Année 2021/2022 N°

# Thèse

Pour le

## DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par


# William POUILLOT

Né le 21 octobre 1992 à Cosne-Cours-Sur-Loire (58)


---

## Complexe SMC5/6 et infections à Polyomavirus BK

---

Présentée et soutenue publiquement le 06 octobre 2022 devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Serge GUYETANT, Anatomie et Cytologie Pathologiques, Faculté de Médecine -Tours

Membres du Jury :

Docteur Marie-Christine MACHET, Anatomie et Cytologie Pathologiques, MCU-PH, Faculté de Médecine –Tours

Docteur Elodie STANDLEY-MIQUELESTORENA, Anatomie et Cytologie Pathologiques, MCU-PH, Faculté de Médecine –Tours

Docteur Thibault KERVARREC, Anatomie et Cytologie Pathologiques, AHU, Faculté de Médecine – Tours

***Directeur de thèse : Professeur Antoine TOUZE, Institut Universitaire de Technologies- Tours***

UNIVERSITE DE TOURS
**FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

**DOYEN**
**Pr Patrice DIOT**

**VICE-DOYEN**
Pr Henri MARRET

**ASSESSEURS**
Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, *Moyens – relations avec l'Université*
Pr Clarisse DIBAO-DINA, *Médecine générale*
Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Pr Patrick VOURC'H, *Recherche*

**RESPONSABLE ADMINISTRATIVE**
Mme Carole ACCOLAS

********

**DOYENS HONORAIRES**
Pr Emile ARON (†) – *1962-1966*
*Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962*
Pr Georges DESBUQUOIS (†) - *1966-1972*
Pr André GOUAZE (†) - *1972-1994*
Pr Jean-Claude ROLLAND – *1994-2004*
Pr Dominique PERROTIN – *2004-2014*

**PROFESSEURS EMERITES**
Pr Daniel ALISON
Pr Gilles BODY
Pr Philippe COLOMBAT
Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr Pascal DUMONT
Pr Bernard FOUQUET
Pr Yves GRUEL
Pr Gérard LORETTE
Pr Dominique PERROTIN
Pr Philippe ROSSET

**PROFESSEURS HONORAIRES**
P. ANTHONIOZ – P. ARBEILLE – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – C. BARTHELEMY – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L. CASTELLANI – J. CHANDENIER – A. CHANTEPIE – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – D. GOGA – A. GOUDEAU – J.L. GUILMOT – O. HAILLOT – N. HUTEN – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE – AM. LEHR-DRYLEWICZ – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINE – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – R. QUENTIN – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – D. ROYERE - A. SAINDELLE – E. SALIBA – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – J. WEILL

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | |
|---|---|
| ANDRES Christian | Biochimie et biologie moléculaire |
| ANGOULVANT Denis | Cardiologie |
| APETOH Lionel | Immunologie |
| AUPART Michel | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| BABUTY Dominique | Cardiologie |
| BAKHOS David | Oto-rhino-laryngologie |
| BALLON Nicolas | Psychiatrie ; addictologie |
| BARBIER François | Médecine intensive et réanimation |
| BARILLOT Isabelle | Cancérologie ; radiothérapie |
| BARON Christophe | Immunologie |
| BEJAN-ANGOULVANT Théodora | Pharmacologie clinique |
| BERHOUET Julien | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| BERNARD Anne | Cardiologie |
| BERNARD Louis | Maladies infectieuses et maladies tropicales |
| BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle | Biologie cellulaire |
| BLASCO Hélène | Biochimie et biologie moléculaire |
| BONNET-BRILHAULT Frédérique | Physiologie |
| BOURGUIGNON Thierry | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| BRILHAULT Jean | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| BRUNEREAU Laurent | Radiologie et imagerie médicale |
| BRUYERE Franck | Urologie |
| BUCHLER Matthias | Néphrologie |
| CALAIS Gilles | Cancérologie, radiothérapie |
| CAMUS Vincent | Psychiatrie d'adultes |
| CORCIA Philippe | Neurologie |
| COTTIER Jean-Philippe | Radiologie et imagerie médicale |
| DEQUIN Pierre-François | Thérapeutique |
| DESMIDT Thomas | Psychiatrie |
| DESOUBEAUX Guillaume | Parasitologie et mycologie |
| DESTRIEUX Christophe | Anatomie |
| DI GUISTO Caroline | Gynécologie obstétrique |
| DIOT Patrice | Pneumologie |
| DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague | Anatomie & cytologie pathologiques |
| DUCLUZEAU Pierre-Henri | Endocrinologie, diabétologie, et nutrition |
| EL HAGE Wissam | Psychiatrie adultes |
| EHRMANN Stephan | Médecine intensive – réanimation |
| FAUCHIER Laurent | Cardiologie |
| FAVARD Luc | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| FOUGERE Bertrand | Gériatrie |
| FRANCOIS Patrick | Neurochirurgie |
| FROMONT-HANKARD Gaëlle | Anatomie & cytologie pathologiques |
| GATAULT Philippe | Néphrologie |
| GAUDY-GRAFFIN Catherine | Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière |
| GOUPILLE Philippe | Rhumatologie |
| GUERIF Fabrice | Biologie et médecine du développement et de la reproduction |
| GUILLON Antoine | Médecine intensive – réanimation |
| GUILLON-GRAMMATICO Leslie | Epidémiologie, économie de la santé et prévention |
| GUYETANT Serge | Anatomie et cytologie pathologiques |
| GYAN Emmanuel | Hématologie, transfusion |
| HALIMI Jean-Michel | Thérapeutique |
| HANKARD Régis | Pédiatrie |
| HERAULT Olivier | Hématologie, transfusion |
| HERBRETEAU Denis | Radiologie et imagerie médicale |
| HOURIOUX Christophe | Biologie cellulaire |
| IVANES Fabrice | Physiologie |
| LABARTHE François | Pédiatrie |
| LAFFON Marc | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence |
| LARDY Hubert | Chirurgie infantile |
| LARIBI Saïd | Médecine d'urgence |
| LARTIGUE Marie-Frédérique | Bactériologie-virologie |
| LAURE Boris | Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie |
| LECOMTE Thierry | Gastroentérologie, hépatologie |
| LEGRAS Antoine | Chirurgie thoracique |
| LESCANNE Emmanuel | Oto-rhino-laryngologie |
| LINASSIER Claude | Cancérologie, radiothérapie |

