK Virus T-Cell Epitopes Revealed by Next-Generation Sequencing. J Clin Microbiol **2015**; 53:3226–3233.
162. Roy S, Mieczkowski PA, Weida C, et al. BK polyomavirus nephropathy with systemic viral spread: Whole genome sequencing data from a fatal case of BKPyV infection. Transpl Infect Dis **2020**; :e13269.
163. Peretti A, Geoghegan EM, Pastrana DV, et al. Characterization of BK Polyomaviruses from Kidney Transplant Recipients Suggests a Role for APOBEC3 in Driving In-Host Virus Evolution. Cell Host & Microbe **2018**; 23:628-635.e7.
164. Björkström NK, Strunz B, Ljunggren H-G. Natural killer cells in antiviral immunity. Nat Rev Immunol **2022**; 22:112–123.
165. Trydzenskaya H, Juerchott K, Lachmann N, et al. The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients. Kidney Int **2013**; 84:359–365.
166. Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, et al. Donor Origin of BK Virus in Renal Transplantation and Role of HLA C7 in Susceptibility to Sustained BK Viremia. American Journal of Transplantation **2005**; 5:2213–2221.
167. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. Nat Rev Immunol **2015**; 15:471–485.
168. Womer KL, Peng R, Patton PR, et al. The effects of renal transplantation on peripheral blood dendritic cells. Clin Transplant **2005**; 19:659–667.

169. Womer KL, Huang Y, Herren H, et al. Dendritic cell deficiency associated with development of BK viremia and nephropathy in renal transplant recipients. Transplantation **2010**; 89:115–123.
170. Redondo N, Rodríguez-Goncer I, Parra P, et al. Genetic polymorphisms in TLR3, IL10 and CD209 influence the risk of BK polyomavirus infection after kidney transplantation. Sci Rep **2022**; 12:11338.
171. Bodaghi S, Comoli P, Bösch R, et al. Antibody responses to recombinant polyomavirus BK large T and VP1 proteins in young kidney transplant patients. J Clin Microbiol **2009**; 47:2577–2585.
172. Dakroub F, Touzé A, Akl H, Brochot E. Pre-Transplantation Assessment of BK Virus Serostatus: Significance, Current Methods, and Obstacles. Viruses **2019**; 11.
173. Hamilton RS, Gravell M, Major EO. Comparison of antibody titers determined by hemagglutination inhibition and enzyme immunoassay for JC virus and BK virus. J Clin Microbiol **2000**; 38:105–109.
174. Kardas P, Leboeuf C, Hirsch HH. Optimizing JC and BK polyomavirus IgG testing for seroepidemiology and patient counseling. J Clin Virol **2015**; 71:28–33.
175. Schmidt T, Adam C, Hirsch HH, et al. BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication. Am J Transplant **2014**; 14:1334–1345.
176. Pastrana DV, Brennan DC, Cuburu N, et al. Neutralization serotyping of BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients. PLoS Pathog **2012**; 8:e1002650.
177. Solis M, Velay A, Porcher R, et al. Neutralizing Antibody-Mediated Response and Risk of BK Virus-Associated Nephropathy. J Am Soc Nephrol **2018**; 29:326–334.
178. Randhawa PS, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Viscidi RP. Immunoglobulin G, A, and M responses to BK virus in renal transplantation. Clin Vaccine Immunol **2006**; 13:1057–1063.
179. Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA. BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. J Clin Virol **2008**; 43:184–189.
180. Hariharan S, Cohen EP, Vasudev B, et al. BK virus-specific antibodies and BKV DNA in renal transplant recipients with BKV nephritis. Am J Transplant **2005**; 5:2719–2724.
181. Chen Y, Trofe J, Gordon J, et al. Interplay of Cellular and Humoral Immune Responses against BK Virus in Kidney Transplant Recipients with Polyomavirus Nephropathy. Journal of Virology **2006**; 80:3495–3505.
182. Ginevri F, De Santis R, Comoli P, et al. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. Transplantation **2003**; 75:1266–1270.
183. Smith JM, McDonald RA, Finn LS, Healey PJ, Davis CL, Limaye AP. Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. Am J Transplant **2004**; 4:2109–2117.
184. Wunderink HF, van der Meijden E, van der Blij-de Brouwer CS, et al. Stability of BK polyomavirus IgG seroreactivity and its correlation with preceding viremia. J Clin Virol **2017**; 90:46–51.
185. Abend JR, Changala M, Sathe A, et al. Correlation of BK Virus Neutralizing Serostatus With the Incidence of BK Viremia in Kidney Transplant Recipients. Transplantation **2017**; 101:1495–1505.
186. Comoli P, Azzi A, Maccario R, et al. Polyomavirus BK-specific immunity after kidney transplantation. Transplantation **2004**; 78:1229–1232.
187. Mutlu E, Köksoy S, Mutlu D, et al. Quantitative analysis of BKV-specific CD4+ T cells before and after kidney transplantation. Transpl Immunol **2015**; 33:20–26.

188. Comoli P, Cioni M, Basso S, et al. Immunity to Polyomavirus BK Infection: Immune Monitoring to Regulate the Balance between Risk of BKV Nephropathy and Induction of Alloimmunity. Clin Dev Immunol **2013**; 2013:256923.
189. Binggeli S, Egli A, Schaub S, et al. Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. Am J Transplant **2007**; 7:1131–1139.
190. Schaenman JM, Korin Y, Sidwell T, et al. Increased Frequency of BK Virus-Specific Polyfunctional CD8+ T Cells Predict Successful Control of BK Viremia After Kidney Transplantation. Transplantation **2017**; 101:1479–1487.
191. Schachtner T, Müller K, Stein M, et al. BK Virus-Specific Immunity Kinetics: A Predictor of Recovery From Polyomavirus BK-Associated Nephropathy: BKV-Specific Immunity Kinetics. American Journal of Transplantation **2011**; 11:2443–2452.
192. Randhawa PS, Popescu I, Macedo C, et al. Detection of CD8+ T cells sensitized to BK virus large T antigen in healthy volunteers and kidney transplant recipients. Hum Immunol **2006**; 67:298–302.
193. Mueller K, Schachtner T, Sattler A, et al. BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. Transplantation **2011**; 91:100–107.
194. Ramaswami B, Popescu I, Macedo C, et al. The polyomavirus BK large T-antigen-derived peptide elicits an HLA-DR promiscuous and polyfunctional CD4+ T-cell response. Clin Vaccine Immunol **2011**; 18:815–824.
195. Weist BJD, Wehler P, El Ahmad L, et al. A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients. Kidney Int **2015**; 88:1293–1303.
196. van Aalderen MC, Remmerswaal EBM, Heutinck KM, et al. Clinically Relevant Reactivation of Polyomavirus BK (BKPyV) in HLA-A02-Positive Renal Transplant Recipients Is Associated with Impaired Effector-Memory Differentiation of BKPyV-Specific CD8+ T Cells. PLOS Pathogens **2016**; 12:e1005903.
197. Schachtner T, Stein M, Babel N, Reinke P. The Loss of BKV-specific Immunity From Pretransplantation to Posttransplantation Identifies Kidney Transplant Recipients at Increased Risk of BKV Replication. Am J Transplant **2015**; 15:2159–2169.
198. Leboeuf C, Wilk S, Achermann R, et al. BK Polyomavirus-Specific 9mer CD8 T Cell Responses Correlate With Clearance of BK Viremia in Kidney Transplant Recipients: First Report From the Swiss Transplant Cohort Study. American Journal of Transplantation **2017**; 17:2591–2600.
199. Babel N, Volk H-D, Reinke P. BK polyomavirus infection and nephropathy: the virus-immune system interplay. Nat Rev Nephrol **2011**; 7:399–406.
200. Hirsch HH, Randhawa P, the AST Infectious Diseases Community of Practice. BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation: BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation. American Journal of Transplantation **2013**; 13:179–188.
201. Nickeleit V, Singh HK, Randhawa P, et al. The Banff Working Group Classification of Definitive Polyomavirus Nephropathy: Morphologic Definitions and Clinical Correlations. J Am Soc Nephrol **2018**; 29:680–693.
202. Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa P. Phylogenetic analysis of polyomavirus BK sequences. J Virol **2006**; 80:8869–8879.
203. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol **1987**; 4:406–425.
204. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. Mol Biol Evol **1992**; 9:678–687.
205. Barzon L, Murer L, Pacenti M, et al. Investigation of intrarenal viral infections in kidney transplant recipients unveils an association between parvovirus B19 and chronic allograft injury. J Infect Dis **2009**; 199:372–380.

206. Randhawa PS, Vats A, Zygmunt D, et al. Quantitation of viral DNA in renal allograft tissue from patients with BK virus nephropathy. Transplantation **2002**; 74:485–488.
207. Brodin-Sartorius A. Detecting BK Virus in the Graft Identifies Positive BK Viremia Patients at High Risk of Developing BKVAN. 2013; Available at: https://atcmeetingabstracts.com/abstract/detecting-bk-virus-in-the-graft-identifies-positive-bk-viremia-patients-at-high-risk-of-developing-bkvan/.
208. Urbano PRP, Nali LH da S, Oliveira RDR, et al. Variable sources of Bk virus in renal allograft recipients. J Med Virol **2019**; 91:1136–1141.
209. Luo C, Hirsch HH, Kant J, Randhawa P. VP-1 quasispecies in human infection with polyomavirus BK. Journal of Medical Virology **2012**; 84:152–161.
210. McIlroy D, Hönemann M, Nguyen N-K, et al. Persistent BK Polyomavirus Viruria is Associated with Accumulation of VP1 Mutations and Neutralization Escape. Viruses **2020**; 12:E824.
211. Pastrana DV, Brennan DC, Çuburu N, et al. Neutralization Serotyping of BK Polyomavirus Infection in Kidney Transplant Recipients. PLoS Pathogens **2012**; 8:e1002650.
212. Pastrana DV, Ray U, Magaldi TG, Schowalter RM, Cuburu N, Buck CB. BK Polyomavirus Genotypes Represent Distinct Serotypes with Distinct Entry Tropism. Journal of Virology **2013**; 87:10105–10113.
213. Wunderink HF, De Brouwer CS, Gard L, et al. Source and Relevance of the BK Polyomavirus Genotype for Infection After Kidney Transplantation. Open Forum Infect Dis **2019**; 6:ofz078.
214. Solis M, Velay A, Porcher R, et al. Neutralizing Antibody–Mediated Response and Risk of BK Virus–Associated Nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology **2018**; 29:326–334.
215. Velay A, Solis M, Benotmane I, et al. Intravenous Immunoglobulin Administration Significantly Increases BKPyV Genotype-Specific Neutralizing Antibody Titers in Kidney Transplant Recipients. Antimicrob Agents Chemother **2019**; 63.
216. Kaur A, Wilhelm M, Wilk S, Hirsch HH. BK polyomavirus-specific antibody and T-cell responses in kidney transplantation: update. Curr Opin Infect Dis **2019**; 32:575–583.
217. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. Nat Methods **2014**; 11:783–784.
218. Li W, Xu H, Xiao T, et al. MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. Genome Biol **2014**; 15:554.
219. Yin Y, Garcia MR, Novak AJ, et al. Surf4 (Erv29p) binds amino-terminal tripeptide motifs of soluble cargo proteins with different affinities, enabling prioritization of their exit from the endoplasmic reticulum. PLoS Biol **2018**; 16:e2005140.
220. Mitrovic S, Ben-Tekaya H, Koegler E, Gruenberg J, Hauri H-P. The cargo receptors Surf4, endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC)-53, and p25 are required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi. Mol Biol Cell **2008**; 19:1976–1990.
221. Kong L, Aoyagi H, Yang Z, et al. Surfeit 4 Contributes to the Replication of Hepatitis C Virus Using Double-Membrane Vesicles. J Virol **2020**; 94.
222. Hafirassou ML, Meertens L, Umaña-Diaz C, et al. A Global Interactome Map of the Dengue Virus NS1 Identifies Virus Restriction and Dependency Host Factors. Cell Rep **2017**; 21:3900–3913.
223. Kadereit B, Kumar P, Wang W-J, et al. Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. Proc Natl Acad Sci USA **2008**; 105:94–99.
224. Gao M, Huang X, Song B-L, Yang H. The biogenesis of lipid droplets: Lipids take center stage. Prog Lipid Res **2019**; 75:100989.
225. Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early events during BK virus entry and disassembly. J Virol **2009**; 83:1350–1358.

226. Luo C, Bueno M, Kant J, Martinson J, Randhawa P. Genotyping schemes for polyomavirus BK, using gene-specific phylogenetic trees and single nucleotide polymorphism analysis. J Virol **2009**; 83:2285–2297.
227. Chong S, Antoni M, Macdonald A, Reeves M, Harber M, Magee CN. BK virus: Current understanding of pathogenicity and clinical disease in transplantation. Rev Med Virol **2019**; 29:e2044.
228. Hardinger KL, Koch MJ, Bohl DJ, Storch GA, Brennan DC. BK-virus and the impact of pre-emptive immunosuppression reduction: 5-year results. Am J Transplant **2010**; 10:407–415.
229. Cheungpasitporn W, Kremers WK, Lorenz E, et al. De novo donor-specific antibody following BK nephropathy: The incidence and association with antibody-mediated rejection. Clin Transplant **2018**; 32:e13194.
230. Schmitt C, Raggub L, Linnenweber-Held S, Adams O, Schwarz A, Heim A. Donor origin of BKV replication after kidney transplantation. Journal of Clinical Virology **2014**; 59:120–125.

Annexe 1 – Données supplémentaires

1. Matériels et Méthodes

1.1. Protocole PCR albumine

Afin de rapporter la charge virale d'ADN du BKPyV détectée dans les biopsies rénales à la quantité de tissu de chaque prélèvement, nous avons effectué une quantification par PCR temps réel d'un « gène de ménage » à savoir l'albumine dans tous les échantillons de PBR.

Les PCR ont été réalisées dans un volume de 25µL contenant 5 µL d'éluat, 1X de PCR Master Mix TaqMan Universal (low ROX), 7.5 pM de chaque primer (forward, 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3', et reverse : 5'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3'), et 5 pM de sonde TaqMan (5' FAM-CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC-3' TAMRA). La réaction d'amplification a été effectuée avec les conditions suivantes : dénaturation initiale pendant 10 min à 95°C, suivie de 45 cycles avec dénaturation à 95°C pendant 15 s, hybridation puis extension à 65°C pendant 1 min. La courbe d'étalonnage pour la quantification de l'albumine a été construite avec des dilutions successives d'un facteur de 10 (allant de 2 x 10^5 à 20 copies) d'ADN génomique humain (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) testées en duplicat. La réaction de PCR, l'acquisition et l'analyse des données ont été faites effectuée sur l'automate ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems) avec le logiciel et selon les recommandations fournies par le fabricant.

La quantité d'ADN a été exprimée en nombre de copies par 10^6 cellules, en considérant la présence de deux copies du gène codant pour l'albumine dans chaque cellule rénale (nombre de copies du BKPyV /[nombre de copies d'albumine/2]) x 10^6.

1.2. Séquences de référence des sous-types de BKPyV utilisés pour la construction des arbres phylogénétiques (Sanger et WGS)

Génotype	Sous-type	**Numéro d'accès GenBank** (nom de la souche)
BKPyV-I	**I-a**	NC_001538 (BK Dunlop) DQ305492 (UT) DQ989812 (PittVR4)
	I-b1	AB211371 (WW) AB211374 (KOM-5) AB301099 (J2B-2)
	I-b2	AB263918 (FNL-12) AB211370 (JL) AB301096 (LAB-29)
	I-c	AB211377 (RYU-2) AB211378 (THK-6) AB369095 (FUJ-4)
BKPyV-II		AB263920 (GBR-12) AB263916 (ETH-3) AB301101 (J2B-11)
BKPyV-III		AB211386 (KOM-3) AB365130 (FUK-22) JN192440 (SJH-LG-310)
BKPyV-IV	**IV-a1**	AB269859 (PHL-8) AB269869 (VNM-7) AB365171 (SHA-43)
	IV-a2	AB211389 (RYU-3) AB269826 (FUJ-13) AB365149 (OKN-19)
	IV-b1	AB211390 (THK-8) AB269836 (JPN-32) AB365142 (NEB-26)
	IV-b2	AB211387 (KOM-2) AB269834 (JPN-15) AB365138 (NEA-2)
	IV-c1	AB269827 (FUJ-18) AB269846 (MON-1) AB365167 (SHA-28)
	IV-c2	AB260033 (FIN-2) AB269833 (ITA-4) AB369093 (A66-H)

2. Figures / Tableaux supplémentaires

Tableau S1. Cinétique de réplication du BKPyV et génotype correspondant (Sanger VP1) dans les échantillons de PBR et de plasma concomitant de la greffe au diagnostic de BKVN.

Les cases blanches correspondent aux échantillons manquants. Les tirets (-) indiquent aux échantillons BKPyV-positifs pour lesquels le séquençage Sanger de VP1 a échoué.

Patient	Day 0 (KT)			Pre BKVN					BKVN diagnosis				
	Plasma		PBR	Délai post-greffe (mois)	Plasma		PBR		Délai post-greffe (mois)	Plasma		PBR	
	CV BKV (log UI/ml)	Sous-type BKV	CV BKV (log UI/10^6 cellules)	Sous-type BKV	CV BKV (log UI/ml)	Sous-type BKV	CV BKV (log UI/10^6 cellules)	Sous-type BKV		CV BKV (log UI/ml)	Sous-type BKV	CV BKV (log UI/10^6 cellules)	Sous-type BKV
1									3	5,5	II	4,72	II
2									6	4,78	II	6,76	II
3	0		4,33	Ia	3	0	5,2	Ia	11	5,19	Ib2	8,53	Ib2
4					3	3,41	IVc2	6,27	IVc2	9	6,27	IVc2	8,63	IVc2
5									42	4,6	Ia	9,35	Ia
6					3	0	6,15	Ib1	12	3,12	II	7,59	II
7									17	6,44	Ib2	10,48	Ib2
8	0		6,73	Ib1	4	3,53	Ib2	8,25	Ib2	14	6,01	Ib2	9,8	Ib2
9					3	0		4,38	Ib2	12	4,06	II	7,36	II
10	0		3,68	Ia	3	0		3,78	Ia	29	6,35	Ib2	4,05	Ib2
					12	0		2,17	-					
11	0		3,26	-	2	0		6,17	Ia	48	5,35	Ib1	9,59	Ib1
					12	0		4,44	Ia					
12	0		2,97	-	3	0		6,88	II	10	4,06	IVc2	9,48	IVc2
13	0		4,75	Ib1	1			4,8	IVc2	4	6,09	IVc2	5,67	IVc2
					2	5,15	IVc2	9	IVc2					
14										4	4,78	Ib2	8,88	Ib2
15	0		0		3	0		0		44	5,38	II	8,37	II
					22	0		0						
16	0		0							3	4,07	Ia	4,68	Ia
17					3	0		0		29	5,5	II	8,38	II
18	0		3,57	II						3	6,57	Ib1	5,62	Ib1

Patient	Day 0 (KT)				Pre BKVN					BKVN diagnosis				
	Plasma		PBR		Délai post-greffe *(mois)*	Plasma		PBR		Délai post-greffe *(mois)*	Plasma		PBR	
	CV BKV *(logUI/ml)*	Sous-type BKV	CV BKV *(logUI/10^6 cellules)*	Sous-type BKV		CV BKV *(logUI/ml)*	Sous-type BKV	CV BKV *(logUI/10^6 cellules*	Sous-type BKV		CV BKV *(logUI/ml)*	Sous-type BKV	CV BKV *(logUI/10^6 cellules*	Sous-type BKV
19	0		0		**3**	0		0		**36**	6,72	IVc2	8,9	IVc2
					13	0		0						
					15	0		0						
20					**3**	0		0		**14**	3,66	Ib1	4,08	Ic
21	0		0		**3**	0		0		**11**	4,26	Ib2	5,36	Ib2
22	0		0							**5**	6,22	Ic	9,25	Ic
23					**3**	2,79	II	3,42	II	**14**	4,88	II	7,89	II
24	0		0		**3**	0		0		**31**	5,41	II	8,91	II
					17			0						
25	0		0		**3**	3,32	III	0		**6**	6,18	III	8,41	III
26	0		0		**6**	3,4	IVc2	4,15	ND	**14**	5,74	IVc2	9,58	IVc2
27					**3**	0	-	2,59	IVc2	**18**	5,39	Ib2	6,43	Ib2
					14	3,92	Ib2	5,69	Ib2					
28	0		0		**3**	0		0		**10**	5,58	Ia	7,45	Ia
29	0		0		**3**	0		0		**14**	5,06	Ib1	8,98	Ib1
30	0		0		**3**	3,51	IVc2	0		**12**	3,96	IVc2	7,95	IVc2
					8	4,48	IVc2	5,19	IVc2					
31	0		3,64	IVc2	**1**	0		2,77	-	**12**	4,27	IVc2	5,87	IVc2
					3	0		2,81	Ia					
32	0		0		**3**	5,47	-	2,1	-	**13**	3,83	Ia	6,45	Ia
					9	4	Ia	4,72	Ia					

Tableau S2. Données de séquençage WG des échantillons de biopsies et de plasmas antérieurs à la BKVN.

La charge virale BKPyV, le nombre de reads bruts, le nombre et pourcentage de reads mappés sur le génome viral, le pourcentage de couverture et la profondeur de séquençage sont indiqués pour les échantillons de plasma à la date de la 1ère virémie, et de biopsies antérieures à la BKVN.
Les échantillons en rouge correspondent à ceux pour lesquels la couverture virale était inférieure à 90% (et qui n'ont pas été pris en compte dans l'analyse).

Numéro patient	Biopsie pré-BKVN								Plasma 1ère virémie							
	date	PCR BKV (log(U)/10^6 cell)	Nombre de reads bruts	Nombre de reads alignés	% reads mappés	% couverture	Profondeur moyenne		date	PCR BKV (log(U)/ml)	Nombre de reads bruts	Nombre de reads alignés	% reads mappés	% couverture	Profondeur moyenne	
1									M2	2,89	30224	2702	8,9%	94,4	60	
3	J0	4,33	71464	1430	2,0%	98,1	17									
	M3	5,2	130208	9491	7,3%	99,8	201									
4	M3	6,27	72102	20095	27,9%	99,8	443		M3	3,41	178208	15311	8,6%	99,8	337	
6	M3	6,15	164854	4927	3,0%	99,9	80									
8	J0	6,73	253624	157558	62,1%	99,9	3527									
	M4	8,25	15025484	14083625	93,7%	100	328842									
9	M3	4,38	126108	1773	1,4%	97,7	26									
	J0	3,68	32896	355	1,1%	60	4									
10	M3	3,78	91408	893	1,0%	89,2	10									
	M12	2,17	125380	984	0,8%	47,2	4									
	J0	3,26	173358	1219	0,7%	69,6	7									
11	M2	6,17	213528	41313	19,3%	99,9	870									
	M12	4,44	142274	4479	3,1%	99	89									
12	J0	2,97	114872	811	0,7%	44,1	4		M9	6,91	4034568	3186664	79,0%	100	69061	
	M3	6,88	14690	5806	39,5%	99,2	136									
	J0	4,71	108766	2916	2,7%	100	56									
13	M1	4,80	513142	16702	3,3%	99,6	312									
	M2	9,00	1949016	1717829	88,1%	100	38064		M2	5,15	112966	69058	61,1%	100	1508	
14									M3	4,31	690102	123440	17,9%	99,9	2395	
15									M40	5,18	91890	60899	66,3%	99,9	1274	
16	J0	3,57	179316	538	0,3%	90,6	10		M1	3,21	81924	711	0,9%	93,3	15	
17									M22	3,29	285812	1287	0,5%	98,2	26	
18									M1	3,30	37832	1714	4,5%	96,8	37	
19									M33	4,58	27164	8650	31,8%	100	185	
20									M10	4,30	22252	181	0,8%	75,1	4	
23	M3	3,42	145746	2281	1,6%	99,1	44		M3	2,79	86584	8140	9,4%	99,4	181	
25									M3	3,32	401292	18475	4,6%	99,3	401	
26									M6	3,40	369832	22422	6,1%	99,9	490	
27	M3	2,59	484680	705	0,1%	95,3	11		M13							
	M13	5,69	1344728	732284	54,5%	99,9	16434			3,92	535620	40804	7,6%	97,7	845	

								M4	2,94	36196	5330	14,7%	99,8	73
29	M8	5,19	278774	65277	23,4%	100	1465	M12	4,90	382692	79762	20,8%	100	1616
	J0	3,64	100556	648	0,6%	80,3	10	M3	3,51	813384	11046	1,4%	99,6	240
30	M3	2,81	792262	4994	0,6%	97,9	60							
32	M9	4,72	394848	92666	23,5%	100	2150	M1	3,45	140268	5595	4,0%	94,5	105
Médiane		4,58	155300	4703	2,8%	99	70		3,48	159238	13179	8,1%	100	289
Q1		3,59	110293	1043	0,8%	92	10		3,30	83089	5396	4,1%	98	81
Q3		6,04	365830	36009	23,5%	100	763		4,51	396642	55875	20,1%	100	1167

Figure S1. Arbres phylogénétiques avec les séquences consensus WGS (Patients #3 et #13).

Les arbres ont été construits selon la méthode Neighbor Joining (1000 réplicas de boostrap ; modèle Tamura-3). Les échantillons séquencés sont identifiés par la date (J0, bleu ; pré-BKVN, vert ; BKVN, rouge) et le type (PBR, rond; Plasma, carré) du prélèvement.
Dans les deux cas, on retrouvait un switch génotypique entre les prélèvements effectués avant le début de la virémie (J0 et M3 pour le patient#3 ; J0 et M1 pour le patient #13), et les échantillons suivants.

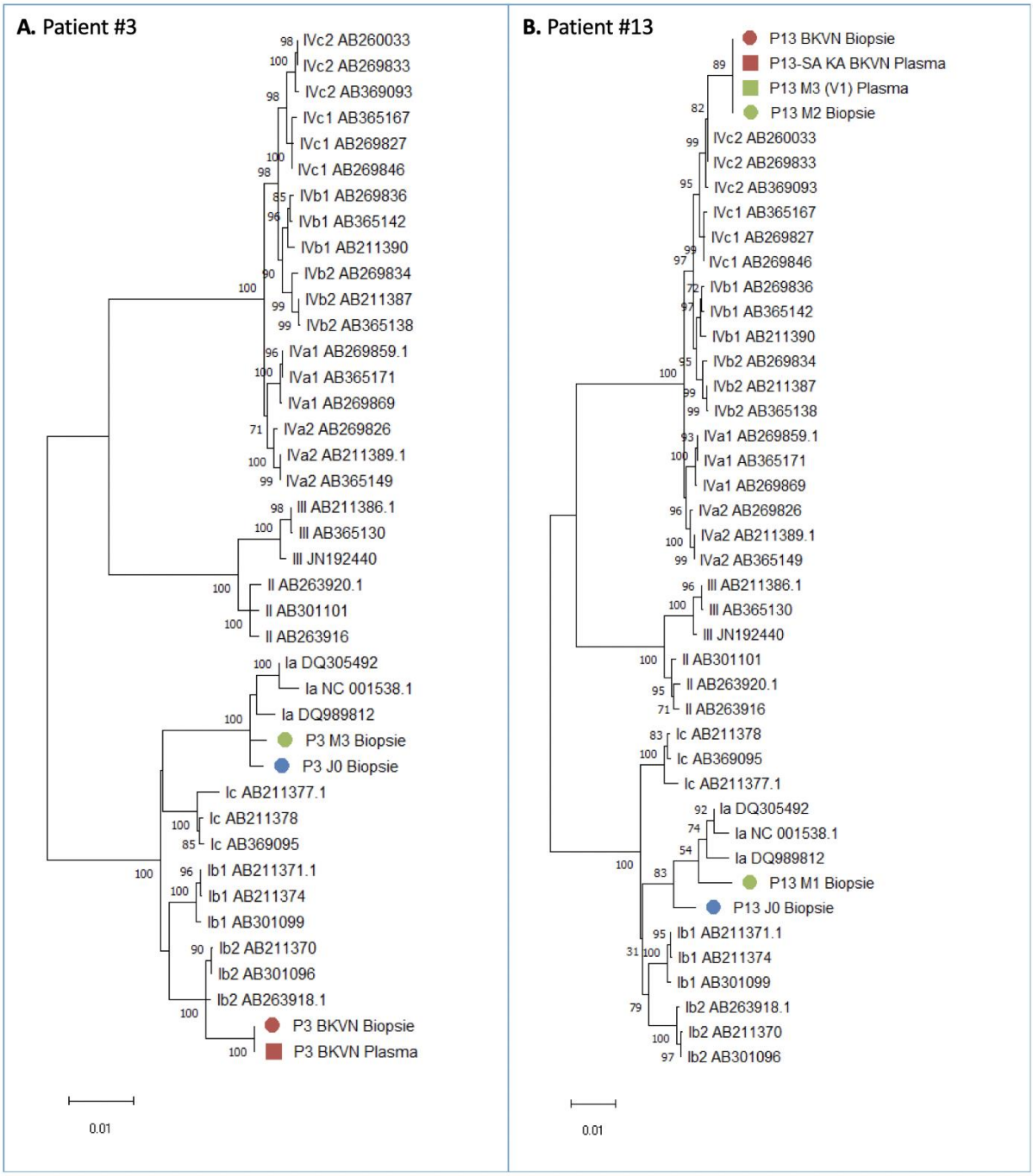


Figure S2. Corrélation charge virale BKPyV / profondeur d'alignement en WGS.