MACHET Laurent .....Dermato-vénéréologie
MAILLOT François .....Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain .....Pneumologie
MARRET Henri .....Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel .....Dermatologie-vénéréologie
MEREGHETTI Laurent .....Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine .....Pédiatrie
MORINIERE Sylvain.....Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa .....Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis.....Rhumatologie
ODENT Thierry.....Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi .....Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna .....Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles .....Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric .....Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Franck .....Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean.....Ophtalmologie
PLANTIER Laurent.....Physiologie
REMERAND Francis .....Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe.....Biologie cellulaire
RUSCH Emmanuel.....Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline.....Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem.....Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab .....Dermatologie-vénéréologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria .....Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre .....Pédiatrie
TOUTAIN Annick.....Génétique
VAILLANT Loïc.....Dermato-vénéréologie
VELUT Stéphane.....Anatomie
VOURC'H Patrick.....Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé .....Immunologie
ZEMMOURA Ilyess .....Neurochirurgie

## PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DIBAO-DINA Clarisse
LEBEAU Jean-Pierre

## PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien .....Soins palliatifs
POTIER Alain .....Médecine Générale
ROBERT Jean.....Médecine Générale

## PROFESSEUR CERTIFIE DU 2ND DEGRE

MC CARTHY Catherine.....Anglais

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AUDEMARD-VERGER Alexandra.....Médecine interne
BARBIER Louise.....Chirurgie digestive
BINET Aurélien .....Chirurgie infantile
BISSON Arnaud .....Cardiologie (CHRO)
BRUNAULT Paul .....Psychiatrie d'adultes, addictologie
CAILLE Agnès .....Biostat., informatique médical et technologies de communication
CARVAJAL-ALLEGRIA Guillermo .....Rhumatologie (au 01/10/2021)
CLEMENTY Nicolas .....Cardiologie
DENIS Frédéric.....Odontologie
DOMELIER Anne-Sophie .....Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane .....Biophysique et médecine nucléaire
ELKRIEF Laure.....Hépatologie – gastroentérologie
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie.....Anatomie et cytologie pathologiques
GOUILLEUX Valérie.....Immunologie

HOARAU Cyrille.....Immunologie
LE GUELLEC Chantal.....Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
LEFORT Bruno.....Pédiatrie
LEMAIGNEN Adrien.....Maladies infectieuses
MACHET Marie-Christine.....Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste.....Radiologie pédiatrique
PARE Arnaud.....Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
PIVER Éric.....Biochimie et biologie moléculaire
ROUMY Jérôme.....Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte.....Thérapeutique
STANDLEY-MIQUELESTORENA Elodie.....Anatomie et cytologie pathologiques
STEFIC Karl.....Bactériologie
TERNANT David.....Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VAYNE Caroline.....Hématologie, transfusion
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure.....Génétique

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....Neurosciences
NICOGLOU Antonine.....Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald.....Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile.....Médecine Générale

## MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

BARBEAU Ludivine.....Médecine Générale
ETTORI-AJASSE Isabelle.....Médecine Générale
PAUTRAT Maxime.....Médecine Générale
RUIZ Christophe.....Médecine Générale
SAMKO Boris.....Médecine Générale

## CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRAE

BECKER Jérôme.....Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BOUAKAZ Ayache.....Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BRIARD Benoit.....Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
CHALON Sylvie.....Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
DE ROCQUIGNY Hugues.....Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
ESCOFFRE Jean-Michel.....Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
GILOT Philippe.....Chargé de Recherche Inrae – UMR Inrae 1282
GOUILLEUX Fabrice.....Directeur de Recherche CNRS – EA 7501 - ERL CNRS 7001
GOMOT Marie.....Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
GUEGUINOU Maxime.....Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1069
HEUZE-VOURCH Nathalie.....Directrice de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
KORKMAZ Brice.....Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
LATINUS Marianne.....Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
LAUMONNIER Frédéric.....Chargé de Recherche Inserm - UMR Inserm 1253
LE MERREUR Julie.....Directrice de Recherche CNRS – UMR Inserm 1253
MAMMANO Fabrizio.....Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
MEUNIER Jean-Christophe.....Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
PAGET Christophe.....Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
RAOUL William.....Chargé de Recherche Inserm – UMR CNRS 1069
SI TAHAR Mustapha.....Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
SUREAU Camille.....Directrice de Recherche émérite CNRS – UMR Inserm 1259
WARDAK Claire.....Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT

***Pour l'Ecole d'Orthophonie***
DELORE Claire.....Orthophoniste
GOUIN Jean-Marie.....Praticien Hospitalier
***Pour l'Ecole d'Orthoptie***
BOULNOIS Sandrine.....Orthoptiste
***Pour l'Ethique Médicale***
BIRMELE Béatrice.....Praticien Hospitalier

# SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,

de mes chers condisciples

et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

# Abrévations

AFA :Alcool Formolé Acétique

BKPVN : néphropathie tubulo-interstitielle associée au BK virus

BKPyV : *BK polyomavirus*

DBD : *DNA Binding Domain*

EMEM : *Eagle's Minimal Essential Medium*

GVH: Greffon *Versus* Hôte

HBV : virus de l'hépatite B

HHV8 : *Human Herpesvirus 8*

HPV : *Human Papillomavirus*

HRP : *horseradish peroxidase*

HSV : *Herpes Simplex Virus*

ICTV : *International Committee on Taxonomy of Viruses*

LTAg : *Large T antigen*

MCPyV : *Merkel cell polyomavirus*

MOI : *Multiplicity of infection*

mPyV : *murine Polyomavirus*

NCCR : *Non-Coding Control Region*

NJPyV: *New Jersey polyomavirus*

NSMCE1-2-3-4 : *Non-structural maintenance of chromosomes element -1-2-3-4*

PCNA : (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

PEI : polyethyleneimine

PFA : Paraformaldéhyde

PP2A : *protein phosphatase 2A*

pRB : Protéine du rétinoblastome

RPA : *replication Protein A*

RT-qPCR : *reverse transcription*

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SLF2 : *SMC5/6 complex Localization Factor 2*