Les données de profondeur d'alignement en WGS en fonction de la charge virale BKPyV initiale du prélèvement sont représentées pour les 29 échantillons de biopsies (A) et de plasmas (B) analysées à la date de diagnostic de la BKVN.

Dans les deux cas, il existait une corrélation positive entre les deux paramètres (coefficient de corrélation de Pearson respectifs de 0,82 et 0,26).

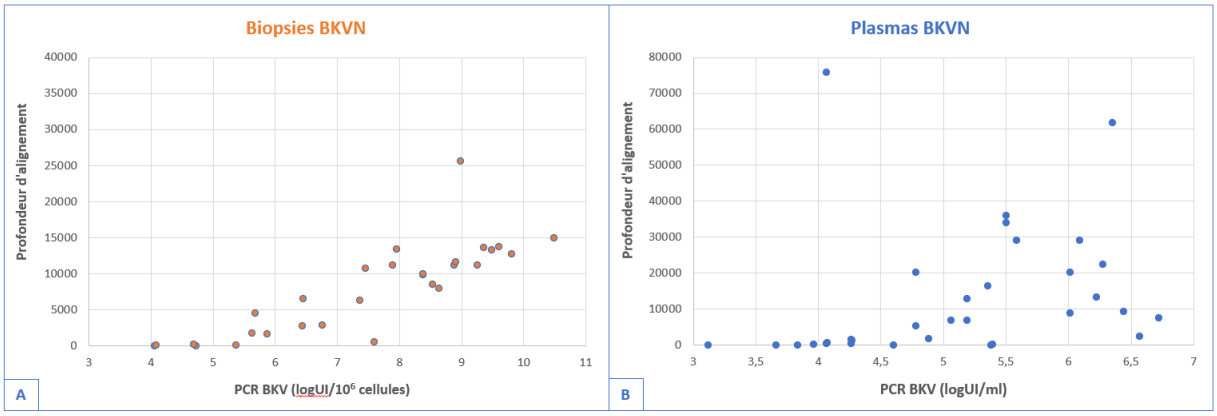


Tableau S3. Comparaison des séquences consensus WGS des échantillons de biopsie et de plasma à la BKVN.

Les séquences consensus des variants majoritaires obtenues en WGS pour les échantillons de plasmas et de biopsie concomitants à la date de la BKVN (N=23) ont été comparés. Le nombre de mutations synonymes et non synonymes ainsi que leur localisation le long du génome du BKPyV sont indiqués.

Numéro patient	Plasma BKVN		Biopsie BKVN		Comparaison Plasma / Biopsie		
	Couverture	Génotype	Couverture	Génotype	SNP	SNP NS	Localisation SNP NS
2	100	II (III)	99,7	II	4	0	
3	100	Ib2 (Ic)	100	Ib2 (Ia/Ic)	1	0	
4	100	IVc2	99,9	IVc2	1	1	VP1
7	100	Ib2 (Ia/Ic)	100	Ib2 (Ia/Ic)	3	1	VP1
8	100	Ib2 (Ia/Ic)	100	Ib2 (Ia/Ic)	0		
9	98,2	II	100	II	27	5	LT/ST (1), VP1 (3), VP2/VP3 (1)
10	100	Ib2 (Ia/Ic)	99,8	Ib2	55	10	VP1 (4), Agno (2), VP2/VP3 (2), LT (1), ST (1)
11	100	Ib1 (Ia/Ic)	100	Ib1 (Ia/Ic)	0		
12	100	IVc2	100	IVc2	1	1	VP1
13	100	IVc2	100	IVc2	0		
14	100	Ib2 (Ia)	100	Ib2(Ia/Ic)	0		
15	99,3	II	99,8	II	18	6	VP1 (1), VP2/VP3 (5)
16	99,7	Ia	99,8	Ia	0		
17	100	II	99,9	II	7	2	VP1 (1), LT (1)
19	100	IVc2	100	IVc2	1		
20	98,7	Ib1	98,6	Ib1	56	6	Agno (1), LT (2), VP1 (1), VP2/VP3 (2)
21	99,8	Ib2/Ia	99,7	Ib2	1	0	
22	100	Ic (Ia/IVc2)	100	Ic(Ia/Ib2)	0		
23	99,8	II	99,9	II	4	0	
27	99,7	Ib2	99,9	Ib2(Ia)	31	10	1 VP1, 3 VP2,4 VP2/VP3, 2 LT
28	100	Ia	99,9	Ia	1	1	agno
29	100	Ib1 (Ia/IVc2)	99,8	Ib1 (Ia/Ic)	3	1	agno
31	99,9	IVc2	99,9	IVc2	7	1	VP1

Annexe 2 – Publications

Publications associées à la thèse

1. **Gras J**, Nere ML, Peraldi MN, Bonnet-Madin L, Salmona M, Taupin JL, Desgrandchamps F, Verine J, Brochot E, Amara A, Molina JM, Delaugerre C. BK virus genotypes and humoral response in kidney transplant recipients with BKV associated nephropathy. Under revision

Publications sur la thématique des infections à BK virus

1. Saade A, **Gras J**, Darmon M, Michonneau D, Dhédin N, Feghoul L, Le Goff J, Xhaard A, Peffault De Latour R, Socie G, Molina JM. *Incidence, risk factors and outcome of BK virus hemorrhagic cystitis following allogenic hematopoietic cell transplantation: a retrospective cohort study*. **Bone Marrow Tranpl. 2022**. Online ahead of print.

Article 1 associé à la thèse (en cours de révision)

Title

BK virus genotypes and humoral response in kidney transplant recipients with BKV associated nephropathy

Authors' list

Julien Gras [1,2,3], Marie Laure Nere [4], Marie Noëlle Peraldi [3,5,] Lucie Bonnet-Madin [2], Maud Salmona [3,4], Jean Luc Taupin [3,6], François Desgrandchamps [3,7], Jérôme Verine [8], Etienne Brochot [9], Ali Amara [2,3], Jean Michel Molina [1,2,3], Constance Delaugerre [2,3,4].

Affiliations

1 - Infectious Disease Department, APHP- Saint-Louis Hospital, Paris, France

2 - INSERM U944, « Biology of emerging viruses » team, Institut de Recherche Saint Louis, APHP- Saint-Louis Hospital, Paris, France

3 - Université Paris Cité, Paris, France

4 - Virology Department, APHP-Saint Louis Hospital, Paris, France

5 - Nephrology and Kidney Transplant Department, APHP-Saint Louis Hospital, Paris, France

6 - Immunology Department, APHP-Saint Louis Hospital, Paris, France

7 - Urology Department, APHP-Saint Louis Hospital, Paris, France

8 - Pathology Department, APHP-Saint Louis Hospital, Paris, France

9 - Virology Department, CHU Amiens, Amiens, France

Corresponding author

Dr Julien GRAS

Infectious Diseases Department, APHP-Saint Louis Hospital

1 avenue Claude Vellefaux, Paris, France

Tel: +33.1.42.49.49.91; Fax: +33.1.42.49.90.67

E-mail address: julien.gras@aphp.fr

ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7247-3358

ABSTRACT

Among kidney transplant recipients (KTR) with BK virus associated nephropathy (BKVN), BKV genotypes' evolution and anti-BKV humoral response are not well established.

We retrospectively analyzed 32 cases of biopsy-proven BKVN. Stored plasma and kidney biopsies (KB) were tested for BKV viral load (VL) and VP1 sequencing performed on positive samples. BKV-VP1 genotype-specific neutralizing antibodies (NAbs) titers were determined at KT and BKVN.

At the time of BKVN diagnosis, BK VL was 8.2 log_{10}IU/10^6 cells and 5.4 log_{10}IU/ml in KB and plasma respectively. A similar BKV-subtype was isolated in both compartments in 31/32 cases. The same BKVN subtype was also found in previous BKV-positive plasma and concomitant KB. Nine patients had BKV-positive KB before the onset of BK viremia (4.4 log_{10}IU/10^6 cells) at the time of KT (N=6) and/or at month 3 (N=7). In these patients, VP1 sequencing of BKV-positive KB identified a different subtype compared to BKVN in 8/9. BKV-VP1 NAbs titers increased significantly from KT to BKVN (p=0.0031) at similar titers between genotypes.

Among KTR with BKVN, early sequencing of BKV-positive plasma identifies the genotype further responsible for BKVN. In 9 aviremic patients, the BKV genotype in KB was different compared to BKVN, suggesting a switch of viral variant.

1. INTRODUCTION

BK virus (BKV) is a small non-enveloped double-strand DNA virus of the *Polyomaviridae* family [8]. BKV is a ubiquitous pathogen whose natural acquisition occurs early during childhood, mainly through the respiratory tract [4]. Following primary infection, BKV establishes persistent infection predominantly in the renourinary tract, where it is distributed from the kidney to the bladder [44]. BKV can be divided in four main genotypes (I to IV) and several subtypes according to the sequence of the major capsid protein VP1 [226]. VP1 is the only protein expressed at the surface of the virus, and contains the main epitopes targeted by anti-BKV T-cells and neutralizing antibodies (NAbs) [227]. Seroprevalence in the adult population is high (above 80%), BKV-I subtype being largely predominant worldwide followed by genotype IV [144]. BKV-I, II and IV have been shown to act as different serotypes [139], suggesting that KTR who are infected with one genotype may be vulnerable to others especially after kidney transplantation (KT) under immunosuppressive treatments [216].

Following KT, due to impaired cellular and humoral immunity, persistent BKV replication in urine can be followed by BK viremia which is detected in 10 to 20% of kidney transplant recipients (KTR) [124]. In the absence of any therapeutic intervention, 10 to 50% of the viremic subjects progress to BKV associated tubulo-interstitial nephropathy (BKVN) in a median delay of 2 to 6 weeks, which results in graft loss in 30 to 65% of the cases after one year [75]. There is currently no specific antiviral drug available, and the mainstay of therapy for significant BKV replication and BKVN is reducing immunosuppressive drugs [128], despite the risk of subsequent T-cell mediated and/or antibody mediated rejection [228,229].

Virological and immunological determinants of the progression from self-limited viruria or viremia to BKVN in KTR remains poorly understood. In particular, the origin of the viral strain responsible for the BKVN is not well established. Due to the persistence of BKV in the renourinary tract and the high rate of BKVN among KTR, the kidney donor is thought to be the main source of viral transmission in recipients with BKV infection [230]. However, previous studies have shown that up to 60% of the KTR with BK viruria shed BKV strain(s) distinct from the donor [208]. Identifying the BKV strain of the donor and recipient prior to KT could allow us to better understand the pathogenesis of post-transplant BKV infection, and help to develop genotype-specific monitoring and therapeutical strategies. Additionally, considerable debate exists regarding the importance of BKV humoral immunity in the modulation of the clinical course of BKV infection. Although pre-existing high BKV-specific antibody titers might

have a protective role [177], a strong antibody response is not always associated with viral clearance or BKVN occurrence [199].

To further address these questions, we conducted a retrospective study among KTR diagnosed with biopsy-proven BKVN to: 1) analyze the kinetics of BKV replication in plasma and kidney; 2) study the *in vivo* BKV genetic diversity in both compartments following KT; 3) quantify the anti-BKV-VP1 humoral response associated with BKV replication using neutralizing antibody (NAb) testing.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study Design and population

We conducted a retrospective study in the kidney transplant center of the APHP (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris) - Saint Louis Hospital (Paris, France). All KTR provided written consent for the use of their samples for research purpose at the time of registration on the transplant waiting list. The study protocol was approved by the APHP local ethics committee and conducted in accordance with Declaration of Helsinki guidelines.

KTR received induction therapy with anti-thymocyte globulins (ATG), except for patients with past long-term immunosuppression who received basiliximab (in combination with a 500mg methylpredinosolone pulse). Maintenance therapy consisted either in a dual therapy associating a calcineurin inhibitor (CNI: tacrolimus or ciclosporin A) and mycophenolic acid (MMF), or a triple therapy with the addition of corticosteroid for the other patients. Since 2005, all KTR in our center are screened for BK viremia monthly for the first 6 months post-transplant, then every 3 months until month 24, and every 6 months thereafter. For each KT with a deceased donor, a biopsy of the donor kidney is done at bench surgery before graft implantation as a routine protocol to determine baseline graft histology. Protocol kidney biopsies (KB) are also performed on months 3 and 12 post-transplant, and in the additional following cases: *de novo* acute kidney injury or proteinuria, suspicion of acute rejection or BKVN.

All KTR with a biopsy proven diagnosis BKVN according to the ATS-IDCOP and Banff Working Group criteria [200,201] from January 2016 to June 2020 were included (cases of BKVN). Control KTR who did not develop post-transplant BKVN, were randomly selected during the same period for comparison of BKV viral load in baseline KB samples. All patients were followed-up until December 2021.