SMC5-6 : *Structural Maintenance of Chromosome 5-6*

stAg : *small T antigen*

SVF : sérum de veau fœtal

SV40 : *Simian vacuolating virus 40*

truncTAg : *truncated T antigen*

vmi-ARN : micro-ARN viraux

# Sommaire


1 **1.RESUME** ..... **10**

2 **2.ABSTRACT** ..... **12**

3 **3.INTRODUCTION** ..... **14**

3.1 Généralités sur les polyomavirus ..... 14

3.2 Polyomavirus BK : caractéristiques virologiques ..... 15

3.2.1 Organisation génomique ..... 15

3.2.2 Expression des gènes viraux ..... 16

3.3 Cycle viral ..... 19

3.4 Pathologies associées au BKPyV ..... 21

3.4.1 Primo-infection et histoire naturelle ..... 21

3.4.2 Méthodes diagnostiques non-invasives des infections à BKPyV ..... 23

3.4.3 Histologie des néphropathies à BKPyV ..... 26

3.4.4 Autres pathologies associées au BKPyV ..... 27

3.5 Complexe SMC5/6 ..... 28

3.6 Objectifs ..... 31

4 **4.MATERIELS ET METHODES** ..... **31**

4.1 Lignée cellulaire ..... 31

4.2 Production et titration du stock viral ..... 32

4.3 Mise en évidence des protéines par Immuno-empreinte ..... 33

4.4 Transfection, inclusion des cellules en paraffine et immuno-histochimie ..... 34

4.5 Sélection des patients, matériel de biopsie rénale et immuno-histochimie anti-SMC5 ..... 35

4.6 Interprétation de l'immuno-histochimie anti-SMC5 et tests statistiques ..... 36

5 **5.RESULTATS** ..... **37**

5.1 Identification de facteurs limitant la réplication virale ..... 37

5.1.1 Intéractomique proximale du LTAg ..... 37

5.1.2 Expression du complexe SMC5/6 dans les cellules Vero ..... 38

5.1.3 Impact du BKPyV sur l'expression du complexe SMC5/6 ..... 39

5.1.4 Impact de l'expression des protéines précoces sur le complexe SMC5/6 ..... 41

5.2 Evaluation de l'effet *in* vivo de l'infection du BKPyV sur l'expression de SMC5/6 à partir de matériel de biopsie rénale. ..... 42

5.2.1 Evaluation de l'expression de SMC5 en immuno-histochimie sur les biopsies rénales ..... 42

5.2.2 Evaluation d'un anticorps anti-LTAg du BKPyV en immuno-histochimie ..... 47

6 **6. DISCUSSION** ..... **49**

**6.1** Le complexe SMC5/6 interagit avec le BKPyV *in vitro* ..... 49

**6.2** *Impact du BKPyV sur le complexe SMC5/6 in vivo* ..... 52

**6.3** Evaluation d'un anticorps anti LTAg du BKPyV en immuno-histochimie ..... 53

7 **REFENCE BIBLIOGRAPHIQUES** ..... **55**

# 1.RESUME

Le polyomavirus BK (BKPyV) est un virus ubiquitaire dont la séroprévalence dans la population générale est de 90%. Il induit chez les patients transplantés rénaux une néphropathie tubulo-interstitielle pouvant conduire à une perte du greffon. Il n'existe pas de molécule approuvée pour le traitement de cette pathologie et la prise en charge consiste en une diminution du traitement immunosuppresseur.

Le complexe SMC5/6 a déjà été identifié comme facteur de restriction virale dans d'autres virus à ADN (VHB, HPV, HSV) ainsi que le VIH. De manière intéressante, des expériences d'interactomique proximale ont permis de montrer l'interaction de l'AgT du BKPyV avec ce complexe. Une évaluation par immuno-empreinte a montré une diminution de 50% de l'expression de SMC6 dans des cellules Vero, cellules de rein de singe vert, infectées avec le BKPyV ou exprimant de façon transitoire les protéines virales précoces (LTAg et stAg).

L'autre objectif de ce travail était d'évaluer l'expression *in vivo* chez des patients atteints de néphropathie à BKPyV à partir de matériel de biopsie rénale. L'évaluation de l'expression par immuno-histochimie de SMC5 a été évaluée sur seize biopsies rénales issues de quinze patients suivis au CHRU de Tours et pour lesquels une néphropathie à BKPyV était affirmée ou fortement suspectée. Pour évaluer l'expression de SMC5, un système à trois catégories a été proposé (>75% d'expression normale, 75-25% d'expression normale et <25% d'expression normale). Les virémies moyennes de ces trois groupes étaient bien corrélées au niveau d'expression : plus l'expression était diminuée, plus la virémie était haute, sans que ces différences soient néanmoins statistiquement significatives.

L'anticorps utilisé en immuno-histochimie en pratique courante pour affirmer l'implication du virus BK dans une néphropathie, dirigé contre le LTAg du SV40 étant parfois négatif sur des biopsies montrant pourtant des effets cytopathogènes et chez des patients avec une virémie positive, nous avons voulu, afin de disposer d'un outil diagnostique efficace, évaluer un anticorps dirigé contre le LTAg du BKPyV disponible au laboratoire (clone 8B4) et ayant montré son efficacité en immuno-empreinte et en immuno-fluorescence. Cet anticorps n'a cependant pas montré une efficacité clinique supérieure à l'anticorps utilisé en routine.