2.2. Data and sample collection

Clinical data were retrospectively collected from each patient's medical record using an electronic standard case report form. Recorded data included demographic features, KT specifics, and characteristics of BKVN for all cases and controls.

For patients diagnosed with BKVN, available stored plasma and frozen KB samples between KT and BKVN were retrieved from the Virology and Pathology department collections for the detection of BKV DNA and VP1-genotyping. For the control group, only the KB performed at the time of KT were collected. For every frozen KB, 10-µm-thick sections were obtained using a cryostat. One section was preserved to be re-examined by a senior pathologist (light microscopy analysis and IHC staining for SV40 LTag).

2.3. BKV DNA detection

Total DNA extraction was performed from 500 µL of plasma or KB sample using the semiautomatic NucliSENS™ easyMAG system (Biomérieux SA, Marcy l'Etoile, France), and eluted into a final volume of 100 µL. Quantitative real-time PCR for the detection of BKV DNA was performed on 15 µL of eluted DNA using *artus*® BK Virus RG PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instruction. The lower limit of detection of the assay was 195 copies/ml. To correct for the variable amount of DNA in biopsy specimens, each KB sample was subjected to simultaneous real-time PCR for albumin using an "in-house" protocol (see Supplementary methods). The ratio of BKV to albumin content in each biopsy sample was used as a measure of the number of viral copies per 10^6 cells in the tissue.

2.4. BKV VP1 Sanger sequencing

VP1 Sanger sequencing was performed on plasma and KB BKV-positive samples in an automatic sequencer Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems, Foster City, USA) (detailed protocol available in Supplementary methods). For each sample, a VP1 consensus sequence was built using Geneious Prime 2019.0.4 software, and aligned with twelve VP1 reference sequences retrieved from GenBank database (one for each BKV subtype). Maximum likelihood phylogenetic trees were constructed on Mega 7.0. software using the Neighbor-Joining method with 1000 bootstrap replicates [203], and evolutionary distances computed using the Tamura 3-parameter model [204].

2.5. BKV VP1 antibody testing

Serum samples at the time of KT (day 0) and BKVN diagnosis were collected from the Immunology department collection, and tested for the presence of both BKV-VP1 genotype-specific neutralizing antibodies (Nabs) and IgG. First, neutralization assays were conducted using BKV virus-like particles (VLPs) that expressed the VP1 major capsid proteins of BKV genotypes I, II, III or IVc2, according to a methodology previously described [163,211] (detailed protocol in Supplementary methods). For each serum, the neutralization titer was defined as the sample dilution that resulted in a 50% inhibition of VLP infectivity compared to the control condition without serum, and was expressed as $\log_{10}$ IC50. A neutralization titer of 2.0 $\log_{10}$ IC50 was set as the threshold for quantification of antibody-mediated neutralization. Second, day 0 serum samples were also tested for the presence of BKV-VP1 IgG against subtypes Ia, Ib2, II and IV using a VLP-based ELISA assay [114] (detailed protocol in Supplementary methods).

2.6. Statistical analysis

For the descriptive analysis, continuous variables are presented as medians and interquartile ranges (IQR) and categorical variables are presented as numbers and percentages. Comparison was done using two-sided Student's t-test for continuous variables, and Chi-2 tests for categorical ones (or Fischer's test if conditions were not present). All statistical tests were two-sided; p-values < 0.05 were considered to be significant. Statistical analysis were performed using PRISM software.

3. RESULTS

3.1. Characteristics of the study population

From January 2016 to June 2020, 578 KT were performed in APHP-Saint Louis hospital. During this period, 32 cases of biopsy-proven BKVN were identified among KTR (cases), leading to a frequency of 5.5%. The control population consisted in 98 KTR, including 20 (20.4%) with post-transplant BK viremia but none with BKVN. The median duration of follow-up for cases and controls was respectively 46 [36-68] and 34 [28-44] months (p<0.001).

Table 1 shows the main characteristics of the study population. Eighteen (56%) of BKVN cases were male and median age at the time of transplantation was 55 (IQR: 46-63) years. Twenty-nine (91%) received a first KT, including 3 (9%) with a combined transplantation. Compared to BKVN cases, control patients received more frequently a kidney from a deceased donor (100% versus 91%, p<0.001), had a lower c-PRA score (20 [0-54]) vs. 50 [9-88]), but a higher

proportion of HLA mismatch equal or superior to 3 (97% vs. 77%, *p*=0.001). Induction therapy consisted in anti-thymocyte globulin administration in the majority of the patients with a higher proportion in controls (99% compared to 84% of cases, *p*=0.003)

Among cases, BKVN was diagnosed a median time of 12 (8.2-17.5) months after KT, and 2.4 (1.3-6.4) months after the onset of BK viremia. Median serum creatinine level at diagnosis was 197 (135-239) µM, and diagnostic kidney biopsies showed BKVN stage A in 5 (18%) patients, B in 21 (78%) and C in 1 (4%) according to the ATS-IDCOP and Banff Working Group histological staging criteria.

3.2. Kinetics of BKV DNA detection from KT to BKVN

Table 2 describes the kinetics of BKV replication in KB compared to plasma from KT to BKVN. At day 0 (D0=KT), 40% (8/20) of baseline KB (= donor kidney) tested positive for the detection of BKV DNA (median viral load [VL]: 3.7 $log_{10}IU/10^6$ cells, 3.5-4.4). Concomitant plasma was negative in all cases. As a comparison, only 2/98 (2%) of baseline KB in the control population were positive for BKV detection (respectively 4.22 and 3.27 $log_{10}IU/10^6$ cells), which was statistically significant (*p*<0.0001).

Thirty-five KB (in 24 KTR) were collected between D0 and BKVN diagnosis (pre-BKVN biopsies), in a median delay of 3 [3-7] months post-transplant. BKV DNA was detected in 15/24 (62%) of the patients with pre-BKVN biopsies (5.0 $log_{10}IU/10^6$ cells, 4.2-6.2). Among them, concomitant plasma was negative for BKV detection in 8/15 (53%), including 5 who already had a BKV+ baseline KB (Table 3: patients #3, #10, #11, #12 and #31). All BKV+ KB samples with negative concomitant plasma were re-examined by a senior pathologist, and show no evidence of viral-induced lesions (normal light microscopy and negative IHC staining for SV40 LTag).

At the time of BKVN diagnosis, BKV DNA was detected at high VL both in KB (8.2 $log_{10}IU/10^6$ cells, IQR: 6.3-8.9) and concomitant plasma (5.4 $log_{10}IU/ml$, 4.3-6.0). BKV median VL in KB increased significantly from D0 to pre-BKVN (p=0.038), and from pre-BKVN to BKVN diagnosis (p<0.001).

3.3. *In vivo* BKV genetic diversity in KB and plasma from KT to BKVN diagnosis.

The distribution of BKV genotypes identified at BKVN diagnosis in KB is shown in Table 1. The most frequent genotypes detected were BKV-I (16/32, 50%), BKV-II (8/32, 25%) and BKV-IVc2 (7/32, 23%). VP1 sequencing identified the same BKV subtype in KB and plasma in all patients but one, for whom BKV-Ic was isolated in KB compared to BKV-Ib1 in concomitant plasma (Table 2).

At D0, VP1 sequencing was obtained for 6 of the 8 patients with a BKV-positive baseline KB. Among them, five had a different BKV-subtype in baseline KB compared to the one isolated in BKVN biopsy. More specifically, a different genotype was identified at D0 compared to BKVN in 2 cases (Patient #13: BKV-Ib1 vs. BKV-IVc2; Patient #18: BKV-II vs. Ib1) and a different BKV-I subtype in 3 (Patients #3, #8, and #9) (Table 3).

Following KT, BKV-positive plasma samples prior to BKVN diagnosis were collected for 19 patients. VP1 sequencing identified the same BKVN subtype in all previous BKV-positive plasma, and in concomitant BKV+ KB (Patients #4, #8, #13, #23, #26, #30 and #32) (Table 3).

On the contrary, in the 7 patients with BKV+ pre-BKVN KB with a negative concomitant plasma, a different BKV-subtype was isolated in the kidney compared to the one at BKVN diagnosis. Among them, 4/7 patients already had a BKV+ baseline KB, including two with the same BKV subtype (Patients #3 and #10) (Table 3). Sequential analysis of BKV+ samples showed a genotype switch in the kidney as illustrated for two patients in Figure 1. For Patient #3, VP1 sequencing identified BKV-Ia in D0 and M3 kidney biopsies when concomitant plasma was negative, compared to BKV-Ib2 in plasma and KB samples collected at BKVN diagnosis (Figure 1A). For Patient #8, BKV-Ib1 was isolated in D0-KB (negative plasma). At the onset of BK viremia (month 4) and at BKVN diagnosis (month 14), BKV-Ib2 was identified both in plasma and KB (Figure 1B).

3.4. BKV-VP1 antibody response from KT to BKVN

Among the 32 patients with BKVN, 30 had a serum sample available at baseline for anti-BKV antibody testing. Using a genotype specific ELISA-VLP assay, we found that at the time of KT, all patients harbored anti-BKV VP1 IgG against at least one subtype (100% seroprevalence), and most frequently against 3 (16/30, 53%) or 4 (12/30, 40%) different subtypes (Figure 1A). In particular, 80% of BKVN cases had positive BKV-IgG against the BKVN subtype at day 0 (Supplementary Table 1). D0 serum samples were simultaneously tested for the presence of BKV-VP1 NAbs against all four main genotypes (I to IV) using VLP-based neutralization testing. Twenty-three (77%) recipients harbored BKV-VP1 Nabs against at least one subtype (Figure 1A). Half of the patients had detectable NAbs against the BKVN genotype, most of them at low titers (median $\log_{10}IC_{50}$ 2.0, IQR: 2.1-3.1) (Supplementary Table 1). Median BKV-VP1 NAb titers were not statistically different between the different BKV-genotypes (Figure 2B).

At the time of BKVN diagnosis, BKV NAb titers increased significantly compared to Day 0 (4.14, IQR: 3.76-4.60; *P*=0.003) but were similar across all subtypes (Figure 2B and Table 4). BKV VP1 NAb titer against the genotype isolated in BKVN KB was not statistically different compared to

those directed against the other subtypes both at D0 (2.81 [IQR: 2.65-3.21] versus 2.73 [2.49-3.07], non-significant) and BKVN (3.85 [3.63-4.88] versus 4.47 [3.76-4.88], non-significant) (Figure 2C).

4. DISCUSSION

In this study, we describe the kinetics of BKV replication and genetic evolution in plasma and kidney of KTR with biopsy-proven BKVN, as well as concomitant anti-VP1 neutralizing antibody response. These results provide new insights on the pathogenesis of BKVN following kidney transplantation.

First, we show that at the time of BKVN diagnosis, high BKV VL were detected both in KB and concomitant plasma. VP1 sequencing identified the same BKV genotype in both compartments in all cases (with only one patient having a different BKV-I subtype in KB and plasma). BKV-I subtype was largely predominant (50% of the cases) followed by genotype IVc2 (25%), in accordance with data from the literature [143]. Interestingly, we found a high prevalence of BKV-II subtype (25% of BKVN diagnostic samples), which had already been found in another recent study in Spain [140]. This may be due to the fact that almost a third of our study population originated from Africa, a region where the prevalence of BKV-II is higher compared to Europe, Northern America or Asia [144]. Moreover, in patients one or more BKV-positive plasma samples between KT and BKVN, VP1 sequencing identified the same BKV-subtype in all samples, from the onset of BK viremia to BKVN. These results suggest that early VP1 sequencing of the BKV circulating strain in viremic KTR identifies the subtype responsible for further viral nephropathy.

Second, we found that 40% (8/20) of the baseline KB (corresponding to the kidney donor), were BKV-positive among BKVN cases. This proportion was significantly higher compared to control KTR who did not develop post-transplant BKVN (2%, $p<0.0001$). BKV DNA detection in baseline KB is not surprising as the reno-urinary tract is the main site of BKV latency following primary infection [8]. In another study, the virological analysis of frozen tissue sections from KB of 69 KTR revealed that BKV DNA was detected in 5/57 (8.8%) at baseline, although none of them further developed BKVN [205]. The higher rate of BKV-positive biopsies at D0 observed in our study population (40%) could be due to sampling bias, with higher proportion of medullary samples among BKVN cases, where BKV latency is known to be predominant.

Alternatively, the difference of KT characteristics between cases and controls (regarding the c-PRA score, HLA mismatch or induction therapy) might explain this discrepancy.

Third, pre-BKVN KB performed between KT and BKVN tested positive for BKV detection in 15/24 (63%) patients, including 8 before the onset of viremia. In a previous study including 21 KTR with BKVN, Randhawa et al. detected BKV DNA in 19/50 (38%) of the KB samples performed between KT and BKVN diagnosis, but no data was available regarding BKV detection in concomitant plasma [206]. In our study, all eight BKV-positive KB samples in aviremic KTR were normal on microscopic examination and had negative SV40 IHC staining, suggesting that BKV was present in a latent state. Moreover, VP1-sequencing of these biopsies systematically identified a different subtype compared to the one in BKVN KB. On the contrary, in viremic patients, the same BKVN-subtype was isolated in both compartments.

Taken together, our results show that among KTR with a BKV+ KB prior to the onset of viremia (at day 0 and/or month 3), the BKV subtype identified in KB is not always the same compared to BKVN. In particular, in 5 patients, the BKV subtype isolated at day 0 in the kidney allograft (corresponding to the donor strain), was not the one responsible for BKVN. In KTR, the origin of the viral strain responsible for BKV infection remains a matter of debate. Based on epidemiological data and due to the persistence of BKV in the renourinary tract, the kidney donor is thought to be the main source of viral transmission in recipients with BKV infection following KT [116]. However, although a new viral strain may be transmitted through the kidney allograft during transplantation, the latent recipient strain remains largely predominant in the bladder, the native kidneys and ureters where BKV is distributed following primary infection [44]. Recently, virological analysis of BKV-positive urine samples from pairs of living donors and kidney recipients have shown that up to 60% of the KTR with BK viruria shed BKV strain(s) distinct from the donor [208]. We hypothesize that following KT, due to impaired cellular and humoral immunity, the BKV recipient strain whose reservoir remains largely predominant in the native ureters and bladder may reactivate, lead to BK viremia, and further colonize the allograft. Our hypothesis needs to be confirmed by the analysis of pre-transplant recipient (urine, native kidney biopsy) and donor (urine) samples that were not available in our collections. Systematic screening of both donor and recipients for BKV infection (using plasma / urines / KB samples) could help us to unravel whether BKVN results from the reactivation of the latent recipient subtype, rather from transmission to the donor although both mechanisms may not be mutually exclusive.

Previous studies have showed that in KTR with active BKV replication, the increase of BKV antibody levels correlates with the intensity of infection. BKV-VP1 IgG titers is higher in patients with BK viremia compared to those with self-limited viruria [178,179]. However, little data are available regarding the kinetics of BKV Nab titers in KTR with biopsy-proven BKVN. In order to explain the genetic variability observed in the kidney using Sanger sequencing, we hypothesized that the reactivation of BKV subtype responsible for BKVN may be due to an impaired genotype-specific neutralizing antibody response, as previously suggested [163]. To address this question, we developed NAb testing using VLPs expressing VP1 specific of the different genotypes (Ia, Ib2, II, and IVc2) that are known to act as distinct serotypes [139]. At the time of KT, BKV seroprevalence in our population was 100% based on ELISA testing. However, only 77% of the patients harbored detectable BKV Nabs against at least one genotype, all of them at low titers. These results are concordant with previous studies who identified patients with NAb titers below 4 $\log_{10}$ IC50 at-risk for BKV infection following transplantation [177]. Following KT, we observed a strong increase of NAb titers against all BKV-subtypes in our cohort, without any difference across genotypes. This is probably due to cross-reactivity of BKV NAbs following the immune activation triggered by persistent viral replication, as the different BKV genotypes share a large number of epitopes targeted by neutralizing antibodies, especially in the BC loop [216]. Our results suggest that in patients with BKVN, pre-transplant screening of BKV-VP1 genotype specific NAb cannot help to predict the risk of BKV infection with one genotype or another. The rise of BKV NAb titers is not the only effector of viral clearance in all patients, and immunosuppression tapering which allows restoration of BKV cellular immune response is also a key factor in the control of BKV replication [190,191].

Our study has some limits. First, the small number of patients identified limits the power. However, biopsy-proven BKVN is a rare complication following KT and no study has included as much cases of BKVN for virological and immunological analysis. Second, due to its retrospective design, we were not able to provide a detailed longitudinal analysis for all cases due to missing samples. In particular, no urine samples were available for virological analysis as urine screening is not routinely performed in our center in accordance with recent international guidelines [124]. If BKVN results at least in part from the reactivation of the recipient strain, we can hypothesize that KTR with detectable BKV in urine prior to transplant, the BKV strain would have been the same as the one responsible for the BKVN. This needs to be further confirmed in a prospective study. Third, BK genotyping data are based on VP1

Sanger sequencing which is able to detect only the major BKV subtypes in a defined sample. The sensitivity of this technique does not allow us to discriminate some subtypes, nor to detect the presence of minority variants. As a consequence, we cannot exclude that the subtype identified at day 0 (donor strain) is still present in the kidney at BKVN diagnosis. Ongoing whole genome sequencing analysis will further help to answer the question. Finally, regarding the BKV Nab response, we cannot exclude a humoral escape to specific variants as suggested recently by Peretti et al [163]. Neutralizing testing using VLPs with BKV strains isolated in patients with persistent BK viremia may help to answer this question.

In conclusion, we provide a detailed virological and immunological analysis of BKVN pathogenesis in a cohort of 32 KTR. Early VP1 sequencing of BKV+ plasma samples at the onset of viremia identifies the strain further responsible for the viral nephropathy. Sequential analysis of BKV+ KB from day 0 to BKVN shows that in a subset of patients, the genotype identified early post-transplant in the kidney is different compared to BKVN, suggesting that both donor and/or recipient strains could contribute to the pathogenesis of BKVN. BKV-VP1 NAb response in KTR with BKVN is strong and cross-reactive. BKV NAb titer monitoring needs to be further evaluated as it cannot help to predict the genotype responsible for BK viremia or nephropathy.

AKNOWLEDGMENTS

We thank Christopher B. Buck for providing the plasmids for VP1 subtypes, VP2, and VP3.

This work was presented in oral communication on July 10, 2021 at the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (online), on August 30, 2021 at the Journées Nationales d'Infectioliogie (Montpellier, France), and on October 6, 2021 at the Société Francophone de Néphrologie, Dialyse et Transplantation de Trasnplantation (Toulouse, France).

Variable	BKVN cases (N=32)	Control KTR (N=98)	*p*-value
	n (%); median [IQR]	*n* (%); median [IQR]	
Demographic features			
Age at the time of KT *(years)*	55 [46-63]	55 [43-64]	0.88
Male sex	18 (56)	60 (61)	0.62
Country of origin			0.43
Western Europe	17 (44)	33 (39)	
Caribbean	2 (6)	4 (5)	
Northern Africa / Middle East region	6 (19)	14 (16)	
Sub-Saharan Africa	4 (12)	24 (28)	
Asia	3 (9)	10 (12)	
Primary kidney disease			0.80
Vascular and/or diabetes	9 (28)	33 (34)	
Chronic glomerulonephritis	6 (19)	22 (23)	
Interstitial nephropathy	5 (16)	11 (11)	
Other	12 (37) *	31 (32)	
KT specifics			
Duration of pre-transplantation dialysis *(months)*	37 [11-60]	48 [24-68]	0.09
First transplantation	29 (91)	88 (88)	0.74
Type of transplantation			0.71
Isolated KT	29 (91)	90 (93)	
Combined transplantation	3 (9) **	7 (7)	
Deceased donor	26 (81)	97 (100)	**< 0.001**
Cold ischemia time *(hours)*	13 [6-15]	14 [11-16.5]	**0.04**
c-PRA score	50 [9-88]	20 [0-54]	**0.003**
HLA mismatch			**0.001**
< 3	7 (23)	3 (3)	
≥ 3	23 (77)	95 (97)	
Induction therapy			**0.003**
ATG	27 (84)	97 (99)	
Anti-CD25	4 (13)	1 (1)	
Other †	3 (9)	0	
Characteristics of BKVN			
Age at the time of diagnosis *(years)*	56 [47-64]		
Median time between KT and diagnosis *(months)*	12.0 [8.2-17.5]		
Median time between first BK viremia and diagnosis *(months)*	2.4 [1.3-6.4]		
Immunosuppressive regimen at BKVN diagnosis			
Triple therapy	29 (91)		
Corticosteroid	29 (91)		
Median dose *(mg/day)*	10 [8-10]		
Mycophenolic acid	16 (50)		
Azathioprine	13 (41)		
Tacrolimus	19 (59)		
Ciclosporin	12 (38)		
m-TOR inhibitors	2 (6)		
Serum creatinine level at diagnosis *(µmol/L)*	197 [135-239]		
eGFR at diagnosis *(ml/min/1.73 m²)*	31 [22-48]		
DSA *(NA=2)*	6 (20)		

Histological classification of BKVN *(NA=5)*	
Stage A	5 (18)
Stage B	21 (78)
Stage C	1 (4)
BKV genotype	
BKV-I	16 (50) ‡
BKV-II	8 (25)
BKV-III	1 (3)
BKV-IV	7 (22)

Table 1. Clinical characteristics of the 32 cases of BKV associated nephropathy.

Abbreviations: ATG, anti-thymocyte globulin; BKVN, BK-virus associated nephropathy, c-PRA: calculated panel reactive antibody; DSA, donor-specific antibodies; eGFR, estimated glomerular filtration rate (using MDRD [modification of diet in renal disease]); IQR, interquartile range; KT, kidney transplantation; KTR, kidney transplant recipients; NA: missing data

* Undetermined (N=8), polycystic kidney disease (N=3), congenital nephropathy (N=1)

** Kidney-pancreas (N=1), kidney-liver (N=2)

† Other induction therapy: rituximab (N=1), anti-CD52 (N=1), plasma exchange (N=1)

‡ BKV-I subtypes: BKV-Ia (N=3), BKV-Ib1 (N=4), BKV-Ib2 (N=8), BKV-Ic (N=1).

Table 2. Kinetics of BKV DNA detection in KB and concomitant plasma samples from KT to BKVN diagnosis.

Abbreviations: BKVN: BK virus associated nephropathy; IQR, interquartile range; IU: international units; KB, kidney biopsy; KT, kidney transplantation; NA, not available; VL, viral load.

† BKV-subtype could not be determined for 2/8 patients with a BKV-positive kidney biopsy at day 0.

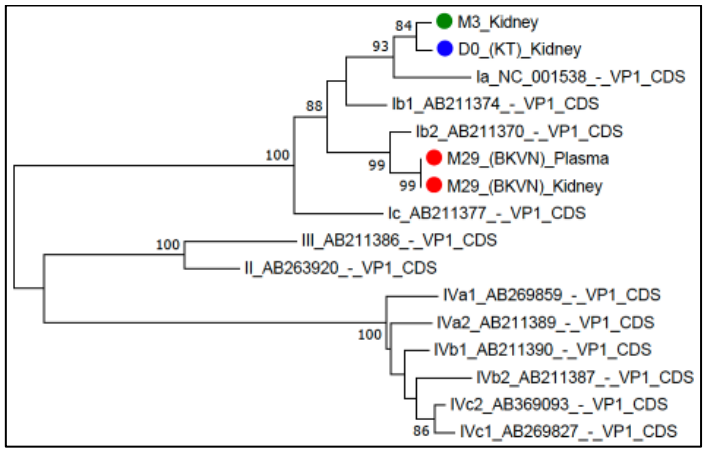
* All eight BKV-positive pre-BKVN KB samples with a negative concomitant plasma had a different genotype compared to the one in BKVN KB

** In one patient, VP1 Sanger sequencing identified a different BKV-genotype at the time of BKVN diagnosis in kidney biopsy (BKV-Ic) and concomitant plasma (BKV-Ib1)

Variable n (%); median [IQR]	**Day 0 – KT** (N=20)		**Pre-BKVN** (N=24)		**BKVN diagnosis** (N=32)	
Median delay from KT *(months)*	0		3 [3-7]		12.0 [8.2-17.5]	
BKV DNA in KB						
BK+ samples	8/20 (40)		15/24 (62)		32/32 (100)	
Median VL in BKV+ KB samples *(logIU/10^6 cells)*	3.7 [3.5-4.4]		5.0 [4.2-6.2]		8.2 [6.3-8.9]	
BKV+ KB samples with same genotype as BKVN KB	1/6 (17) †		7/15 (47)		ref	
BKV DNA in concomitant plasma	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**
BKV+ samples	0/20 (0)	20/20 (100)	7/15 (47)	8/15 (53) *	32/32 (100)	0/32 (0)
Median VL in BKV+ plasma samples *(logIU/ml)*	.	.	3.7 [3.4-4.1]	.	5.4 [4.3-6.0]	.
BKV+ plasma samples with same genotype as BKVN KB	.	.	7/7 (100)	.	31/32 (97) **	.

Figure 1. Maximum likelihood trees representing the BKV-subtypes identified in consecutive BKV-positive samples of plasma and kidney biopsy using VP1 Sanger sequencing.

A. Patient #3



B. Patient #8

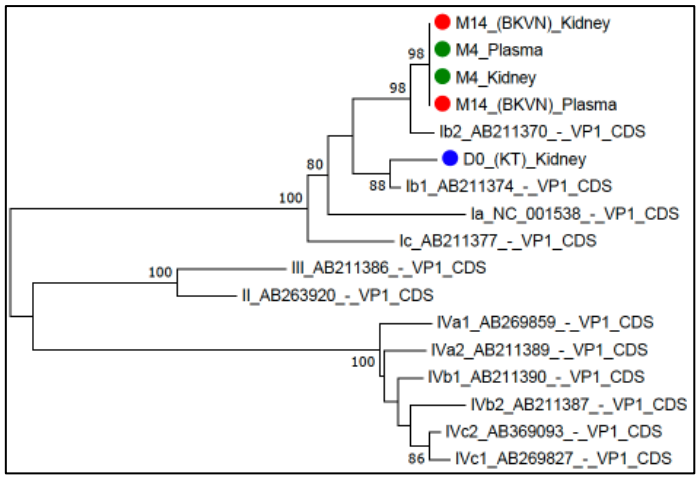
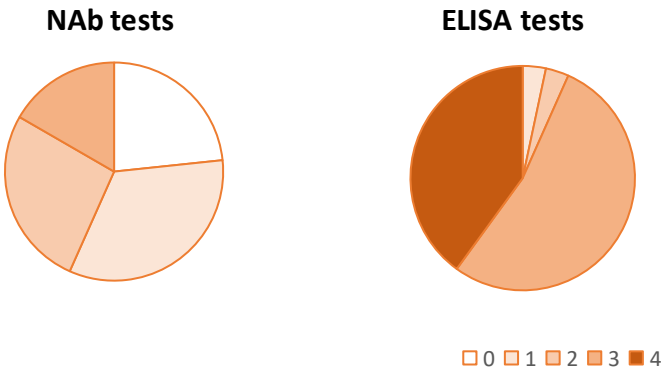


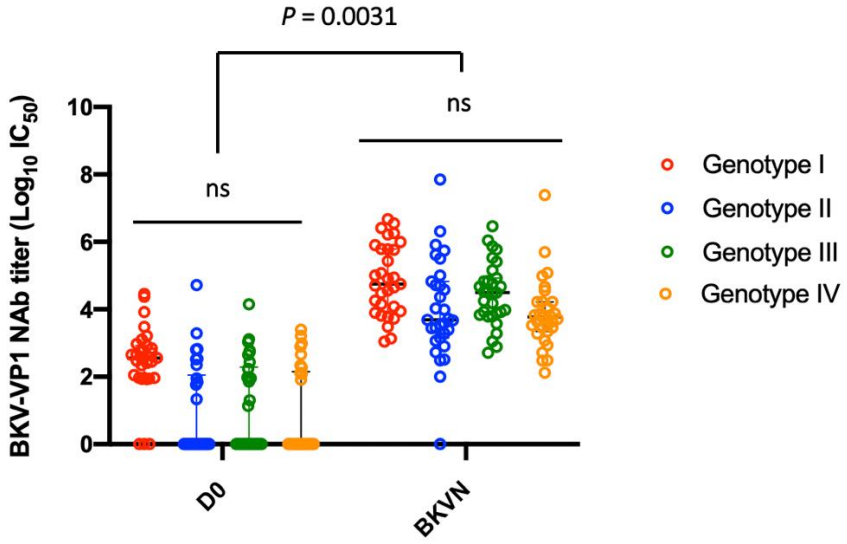
Figure 2. BKV-VP1 genotype specific antibody detection from kidney transplantation (Day 0) to BKVN diagnosis.