# MOTS CLES

-Polyomavirus BK

-Transplantation rénale

-Néphropathie tubulo-interstitielle

-Complexe SMC5/6

-Antigène T

-Immuno-histochimie

# 2.ABSTRACT

BK polyomavirus (BKPyV) is a ubiquitous virus with a seroprevalence of 90% in the general population. It induces tubulointerstitial nephropathy in kidney transplant patients, which can lead to graft loss. There is no approved molecule for the treatment of this disease and the management consists in reducing the immunosuppressive treatment.

One of the objectives of this work was to identify factors limiting viral replication. The SMC5/6 complex has already been identified as a viral restriction factor in other DNA viruses (HBV, HPV, HSV) as well as HIV. Interestingly, proximal interactomics experiments have shown the interaction of BKPyV AgT with this complex. Immunoblot evaluation showed a 50% decrease in SMC6 expression in Vero cells, african green monkey kidney cells, infected with BKPyV or transiently expressing early viral proteins (LTAg and stAg).

The other objective of this work was to assess in vivo expression in patients with BKPyV nephropathy using renal biopsy material. The evaluation of SMC5 expression by immunohistochemistry was assessed on sixteen renal biopsies from fifteen patients followed at the CHRU of Tours and for whom BKPyV nephropathy was confirmed or strongly suspected. To assess SMC5 expression, a three-category system was proposed (>75% normal expression, 75-25% normal expression, and <25% normal expression). The mean viremia of these three groups correlated well with the expression level: the lower the expression, the higher the viremia, although these differences were not statistically significant.

The antibody used in immunohistochemistry in current practice to confirm the involvement of BK virus in nephropathy, directed against the LTAg of SV40, being sometimes negative on biopsies showing cytopathic effects and in patients with a positive viremia, we wanted to evaluate an antibody directed against the LTAg of BKPyV available in the laboratory (clone 8B4) and having shown its efficiency in immunoimprint and immunofluorescence. However, this antibody did not show superior efficacy to the antibody used routinely.

# KEYWORDS

- Polyomavirus BK
- kidney transplantation
- Tubulointerstitial nephropathy
- SMC5/6 complex
- T-antigen
- Immunohistochemistry

# 3.INTRODUCTION

## 3.1 Généralités sur les polyomavirus

Le premier polyomavirus, le polyomavirus murin (mPyV), a été découvert en 1953 par Ludwik Gross, par hasard lors de travaux sur la leucémie murine viro-induite [1]. Les souris infectées par ce virus présentaient de multiples tumeurs solides et c'est cette caractéristique qui a donné son nom à la famille des polyomavirus (*poly* signifiant plusieurs en grec et *oma* signifiant tumeur).

Le second, le *Simian Vacuolating Virus 40* (SV40) a été isolé en 1960 dans des cultures de cellules de macaque rhésus [2]. L'étude du SV40 a été d'une importance capitale pour la compréhension de nombreux mécanismes en biologie cellulaire et moléculaire des cellules eucaryotes, comme par exemple la réplication, l'épissage, le cycle cellulaire ou encore l'apoptose. De même, l'étude de l'antigène grand T a contribué à la découverte de la p53 et à la détermination du rôle de la protéine du rétinoblastome (pRB) ainsi que du facteur de transcription E2F [3].

Le polyomavirus BK (BKPyV) est le premier polyomavirus humain. Il a été découvert en 1971 par Gardner à partir d'urine d'un patient transplanté rénal de 39 ans d'origine soudanaise souffrant de sténose urétérale et dont les initiales étaient B. K. [4].

Selon la dernière classification taxonomique de l'ICTV, ce virus est classé dans le genre *Betapolyomavirus* de la famille des *Polyomaviridae* [5]. Il s'agit d'un virus strictement humain, dont la primo-infection survient dans l'enfance par voie respiratoire.

Les autres polyomavirus humains associés à des pathologies chez l'Homme sont le MCPyV induisant une large majorité des carcinomes à cellules de Merkel, le JCPyV induisant la leuco-encéphalopathie multifocale progressive, le TSPyV induisant la trichodysplasie spinuleuse, le NJPyV responsable de myosite et enfin le Human polyomavirus 6 et le Human polyomavirus 7 tous les deux associés à des atteintes dermatologiques (prurit et dyskératose).

En plus de ces sept polyomavirus associés à des pathologies, huit autres polyomavirus ont été décrits chez l'Homme sans que ceux-ci ne soient pour l'heure reconnus comme responsables de pathologie [6].

## 3.2 Polyomavirus BK : caractéristiques virologiques

### 3.2.1 Organisation génomique

Le génome du BKPyV est constitué d'un ADN double brin circulaire d'environ 5 kb. Il est organisé en une région précoce codant LTAg (*Large T antigen*), truncTAg *(truncated T antigen)* et stAg (*small t antigen*) et une région tardive codant VP1, VP2, VP3, l'agnoprotéine et les micro-ARN viraux. Ces deux régions sont séparées par une région contrôle non codante NCCR (*Non Coding Control Region*) (**Figure 1**).

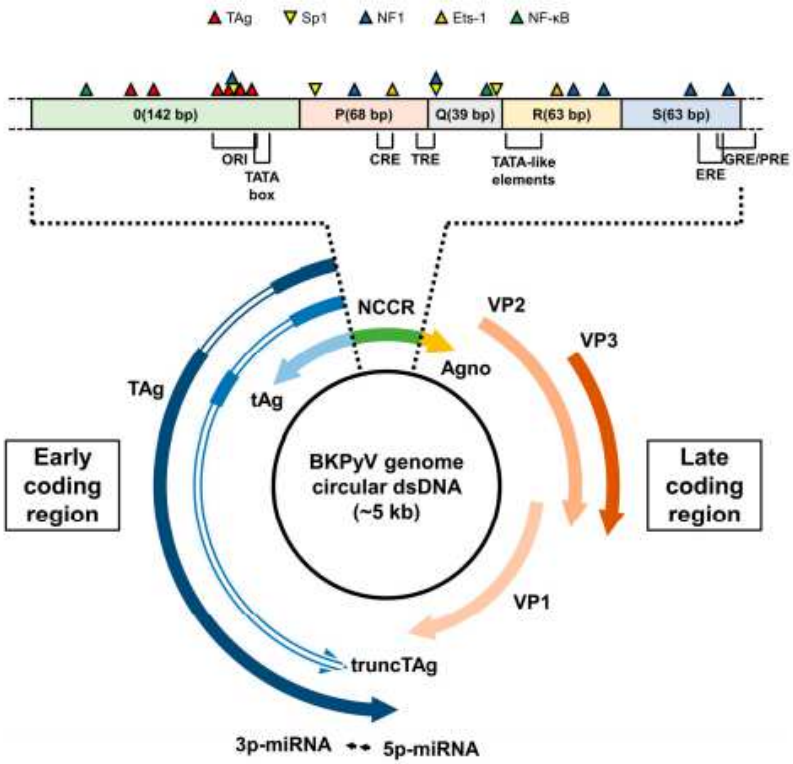


***Figure 1 : Organisation du génome du BKPyV***

*Le génome présente trois régions : la région précoce codant le LTAg (TAg), le truncTAg et le stAg (tAg), la région tardive codant VP1, VP2, VP3, l'agnoprotéine et les micro-ARN viraux (vmi). Ces deux régions sont séparées par la région non codante NCCR (Non-Coding Control Region) constituée de 5 séquences O, P, Q, R, et S qui comporte l'origine de réplication virale ORI, une TATA box, des éléments TATA-like et des sites de liaisons pour le LTAg et les facteurs de transcription SP1, Nf1, Ets-1 et NFκB. (Helle et al.)* [7]

Le NCCR est divisé en cinq séquences O, P, Q, R, S et comporte l'origine de réplication virale ORI, une TATA box, des éléments TATA-like ainsi que des sites de liaisons pour le LTAg et des facteurs de transcription (SP1, Nfl, Ets-1 et NFκB).

## 3.2.2 Expression des gènes viraux

### 3.2.2.1 Région précoce

Les premiers transcrits viraux exprimés codent les protéines précoces LTAg, truncTAg et stAg. Le promoteur précoce est situé dans la région NCCR et est reconnu par l'ARN polymérase II ainsi que par des facteurs de transcription cellulaires. Le LTAg est une protéine de 695 acides aminés (80 kDa) organisée en 5 régions (**Figure 2**) : en N-terminal se trouve un domaine J présentant une importante homologie avec les protéines de la famille DnaJ. Ce domaine interagit spécifiquement avec la protéine chaperonne Hsc70 et joue ainsi un rôle dans la réplication virale [8]. Le deuxième domaine correspond à un motif LXCXE qui se lie à la protéine Rb et aux autres membres de cette famille (p107 et p130) permettant ainsi l'entrée et la progression du cycle cellulaire par la libération d'E2F et facilitant donc la réplication virale [9]. Le troisième domaine est un signal de localisation nucléaire (NLS). La quatrième région correspond au domaine hélicase. Enfin, la dernière région correspond à un domaine de liaison à la p53, cette interaction contribuant plus indirectement à l'entrée de la cellule en phase S du cycle cellulaire [9 10].

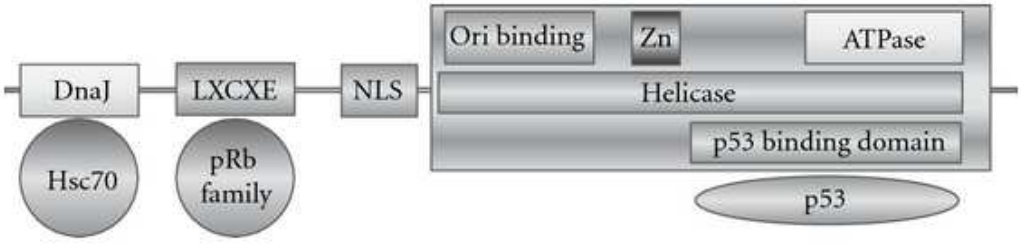


***Figure 2 : Structure du LTAg du BKPyV***

*Le LTAg contient 5 domaines : en N-terminal un domaine J interagissant avec la protéine chaperonne Hsc70 , un domaine LXCXE qui permet la liaison à pRb , un domaine NLS, un domaine hélicase et un domaine de liaison à la p53 (Delbue et al.)* [11]

Le truncTAg comporte 136 acides aminés (17 kDa) [12]. Cet antigène résulte de l'épissage alternatif de l'ARNm avec excision du deuxième intron de l'ARNm du LTAg. Les 133 premiers acides aminés sont identiques à ceux du LTAg mais l'épissage alternatif conduit à un changement de cadre de lecture faisant apparaitre un codon stop. La région tronquée correspond au *DNA-Binding domain* (DBD), *Zinc binding domain* et domaine ATPase.

Le domaine DBD du LTAg reconnait la séquence GAGGC présente en quatre copies au niveau de l'origine de réplication. Le domaine de liaison au zinc est responsable de l'hexamérisation du LTAg qui est la forme active de l'hélicase. Le domaine ATPase fournit l'énergie nécessaire à l'activité hélicase. Une partie du domaine hélicase lie la protéine p53 empêchant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

Le stAg comporte 172 acides aminés (20 kDa). Il partage 82 acides aminés en commun avec le LTAg et contient donc la région DNAJ en N terminal suivie par une région spécifique contenant deux motifs en doigts de zinc impliqués dans les interactions ADN/protéine ou protéine/protéine et en particulier avec la protéine phosphatase 2A (PP2A) conduisant à une inhibition de celle-ci et affectant plusieurs voies de signalisation (dont AKT-mTor, PI3K) qui sont impliquées dans la progression du cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose [13].