BKV VP1-genotype specific antibody titers against all four main genotypes were determined on available serum samples at the time of KT (N=30) using ELISA-VLP or neutralization tests and BKVN diagnosis (N=31) only with neutralization tests. All samples were tested with each genotype-specific VLP using both techniques. For neutralization testing, results are presented as $\log_{10}$ IC_{50} (each dot representing the sample of one patient)

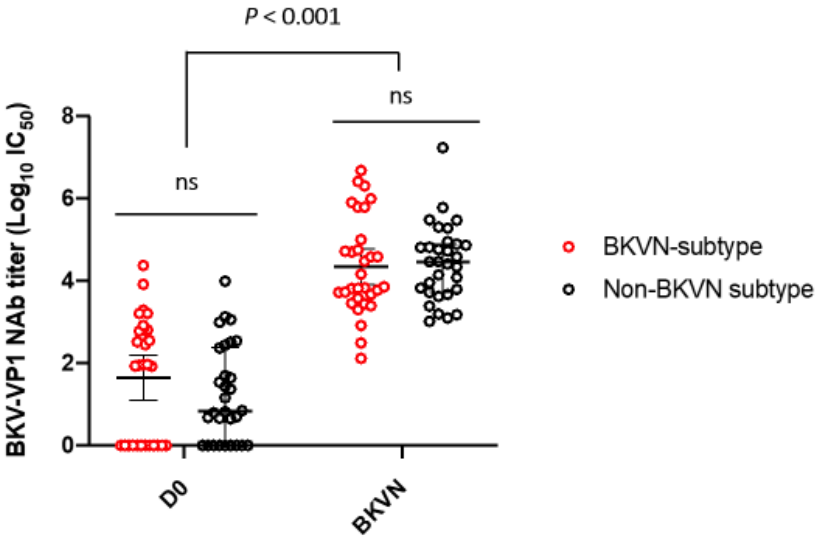
A. Proportion of samples with multiple BKV-subtypes antibodies detected using neutralization or ELISA tests at day 0 (N=30).



B. 0 (N=30) and BKVN (N=31).



C. Comparison of BKV-VP1 NAb titers against the BKVN-subtype compared to others in serum samples at D0 (N=30) and BKVN diagnosis (N=31).



EBMT

www.nature.com/bmt

ARTICLE

Check for updates

Incidence, risk factors and outcome of BK virus hemorrhagic cystitis following allogenic hematopoietic cell transplantation: a retrospective cohort study

Anastasia Saade[1,2,3✉], Julien Gras[1,3,4], Michael Darmon[3,5], David Michonneau[2,3,6], Nathalie Dhedin[7], Linda Feghoul[3,8], Jérôme Le Goff[3,6,8], Aliénor Xhaard[2], Régis Peffault De Latour[2,3], Gérard Socié[2,3,6,9,10] and Jean-Michel Molina[1,3,4,9,10✉]

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2022

BK polyomavirus (BKPyV) can cause hemorrhagic cystitis (HC) after allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT). Recent evaluation of BKPyV HC (BKHC) incidence and risk factors are scarce. We conducted a retrospective single-center study on a recent allo-HCT cohort over 3 years in a referral academic hospital for hematological malignancies. Primary objective was to determine BKHC incidence using competitive risk analysis. Secondary objectives were the identification of HC risk factors using Fine and Gray models and the evaluation of mortality. Among 409 allo-HCT recipients (median age 47 years), 41 developed BKHC after a median delay of 41 [32–55] days. Incidence density of BKHC was 2.4 [1.8–3.1] events per 100 days post-allo-HCT. The proportion of BKHC after adjustment for time-dependent competing risk was 9.5 [9.5–9.6]% at 100 days. BK viremia was detected in 63 versus 20% in tested patients with and without BKHC, respectively. After adjustment for confounders, myeloablative conditioning regimen with and without cyclophosphamide and CMV seropositivity were independently associated with BKHC. Post-transplantation cyclophosphamide was not associated with BKHC. BKHC resolved in 90% of the patients. No difference in mortality was found between patients with or without BKHC. In parallel to the recent evolution of allo-HCT protocols, BKHC remains a frequent complication following allo-HCT.

Bone Marrow Transplantation; https://doi.org/10.1038/s41409-022-01665-y

INTRODUCTION

BK polyomavirus (BKPyV) is an ubiquitous non-enveloped double strand DNA virus of the *Polyomaviridae* family. Primary infection occurs in early childhood with a seroprevalence rate above 80% in the adult population [1]. Following primary acquisition, BKPyV establishes persistent infection mainly in the epithelial cells of the reno-urinary tract. BKPyV is an opportunistic pathogen with asymptomatic BK viruria being detected in 5–20% of healthy individuals [2]. In immunocompromised patients, due to impaired cellular and/or humoral immunity, persistent BKPyV reactivation can lead to severe complications such as BKPyV-associated nephropathy in kidney transplant recipients, or hemorrhagic cystitis (BKHC) after allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) [3].

Following allo-HCT, hemorrhagic cystitis (HC) can occur within the first week (early-onset HC), and results predominantly from toxicity of the conditioning regimen. On the contrary, late-onset HC is associated with extensive BKPyV replication in the urinary tract [4]. While BKPyV viruria is detected in approximately 40% of allo-HCT recipients, BKHC incidence varies from 8–25% in children and 7–54% in adult all-HCT [5–7]. BKHC is associated with high morbidity including major discomfort, frequent need for transfusion support, bladder irrigation, and increased hospital length-of-stay [8]. Moreover, BKHC can cause tubulointerstitial nephritis leading to renal impairment [9], and a study reported an association between BKHC and decreased survival [10].

Several risk factors for BKHC have previously been identified including the underlying hematological malignancy, the use of umbilical cord blood (UCB) as source of stem cells, myeloablative conditioning (MAC) regimen, administration of cyclophosphamide or busulfan in the conditioning regimen, graft versus host disease (GvHD), recipients and donor seropositivity for CMV, HLA-mismatched donor, BKPyV viruria and BKPyV viremia [3, 7]. Over the past few years, allo-HCT protocols have evolved with more frequent mismatched relative donors (haploidentical transplantation) and thus wider use of post-transplantation cyclophosphamide (PTCy) to prevent GvHD. In this context, an increased incidence of BKHC has been reported [11, 12].

We conducted a single-center retrospective study on a large and recent allo-HCT cohort to evaluate the current incidence of BKHC, to identify potential risk factors for BKHC taking into

[1]Département des Maladies Infectieuses et Tropicales des Hôpitaux Saint-Louis/Lariboisière, Paris, France. [2]Service d'hématologie, greffe, hôpital Saint-Louis, Paris, France. [3]Université de Paris, Paris, France. [4]INSERM U944 « Biology of emerging viruses" Team, Saint Louis Research Institute, Paris, France. [5]Center of Epidemiology and Biostatistics, INSERM, Université de Paris, ECSTRA Team, UMR 1153, Paris, France. [6]INSERM U976 HIPI – INSIGHT Team, Saint Louis Research Institute, Paris, France. [7]Service d'hématologie adolescents et jeunes adultes, hôpital Saint-Louis, Paris, France. [8]Laboratoire de virologie, hôpital Saint-Louis, Paris, France. [9]These authors contributed equally: Gérard Socié, Jean-Michel Molina. [10]These authors jointly supervised this work: Gérard Socié, Jean-Michel Molina. ✉email: Anastasia.SAADE@chu-rennes.fr; Jean-michel.molina@aphp.fr

Received: 15 November 2021 Revised: 23 March 2022 Accepted: 25 March 2022
Published online: 20 May 2022

account time-dependent competing events, and to assess the impact of BKHC on survival.

METHODS

Study design and population

In this retrospective single center study, all consecutive patients who underwent allo-HCT between January 2016 and January 2019 at Saint-Louis referral academic hospital (Paris, France) were included. Data were extracted from the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) database, ProMISe, accessed through the Francophone Society for bone marrow graft and cell therapy (Société Francophone de Greffe de Moelle Osseuse et de Thérapie Cellulaire [SFGM-TC]) plateform.

Patients were followed up for at least two years.

Patient consent statement

All patients included in the ProMISe database filled a consent form to consent to the transfer of data to the EBMT and their use for research purposes [IRB00003888].

Allo-HCT protocol

Hematologic malignancies were determined according to the 2016 WHO Classification. Stem cell donor sources were either peripheral stem cells (PSC), bone marrow (BM), or UCB. Conditioning regimen was either MAC or regimens using fludarabine and/or reduced doses of chemo/radiotherapy referred as non-myeloablative (NMA) and reduced intensity conditioning (RIC). MAC included high dose cyclophosphamide (total dose: 120 mg/kg) with 12 gray total body irradiation (TBI) or regimens including busulfan at a total dose > 6.4 mg/kg or TBI > 8 gray. All other regimens were considered as attenuated regimens. In case of related haploidentical donor, GvHD prophylaxis included PTCy at 50 mg/kg/day on day 3 and 4 after allo-HCT. Cyclophosphamide administration was associated with hyper-hydration (6 L/24H), urine alkalinization, and continuous infusion of uromitexan (200% of the cyclophosphamide dose).

Neutrophil engraftment was defined as an absolute neutrophil count > 0.5 G/L on two consecutive days and platelet engraftment as an absolute count > 20 G/L on two consecutive days in the absence of transfusion.

All patients received at least fluconazole as prophylaxis of candidemia, and for patients with previous history of invasive fungal infection or at high risk of invasive fungal infection, prophylaxis was ensured by voriconazole or posaconazole during aplasia. All patients, in the absence of contra-indication, received antimicrobial prophylaxis with valacyclovir, cotrimoxazole and amoxicillin. Following allo-HCT, blood CMV and EBV nucleic acid testing (NAT) were systematically monitored twice a week during aplasia then once a week until day 100. BKPyV monitoring was not subjected to any standardized practice.

Hemorrhagic cystitis

Clinical screening for hematuria (including daily urinary stick) was regularly performed after allo-HCT, with particular attention paid to patients receiving cyclophosphamide to detect early-onset HC. In case of hematuria and/or urinary symptoms, a complete urine microbiological assessment was performed including standard bacterial culture, adenovirus, CMV and BKPyV NAT. BKPyV plasma NAT was left at the physician's discretion. When multiples time-points were sampled, positivity was considered when at least one time-point was positive. For BKPyV NAT, DNA was extracted from 200 µL of plasma or urine sample using the QIAsymphony system (Qiagen, Courtaboeuf), and eluted into a final volume of 115 µL. Quantitative real-time PCR for the detection of BKPyV DNA was performed on 15 µL of eluted DNA using *artus*® BK Virus RG PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instruction. The lower limit of detection of the assay was 195 copies/mL.

BKHC was defined according to the European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) criteria and included the combination of irritative (pollakiuria, urinary burn, urgency) and/or obstructive urinary symptoms (dysuria, acute urine retention), hematuria ≥grade 2 according to Bedi et al. classification (grade 1, microscopic hematuria; grade 2, macroscopic hematuria; grade 3, macroscopic hematuria with clots; and grade 4, macroscopic hematuria requiring instrumentation [13]), and BKPyV viruria >7 $\log_{10}$ copies/mL [7]. BKHC was also considered when BKPyV viruria was <7 $\log_{10}$ copies/mL but with positive viremia. Early-onset HC (occurring within 7 days post-allo-HCT) were excluded.

All patients diagnosed with HC received hyper-hydration, antispasmodic and other comfort treatments when appropriate. In case of blood clots, patients had continuous bladder irrigation with cold normal saline using a two-way urinary catheter. The introduction of specific therapeutics (pharmacological therapies and/or surgical treatment), and transfusion support were left at the physician's discretion. Remission was defined as complete resolution of symptoms. Persistent BKHC was defined as the absence or partial improvement of symptoms at last follow-up. Kidney failure associated with BKPyV infection was defined by creatinine elevation of at least 1.5 times baseline (before the occurrence of BKHC) upon BKHC.

Data collection

Data were collected from the ProMISe database, patients' charts, and electronic records on a standardized case report form (CRF). Retrieved data included baseline demographic characteristics (age at allo-HCT, sex, Karnofsky scale at allo-HCT), underlying hematological malignancy, CMV donor/recipient serological status, allo-HCT characteristics (conditioning regimen, donor type, stem cell source), and hematological outcome (remission at day 100, neutrophil and platelet engraftment). The following post-allo-HCT complications were recorded: acute GvHD (aGvHD), chronic GvHD (cGvHD), blood CMV reactivation, and BKHC characteristics (time of onset, presence of symptoms related to BKHC, maximal grade of hematuria according to Bedi et al. classification [13], duration of BKHC, implemented treatments, plasma and/or urine BKPyV viral load, creatinine before the onset and after the resolution of BKHC). The following events were recorded at last-follow-up: kidney function, persistence or remission of BKHC, and death (from any cause).

Statistical analysis

Data are described as median and interquartile range (IQR) for continuous variables and number and percentage for categorical variables. Categorical variables were compared using Chi-square or Fisher's exact test and continuous variables using Wilcoxon test or 2-sample *t* test as appropriate. BKHC are reported as incidence density for 100 days. A competing risk analysis was performed to assess cumulative risk of BKHC using competitive risk analysis. Mortality during follow-up was considered as a competing risk.