#### 3.2.2.2 Région tardive

La région tardive code principalement pour les protéines de capside : la VP1 qui est la protéine majeure de capside et les protéines mineures VP2 et VP3.

Le polyomavirus BK est un virus nu à capside icosaédrique composée de 72 capsomères (symétrie T=7) et mesurant 45 nm. Un capsomère est un pentamère de la protéine majeure de capside VP1 associé à l'une des deux autres protéines mineures de capside VP2 ou VP3. La protéine VP1 (362 acides aminés, 42 kDa) est la protéine permettant l'entrée du virus dans la cellule cible *via* une interaction avec les récepteurs gangliosidiques. La variabilité génétique existante au niveau du gène VP1 sert de base la classification génotypique du BKPyV. En effet, il existe 4 génotypes : I, II, III et IV avec pour certains plusieurs sous-types (Ia, Ib). Le génotype I est le plus fréquent dans le monde (80%) devant le IV (15%) [14].

La protéine VP2 (351 acides aminés, 38 kDa) et VP3, sa version tronquée en N-terminal, (232 acides aminés, 27 kDa) présentent une région de liaison à la VP1, une région de liaison à l'ADN et un NLS. Elles ne sont pas nécessaires à l'assemblage des capsides, leur absence ne modifie pas leur stabilité mais affecte drastiquement l'infectiosité [15].

L'agnoprotéine est une protéine de 66 acides aminés (8 kDa) dont le rôle est peu décrit. Une délétion de celle-ci conduit à une diminution de l'infectiosité du BKPyV [16] . Des travaux d'interatomique ont également montré que l'agnoprotéine interagissait avec l'alpha-SNAP et pourrait donc avoir une action sur l'exocytose [17]. Enfin, l'agnoprotéine interagirait avec le PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) et aurait ainsi un rôle d'inhibiteur de la réplication virale en fin de cycle viral [18].

D'autres éléments assurent également cette fonction de régulation du cycle : les micro-ARN viraux (vmi-ARN), codés par la région tardive et dont les séquences sont complémentaires des transcrits précoces. L'expression des vmi-ARN permet d'exercer un rétrocontrôle négatif de l'expression des protéines virales précoces. Les vmi-ARN ciblent également le messager de la protéine cellulaire ULBP3 qui est un ligand de NKG2D, protéine transmembranaire des lymphocytes T-NK, diminuant alors leur effet cytotoxique et constituant ainsi un mécanisme d'échappement au système immunitaire [19].

#### 3.2.2.3 Région de contrôle non codante NCCR

Cette région est divisée en cinq séquences : O, P, Q, R et S. Elle comprend l'origine de réplication ORI, une TATA box, des éléments TATA-*like*, et des sites de liaisons pour le LTAg et les facteurs de transcription Sp1, NF1, Ets-1 et NFκB. Cette région est assez variable d'une souche virale à l'autre. Le réarrangement le plus fréquent implique la région P avec une duplication ou une triplication de celle-ci (**Figure 3**). Les virus avec un NCCR « archétype » ont une expression plus importante des gènes tardifs et moindre des gènes précoces. A l'inverse, les réarrangements dans le NCCR conduisent à une augmentation de l'expression des gènes précoces et à une diminution de celle des gènes tardifs conférant à ces souches virales une pathogénicité plus importante [20].

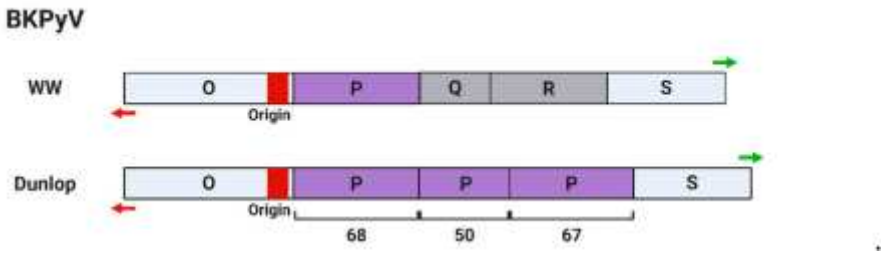


***Figure 3 : Organisation de la région NCCR du BKPyV archétype et du BKPyV souche Dunlop****. Il existe dans la souche Dunlop une triplication de la région P. Les flèches rouges indiquent le sens de la transcription précoce et les flèches vertes de le sens de la transcription tardive (Yang et al.)*[21]

## 3.3 Cycle viral

Le BKPyV se fixe à la surface de la cellule cible en se liant à un récepteur portant des gangliosides, en particulier GT1b et GD1b [22]. L'internalisation est médiée par endocytose cavéole-dépendante [23] dans un délai d'environ quatre heures [24]. Après l'endocytose, le virion passe par l'endosome tardif [25] puis atteint le réticulum endoplasmique (RE) *via* le réseau de microtubules en environ dix heures post-infection [24] . Dans le RE, le virion subit l'effet des disulfure isomérases et réductases aboutissant à une décapsidation partielle et à une exposition de VP2 et VP3 [26 27]. L'entrée dans le noyau se fait par le pore nucléaire. En effet, les protéines VP2 et VP3 exposées après décapsidation partielle présentent des signaux de localisation nucléaire accessibles à l'importine α/β [28]. Une fois dans le noyau, l'expression des gènes de la région précoce se fait environ 24 h après infection. Les protéines néosynthétisées sont acheminées dans le noyau grâce à leur NLS à l'exception du stAg. Le LTAg va alors s'hexamériser puis deux hexamères s'assemblent et se fixent au niveau du motif GAGGC de l'OBD afin d'initier la réplication virale de manière bidirectionnelle. Puis, les gènes tardifs sont exprimés, avec l'aide du LTAg qui se fixe au niveau du NCCR et joue un rôle de facteur de transcription [29]. Les protéines VP1, VP2 et VP3 néosynthétisées sont dirigées vers le noyau pour s'assembler autour des génomes viraux nouvellement synthétisés. Les premières particules virales apparaissent dans le noyau deux jours post-infection [30]. Puis, les particules virales s'accumulent dans le noyau et sont finalement relarguées par la lyse cellulaire (**Figure 4**).

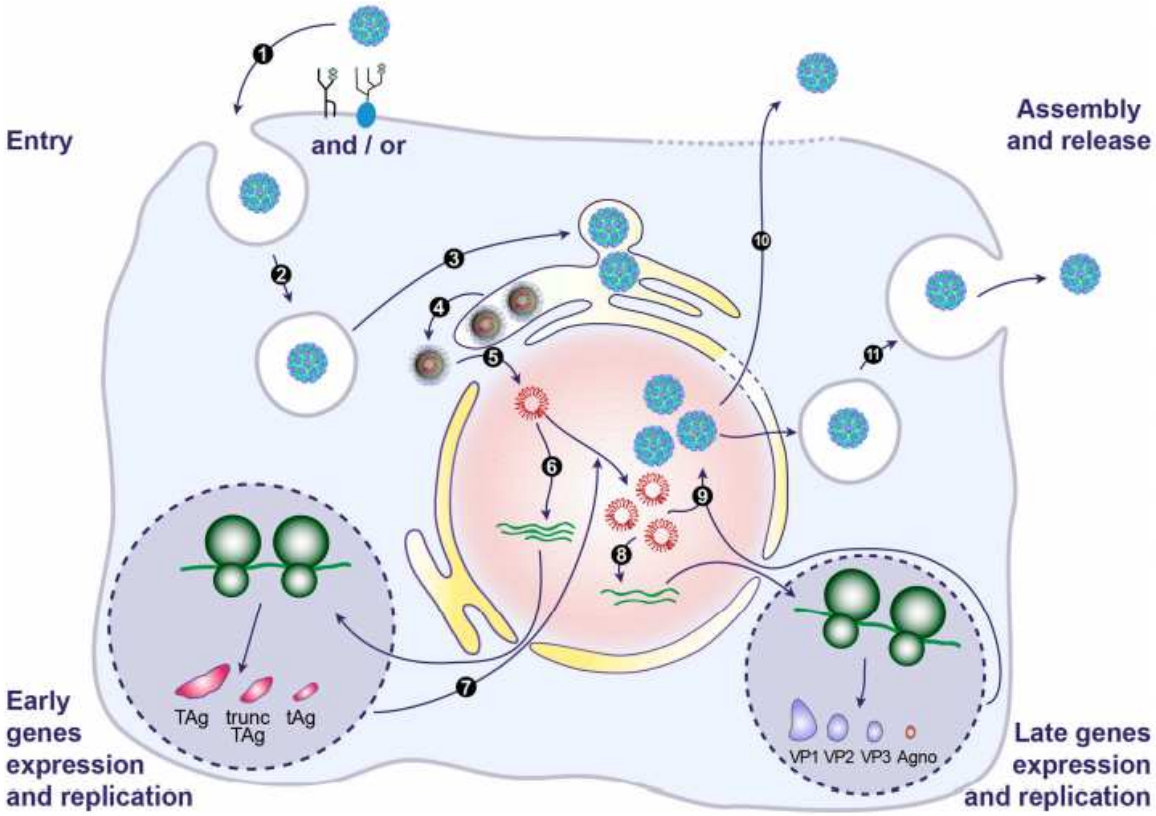


***Figure 4 : Cycle viral du BKPyV***

*Le virus se lie aux récepteurs gangliosidiques (GT1b, GD1b) (1), puis est internalisé par endocytose cavéole-dépendante, il transite par l'endosome précoce (2), puis le réticulum endoplasmique (3) où il subit une étape de décapsidation partielle (4). Le génome est ensuite acheminé dans le noyau par le pore nucléaire (5). Les gènes de la région précoce sont transcrits, puis traduits dans le cytoplasme puis le LTAg est dirigé vers le noyau (7), où il s'hexamérise et se fixe sous la forme de deux copies à l'origine de réplication virale (ORI) et initie la réplication virale. Les gènes de la région tardive sont ensuite transcrits (8), traduits dans le cytoplasme et les protéines produites entrent dans le noyau. Les protéines VP1, VP2 et VP3 s'assemblent alors autour de l'ADN viral néo-synthétisé pour former de nouvelles particules virales (9) qui seront ensuite relarguées en dehors de la cellule infectée par un mécanisme soit lytique (10) soit non lytique (11) (Helle et al.)* [7]

Récemment, la libération non-lytique des particules virales enveloppées dans des vésicules a été décrite. [31] [32] (**Figure 5**).

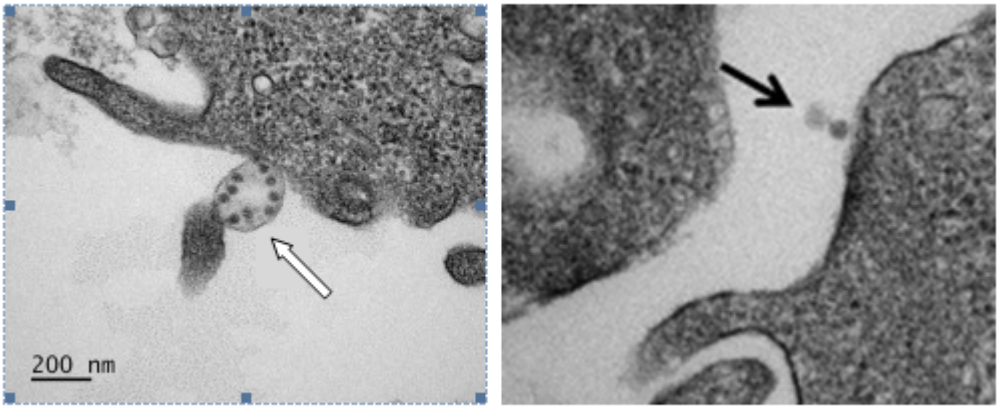


**Figure 5 : Libération virale non lytique**

*Libération de particule virale par mécanisme non-lytique via des vésicules enveloppées contenant des particules virales (flèche blanche). En comparaison, présence de particules virales nues au contact des cellules Vero (flèche noire) (d'après Handala et.al)* [32]

## 3.4 Pathologies associées au BKPyV

### 3.4.1 Primo-infection et histoire naturelle

Dans un premier temps, le virus va infecter les tissus de la sphère ORL [33] pouvant se traduire cliniquement par une symptomatologie respiratoire haute mais cette primo-infection est bien souvent asymptomatique.