Risk factors for BKHC were assessed using Fine and Gray model. Briefly, variables were selected according to their relevance and statistical significance in univariate analysis. Conditional stepwise regression with, 0.2 as the critical *P* value for entry into the model and 0.1 as the *P* value for removal was used. It was planned a priori to force MAC, cyclophosphamide and UCB in the model, should these variables not be selected. To avoid redundancy, a categorical variable was created to evaluate MAC and cyclophosphamide within the conditioning regimen. CMV reactivation and aGvHD were not included in the model as both events occurred either concomitantly or after BKHC (Supplementary Fig. 1). We performed a *post-hoc* sensitivity analysis to assess whether corticosteroid (dose > 1 mg/kg/day) was associated with BKHC, as corticosteroids were recently reported to be associated with BKHC [10]. In addition, viremia and viruria are part of the definition of BKPyV and for collinearity issues were also not included in the model. Interactions and correlations between the explanatory variables were carefully checked. Proportionality of sub-hazard ratio (sHR) and linear functional form were confirmed.

Influence of BKHC on mortality was assessed using Kaplan–Meier survival curve and log rank analysis. Last, a sensitivity analysis by propensity score weighting was performed to assess factors associated with BKHC. Quality of matching was assessed using propensity score distribution before and after matching, and standardized mean difference of variables of interest before and after matching.

All tests were two sided, and $P < 0.05$ were considered statistically significant. Analyses were done using R software version 4.0.1 (https://www.r-project.org).

RESULTS

Study population

From January 2016 to January 2019, 411 allo-HCT recipients were included in the study. Two patients were excluded for missing data. Main characteristics of the study population are reported in Table 1. Median age was 47 (31–58) years, and 247 (60%) were male. Most frequent underlying hematological malignancies requiring allo-HCT were acute myeloid leukemia (AML) ($n = 138$, 34%)

Table 1. Characteristics and outcomes of the study population.

	Overall	BKHC	No BKHC	P[a]
n	409	41	368	
Age at allo-HCT (years)	47 (31–58)	41 (32–53)	48 (30–59)	0.24
Male	247 (60)	24 (59)	223 (61)	0.93
Karnofsky scale at allo-HCT (%)	100 [80–100]	100 [80–100]	100 [80–100]	0.07*
CMV seropositive recipient	277 (69)	36 (88)	241 (67)	**0.01***
CMV seropositive donor	214 (53)	28 (68)	186 (52)	0.06*
Underlying hematological malignancy				0.67
Bone marrow failure	34 (8)	3 (7)	31 (8)	
ALL and LBL	52 (13)	7 (17)	45 (12)	
AML	138 (34)	17 (42)	121 (33)	
Lymphoma	43 (11)	2 (5)	41 (11)	
MDS and MPN	108 (26)	10 (24)	98 (27)	
MM and PCL	8 (2)	0 (0)	8 (2)	
Other	26 (6)	2 (5)	24 (7)	
CR before allo-HCT	224 (55)	23 (56)	201 (55)	1.00
Stem cell source				
Bone marrow	72 (18)	8 (20)	64 (18)	0.91
Peripheral blood	328 (80)	31 (76)	297 (81)	0.55
Umbilical cord blood	9 (2)	2 (5)	7 (2)	0.50*
HLA-match				0.38
Matched related	130 (32)	9 (22)	121 (33)	
Matched unrelated	188 (46)	20 (49)	168 (46)	
Haploidentical	40 (10)	6 (15)	34 (9)	
Mismatched unrelated	43 (11)	6 (15)	37 (10)	
Other	8 (2)	0 (0)	8 (2)	
Conditioning regimen				
MAC	114 (28)	23 (56)	91 (25)	**<0.001***
Cy	115 (28)	14 (34)	101 (27)	0.47*
MAC + Cy	59 (14)	9 (22)	50 (14)	0.23
Total body irradiation	88 (22)	8 (20)	80 (22)	0.90
Busulfan	245 (60)	32 (78)	213 (58)	**0.02**
Fludarabine	318 (78)	30 (73)	288 (78)	0.59
Antithymoglobulin	248 (61)	29 (71)	219 (60)	0.22
GvHD prophylaxis				0.26
CsA	26 (6)	3 (8)	23 (6)	
CsA and MMF	179 (44)	12 (30)	167 (46)	
PTCy/CsA/MMF	51 (13)	7 (18)	44 (12)	
CsA and MTX	108 (27)	15 (38)	93 (25)	
Other	43 (11)	3 (8)	40 (11)	
Hematological outcome				
CR at day 100	305 (75)	33 (81)	272 (74)	0.47
Neutrophil engraftment	379 (95)	44 (96)	336 (95)	0.68
Platelet engraftment	364 (89)	35 (85)	329 (90)	0.53
Post-allo-HCT complications				
aGvHD	215 (54)	32 (78)	183 (51)	**0.002**
Onset of aGvHD (days post-allo-HCT)	24 (15–36)	24 (18–34)	25 (15–37)	0.35
cGvHD	135 (33)	18 (44)	117 (32)	0.17
Corticosteroids	207 (51)	29 (71)	178 (48)	0.01**
CMV reactivation	168 (41)	33 (81)	135 (37)	<0.001
Onset of CMV reactivation (days post-allo-HCT)	42 (33–52)	41 (33–46)	43 (33–54)	0.81
UTI[b]	97 (24)	41 (100)	56 (15)	**<0.001**

Table 1. continued

	Overall	BKHC	No BKHC	P^a
Positive AdV viruria	6 (2)	1 (2)	5 (1)	1.00
Mortality	129 (32)	16 (39)	113 (31)	0.36

Data are reported as absolute value with percentage for categorical variables or median with interquartile interval for quantitative variables.
Statistically significant *P* values are in bold.
AdV adenovirus, *aGVHD* acute graft versus host disease, *ALL* and *LBL* acute lymphoblastic leukemia and Lymphoblastic B lymphoma, *allo-HCT* allogeneic hematopoietic cell transplantation, *AML* acute myeloid leukemia, *BKPyV* BK polyomavirus, *cGvHD* chronic graft versus host disease, *CMV* cytomegalovirus, *CR* complete remission, *CsA* cyclosporine, *Cy* cyclophosphamide, *MAC* myeloablative conditioning, *MTX* methotrexate, *MMF* mycophenolate mofetil, *MDS* and *MPN* myelodysplasia syndrome and myeloproliferative syndrome, *MM* and *PCL* multiple myeloma and plasma cell leukemia, *PTCy* post-transplantation cyclophosphamide.
[a]Bivariate results were planned to be reported as exploratory and in way to understand variable selection process.
[b]UTI is defined by the existence of functional urinary signs and a positive bacterial culture.
*Covariates included in the multivariate model.
**Covariate included in the post-hoc analysis.

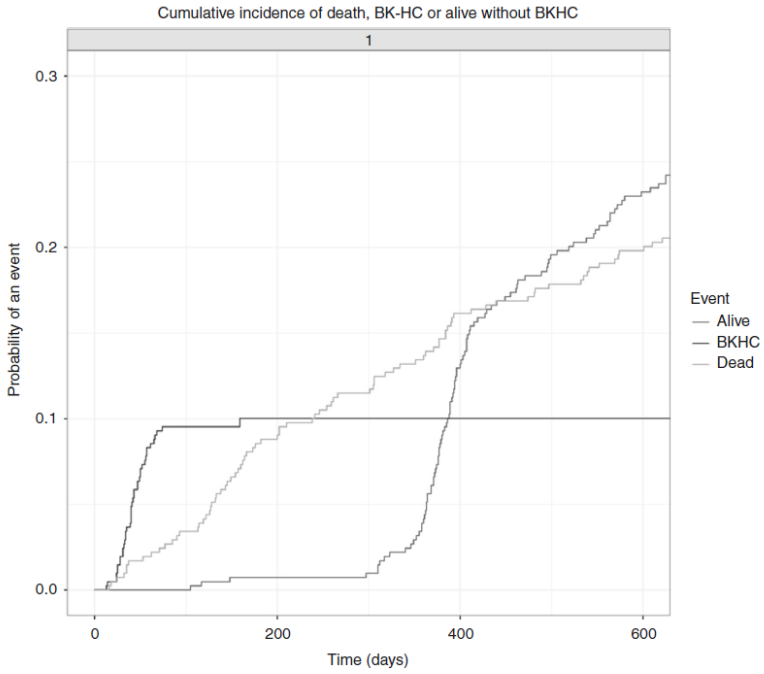


Fig. 1 Competing risk of cumulative incidence of BKHC in allograft recipients. Competing risk of cumulative incidence of BKHC (blue), mortality (green) and being alive without having developed BKHC (red) in overall patients.

myelodysplastic and myeloproliferative syndromes (MDS/MPN) ($n = 108$, 26%) and acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic B lymphoma (ALL/LBL) ($n = 52$, 13%). At the time of allograft, 224 (55%) patients had reached complete remission. Donor source was PB stem cells in 80% of the cases. MAC was administered in 28% of the patients. One hundred and fifteen (28%) patients received cyclophosphamide as part of the conditioning regimen (59 with MAC and 56 with RIC) and 51 (13%) as PTCy. Forty (10%) patients were allografted with a haploidentical donor and 43 (11%) with a mismatched unrelated donor. At day 100, 305 (75%) patients were in remission.

With a median follow-up of 641 [377–867] days post-allo-HCT, 54% were diagnosed with grade 1 [0–2] aGvHD among which 51% were treated with corticosteroids, and 33% developed cGvHD. CMV replication occurred in 41%.

Incidence and characteristics of BKHC cases

Among 409 allo-HCT recipients, 41 developed BKHC according to the defined criteria. Incidence density of BKHC was 2.4 [1.8–3.1] events per 100 days post-allo-HCT. The proportion of patients developing BKHC after adjustment for time-dependent competing risk, death and alive without BKHC, was 9.54% [9.51–9.59] at 100 days post-HCT (Fig. 1).

In univariate analysis, patients treated with MAC more often developed BKHC (56 versus 25%, $P < 0.001$), as well as those receiving busulfan within MAC (78 versus 58%, $P = 0.02$). Patient seropositive status for CMV was also associated with BKHC (88 versus 67%, $P = 0.01$). BKHC was more frequently observed in patients with aGvHD (78 versus 51%, $P = 0.002$), those treated with corticosteroids (71 versus 48%, $P = 0.01$), and with CMV reactivation (81 versus 37%, $P < 0.001$) (Table 1).

Table 2. Characteristics of BKHC after allo-HCT ($n = 41$).

BKHC characteristics	*n* (%)
Onset of symptoms (days post-allo-HCT)	41 (32–55)
Maximum grade of hematuria ($n = 40$)	2 (2, 3)
2	23 (56)
3	10 (24)
4	8 (20)
Irritative syndrome	41 (100)
Obstructive syndrome	18 (44)
Positive BK viremia ($n = 27$)	17 (63)
Median time to positive viremia (days post-allo-HCT)	79 [48–165]
Positive BK viruria ($n = 41$)	41 (100)
Median time to positive viruria (days post-allo-HCT)	41 (33–56)
Therapeutics	
Hyperhydration	34 (85)
Bladder irrigation	18 (45)
Molecular therapies	4 (10)
Intra-vesical cidofovir	1 (2)
Intra-veinous cidofovir	2 (5)
Brincidofovir*	1 (2)
Romiplostim	1 (2)
Platelet transfusion support	20 (49)
Surgical interventions	5 (12)
Electrocoagulation	1 (2)
Ureteral stent	3 (7)
Ureteral stent and electrocoagulation	1 (2)
Outcome	
Duration (days)	29 (16–52)
Remission	36 (90)
Kidney failure	4 (10)
Overall mortality	16 (39)

*One patient received both brincidofovir and intra-veinous cidofovir.

Main characteristics of BKHC cases are reported in Table 2. BKHC occurred at a median of 41 (32–55) days post-allo-HCT, and lasted a median of 29 (16–52) days. Median grade of BKHC was 2 (2, 3). Median BKPyV urine viral load was 10^9 copies/ml [10^9–10^9]. BK plasma NAT was performed in 27/41 cases and was positive in 17 (63%) at a median of 79 [48–165] days post-allo-HCT with a median viral load of 2761 copies/ml [1867–20,788]. Among patients without BKHC (performed in the context of any urinary symptoms or increased creatinine), BK viruria and viremia were respectively detected in 52/101 (51%, median viral load: 10^9 copies/ml [9.10^6–10^9] versus 10^9 [10^9–10^9] for patients with BKHC; $P = 0.02$) and 17/83 (20%, median viral load: 2969 copies/ml [1607–6096] versus 2761 [1867–20,788] for patients with BKHC; $P = 0.92$) (Table 2 and Supplementary Table 1).

Following BKHC diagnosis, 34 (85%) patients received intravenous hyper-hydration, 18 (45%) continuous bladder irrigation and 49% platelet transfusion support. Specific pharmacological therapies were initiated in 5 (12%) patients and 5 required surgery (Table 2). No weaning of immunosuppressive therapy was initiated.

Risk factors for BKHC

After adjustment for confounders to assess risk factors fostering the development of BKHC, MAC with cyclophosphamide ($P = 0.006$), MAC without cyclophosphamide ($P < 0.001$) and recipient CMV seropositive status ($P = 0.004$) were independently associated with BKHC in the multivariate analysis (Table 3). PTCy administration was not associated with BKHC (sHR [95%]: 1.32 [0.58–2.99], $P = 0.51$).

Table 3. Fine and Grey multivariate analysis to assess risk factors for BKHC.

	Adjusted sHR	95% CI
Karnofsky scale at allo-HCT	0.97	[0.95–1.00]
Umbilical cord blood	2.58	[0.90–7.36]
RIC/MNA	Ref	–
MAC with Cyclophosphamide	3.37	[1.42–7.95]
MAC without Cyclophosphamide	4.27	[2.15–8.50]
Donor CMV seropositivity	3.76	[1.53–9.27]

CMV cytomegalovirus, *MAC* myeloablative regimen, *sHR* sub-hazard ratio, *MNA/RIC* non-myeloablative/reduced intensity conditioning.

The post-hoc sensitivity analysis showed that corticosteroid ($P = 0.02$) use was independently associated with BKHC (Supplementary Table 2).

Outcome of BKHC

Complete remission was observed in 90% of the patients (including those who received pharmacological therapies). One hundred and twenty-nine patients died. Main causes of death were disease progression (42%), GvHD (31%), infections (19%) and multi-organ failure (13%). No difference in overall mortality was found between patients with BKHC ($n = 16$, 39%) and without BKHC ($n = 113$, 31%) ($P = 0.32$) (Fig. 2a). After propensity score weighting fitted on the age at allo-HCT, sex, underlying hematological malignancy, hematological status at allo-HCT and Karnofsky scale at allo-HCT, BKHC had no influence on survival ($P = 0.36$; Fig. 2b and Supplementary Fig. 2).

Among patients with BKHC, median creatinine at BKHC onset was 63.00 [53.50, 76.00] µmol/L and at resolution or last follow-up 68.50 [60.00, 82.75] µmol/L and 24 (59%) patients displayed creatinine elevation with a median increase of 30% (17–96) from baseline. Kidney failure was observed in 4 patients (including one requiring renal replacement therapy), but no kidney biopsy was performed to confirm BKPyV involvement. None had received cidofovir. BKHC persisted in 4 patients among which 2 had kidney failure at last follow-up. All patients with kidney failure and persistent BKHC displayed positive BKPyV viremia.

DISCUSSION

In this retrospective study, we describe the characteristics of BKHC in a recent cohort of allo-HCT recipients, including a significant proportion of patients with haploidentical donors. This is the first study, to our best knowledge, taking into account the influence of competing factors and time-dependent competing events to evaluate the incidence of BKHC after allo-HCT and identify risk factors. We identified 10% (41/409) BKHC cases in our cohort, consistent with recent studies reporting incidence rates for BKHC between 8–25% in children and 7–54% in adult allo-HCT [7]. After adjustment for time-dependent competing risk, we showed a probability of 9.5% to develop BKHC at day 100 post-allo-HCT (Fig. 1).

BKHC occurred in a median delay of 41 (32–55) days post-allo-HCT, in line with previous reports [6, 11, 14, 15]. About half the patients required bladder irrigation ($n = 18$, 45%), and only 4 received antiviral therapies. Four (10%) patients had persistent BKHC symptoms at last follow-up.

In our work, 56% (53/94) of patients with positive BKPyV viruria never presented BKHC (Supplementary Table 1). Indeed, BKPyV

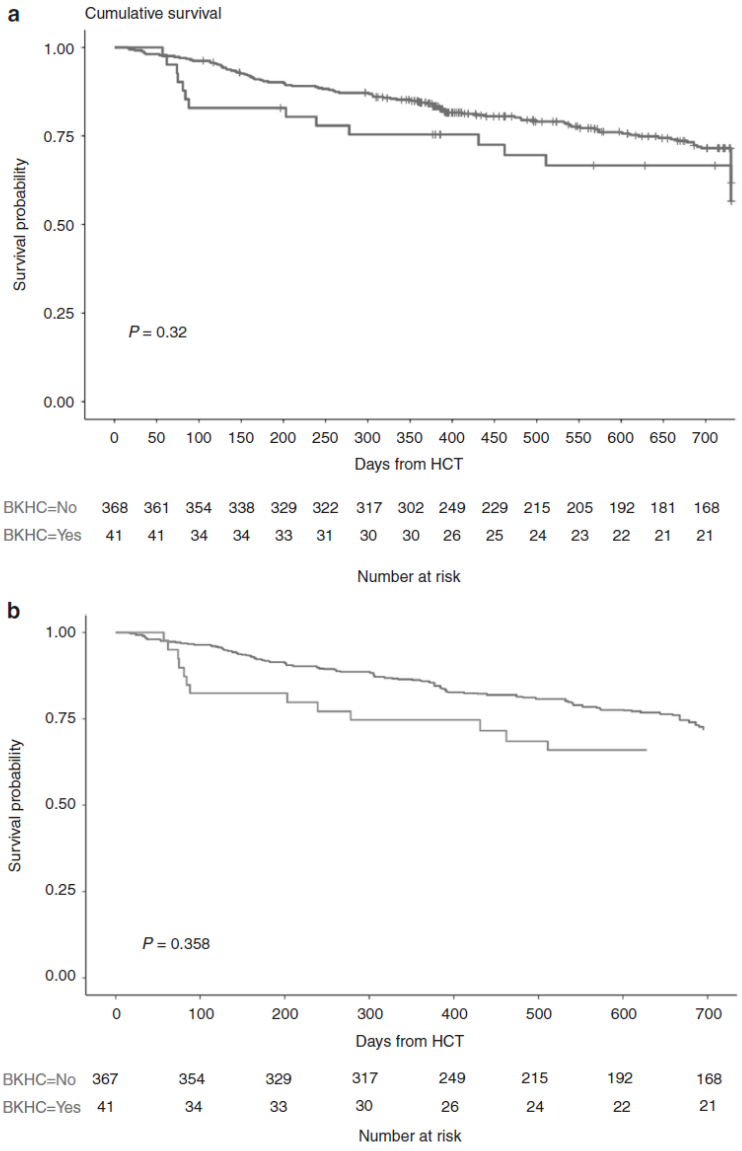


Fig. 2 Cumulative survival of allograft patients according to the occurrence of BKHC. a Survival curve of patients with BKHC (blue) and without BKHC (red) are obtained by Kaplan–Meier analysis and compared using Log-Rank test. **b** Survival curves were obtained after propensity score weighting. Covariates entered in the propensity score overlap weighting were age at allo-HCT, sex, underlying hematological malignancy and Karnofsky scale at allo-HCT.

viruria is frequent, often present in the urine of asymptomatic individuals, and thus poorly correlates with the occurrence of BKHC [16, 17]. However, some studies reported a threshold ranking from $3\log_{10}$ to $5\log_{10}$ above which viruria was associated with the occurrence of BKHC [18, 19]. In this study, patients with BKHC presented higher BKPyV urine levels than patients without BKHC (10^9 copies/ml [10^9–10^9] versus 10^9 copies/ml [9.10^6–10^9]; $P = 0.018$], respectively). In addition, only half (17/34) of the patients with BKPyV viremia developed BKHC (Supplementary Table 1), suggesting that plasma BKPyV might not be useful to predict BKHC. However, many describe that viremia above a threshold of $3\log_{10}$ might be a more convenient tool to predict BKHC [14, 20, 21]. Still, our results should be used with caution as BKPyV monitoring was not systematically performed, and often guided by the occurrence of urinary symptoms. Taken together, the fact that BKPyV viremia and/or viruria were seen in both allo-HCT recipients with and without BKHC, indicates the multifactorial pathogenesis of this entity, and the limitation of screening strategies based on BKPyV detection in plasma or urine. Interestingly, in our cohort, all patients with kidney failure and persistent BKHC displayed positive BKPyV viremia. No patient with kidney failure received cidofovir. Among the 4 patients with

persistent BKHC, 2 had kidney failure. BKPyV viremia in allo-HCT was reported to have an impact on long-term kidney function [6, 22, 23]. Laskin et al. reported that viremia above 10^4 copies/ml was associated with reduced kidney function [6]. Herein, the impact of kidney failure or persistent BKHC could not be further explored, as the number of patients was too small. In contrast, we did not find any impact of BKHC on mortality even after propensity score weighting, in agreement with other studies [24, 25].

In the multivariate analysis using a time-dependent model in the presence of competing risks, risk factors associated with BKHC were patient CMV seropositive status, MAC with and without cyclophosphamide. Patient CMV seropositive status [16], MAC [26, 27], and administration of cyclophosphamide [15, 24] were previously identified as risk factors for BKHC. In our study, cyclophosphamide included in MAC was not associated with an over-risk of BKHC compared with MAC without cyclophosphamide (sHR 3.06 [1.27–7.32] versus 4.46 [2.25–8.84]). This might be explained by the fact that, in our institution, cyclophosphamide administration was associated with continuous infusion of uromitexan, a protocol associated with decreased incidence of HC after allo-HCT in a recent study [25]. Another explanation of the observed result could be that high doses of alkylating agent, independent of the molecule, may be involved in BKHC. Kaphan and colleagues evaluated risk factors of BKHC in a recent cohort with high rate of PTCy ($n = 49/168$) and reported PTCy exposure as a risk factor for BKHC [11]. In our cohort, 51 patients received PTCy as GvHD prophylaxis and we did not find a significant association between BKHC and the use of PTCy. The absence of association could be due to low statistical power or the absence of association in our cohort. Copelan and colleagues compared the incidence of BKHC in allo-HCT recipients with haploidentical and matched related donor, all of whom received PTCy as GvHD prophylaxis, and suggested that increased BKHC incidence resulted from inherent immune deficiencies after HLA-mismatched transplantation rather than from the use of PTCy, in line with our results [12].

Other factors were previously reported to be associated with BKHC such as CMV reactivation, aGvHD and corticosteroids [11, 16, 18, 19, 23, 24, 26]. As these events overlap with the onset of BKHC, they were not considered as risk factors to predict the occurrence of BKHC. However, both were associated with BKHC in the post-hoc sensitivity analysis (Supplementary Table 2). The link between recipient CMV seropositivity and BKHC is not obvious but may result from the immunocompromised state of allo-HCT recipients favoring both CMV reactivation in seropositive CMV recipient and BKHC. Interestingly, over the past 3 years, the implementation of letermovir for CMV prophylaxis has reduced the cumulative incidence of CMV reactivation at day 180 by 38% [28]. This could have an impact in the next few years on the association between CMV recipient seropositivity and BKHC.

Our study has several limitations. First, the retrospective and single center design may influence external validity of our findings. Second, we included all consecutive patients who underwent allo-HCT in our institution, including adults and young adults and consequently our youngest patient had 14 years old. We did not evaluate the association of BK viremia and viruria with BKHC as we considered that both items were related to the definition and diagnosis of BKHC. In addition, we could not assess the predictive value of both BKPyV viremia and viruria for BKHC as they were not systematically monitored. We were not able to evaluate the impact of the specific therapeutics for BKHC, as few patients received antivirals therapies. Benefit of antivirals on BKHC is unlikely as their efficacy has been debated [3]. Given the major impact of the immune response in the pathogenesis of BKHC [29], cell therapies such as mesenchymal cells [30] and adoptive immunotherapy [31–33] might modify the natural history of BKHC in the future.

At last, we did not explore risk factors neither for kidney failure, nor for persistent BKHC as few events occurred, preventing further statistical analyses.

In conclusion, we report that parallel to the recent evolution of allo-HCT protocols, BKHC remains a major complication following allo-HCT, and is associated with MAC with or without cyclophosphamide, and recipient CMV seropositivity. Although BKHC occurrence had no impact on mortality, clinical and virological screening, in combination with novel anti-BKPyV therapeutics, deserves further attention to reduce the severe morbidity associated with BKHC in this population.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

1. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging therapies. Clin Microbiol Rev. 2017;30:503–28.
2. Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. Clin Infect Dis Publ Infect Dis Soc Am. 2005;41:354–60.
3. Saade A, Styczynski J, Cesaro S. Infectious Disease Working party of EBMT. BK virus infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation: An update on pathogenesis, immune responses, diagnosis and treatments. J Infect. 2020;81:372–82.
4. Leung AYH, Suen CKM, Lie AKW, Liang RHS, Yuen KY, Kwong YL. Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. Blood. 2001;98:1971–8.
5. Ghosh A, Tan TT, Linn YC, Gopalakrishnan S, Goh YT, Hwang W, et al. What we learned from plasma BK-Virus monitoring in allogeneic hematopoietic transplant recipients. Transplantation. 2016;100:e17–18.
6. Laskin BL, Denburg MR, Furth SL, Moatz T, Altrich M, Kleiboeker S, et al. The Natural History of BK polyomavirus and the host immune response after stem cell transplantation. Clin Infect Dis Publ Infect Dis Soc Am. 2020;71:3044–54.
7. Cesaro S, Dalianis T, Hanssen Rinaldo C, Koskenvuo M, Pegoraro A, Einsele H, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother. 2018;73:12–21.
8. Gilis L, Morisset S, Billaud G, Ducastelle-Leprêtre S, Labussière-Wallet H, Nicolini F-E, et al. High burden of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transpl. 2014;49:664–70.
9. Shah A, Kumar V, Palmer MB, Trofe-Clark J, Laskin B, Sawinski D, et al. Native kidney BK virus nephropathy, a systematic review. Transpl Infect Dis J Transpl Soc. 2019;21:e13083.
10. Kerbauy LN, Kerbauy MN, Bautzer V, Chapchap EC, de Mattos VRP, da Rocha JDA, et al. Severe hemorrhagic cystitis caused by the BK polyomavirus is associated with decreased survival post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Transpl Infect Dis J Transpl Soc. 2019;21:e13101.
11. Kaphan E, Germi R, Bailly S, Bulabois C-E, Carré M, Cahn J-Y, et al. Risk factors of BK viral hemorrhagic cystitis in allogenic hematopoietic stem cell transplantation. Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc. 2021;23:e13601.
12. Copelan OR, Sanikommu SR, Trivedi JS, Butler C, Ai J, Ragon BK, et al. Higher incidence of hemorrhagic cystitis following haploidentical related donor transplantation compared with matched related donor transplantation. Biol Blood Marrow Transpl J Am Soc Blood Marrow Transpl. 2019;25:785–90.
13. Bedi A, Miller CB, Hanson JL, Goodman S, Ambinder RF, Charache P, et al. Association of BK virus with failure of prophylaxis against hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation. J Clin Oncol J Am Soc Clin Oncol. 1995;13:1103–9.
14. Imlay H, Xie H, Leisenring WM, Duke ER, Kimball LE, Huang M-L, et al. Presentation of BK polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Blood Adv. 2020;4:617–28.
15. Karagun BS, Aygunes U, Eken A, Akbas T, Melek E, Antmen B. Risk Assessment for BK Virus-Associated Hemorrhagic Cystitis After Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant: A Single-Center Retrospective Cross-Sectional Study. Exp Clin Transplant Off J Middle East Soc Organ Transplant. 2021. https://doi.org/10.6002/ect.2021.0104.
16. Erard V, Storer B, Corey L, Nollkamper J, Huang M-L, Limaye A, et al. BK virus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients: frequency, risk factors,