Le virus ayant été retrouvé dans les eaux usées de plusieurs pays à travers le monde [34], une transmission uro-orale mais également féco-orale sont suggérées . Concernant la transmission féco-orale, des études ont en effet montré la présence de BKPyV dans les selles [35]. La transmission peut également se faire par transplantation d'un rein infecté par le BKPyV chez un patient séronégatif pour celui-ci [36]. Enfin, de façon plus anecdotique, le BKPyV serait transmissible par voie transplacentaire [37].

Le virus transiterait par la suite par voie sanguine comme en atteste sa présence dans les cellules mononucléées [38] pour enfin persister à vie sous forme épisomale dans l'épithélium rénal et l'urothélium. Le BKPyV infecte largement la population mondiale puisque sa séroprévalence dans la population générale est d'environ 90% [39].

Une faible réplication virale asymptomatique est observée chez les sujets immunocompétents au sein des cellules tubulaires rénales ou urothéliales se traduisant par une faible virurie chez 4 à 7% des sujets [40]. Cette réplication est contrôlée par l'immunité cellulaire[41]. L'utilisation depuis 1995 de puissants immunosuppresseurs (Tacrolimus, Sirolimus, Mycophenolate Mofetil) s'est traduite par une diminution du rejet aigu de greffe et s'est accompagné par une augmentation du nombre de néphropathies à BKPyV [40]. En effet, le virus présent à l'état latent, moins soumis à la pression du système immunitaire va se réactiver, être retrouvé tout d'abord dans les urines (30-50% des patients), puis dans le sang (10-15% des patients) pour aboutir à une néphropathie à BKPyV dans 5% des cas avec potentiellement la perte du greffon [40] (**Figure 6**).

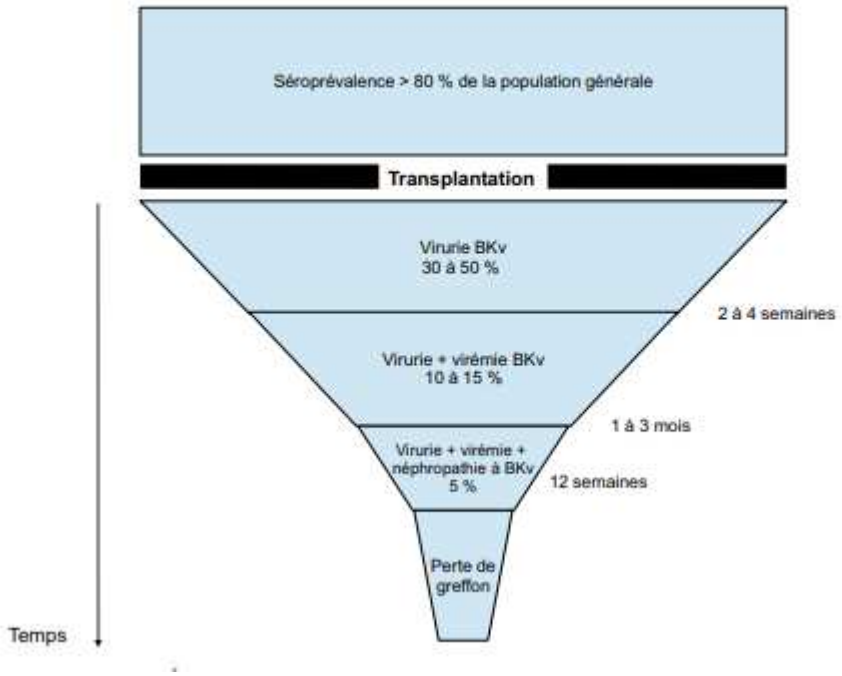


***Figure 6 : Evolution au cours du temps de l'infection à BKPyV chez les patients transplantés rénaux (Lanot et al.)*** [40]

Plusieurs facteurs de risques associés à la néphropathie à BKPyV ont été décrits : des facteurs liés au donneur (*mismatch* HLA, donneur décédé, taux élevé d'anticorps anti-BKPyV, sexe féminin), des facteurs liés au receveur : (âge élevé, sexe masculin, faible taux ou absence d'anticorps anti-BKPyV) et liés à la greffe (stent urétéral, haute dose d'immunosupresseur, association tacrolimus-mycophénolate mofétil, absence ou faible

réponse médiée par les lymphocytes T) et enfin une retransplantation après perte du greffon précédent pour cause de néphropathie à BKPyV [42].

### 3.4.2 Méthodes diagnostiques non-invasives des infections à BKPyV

Plusieurs méthodes non invasives permettent de mettre en évidence une infection par le BKPyV. En cytologie urinaire, des « *Decoy cells* » , ou cellules leurres, ainsi nommées car pouvant évoquer des cellules de carcinome urothélial de haut grade et correspondant en réalité à des cellules tubulaires infectées par le BKPyV peuvent être mises en évidence. Ces cellules présentent souvent un noyau volumineux, excentré, avec un cytoplasme peu abondant, réalisant une trainée donnant un aspect en « comète ». Des inclusion nucléaires virales peuvent également être observées (**Figure 7**) [43]

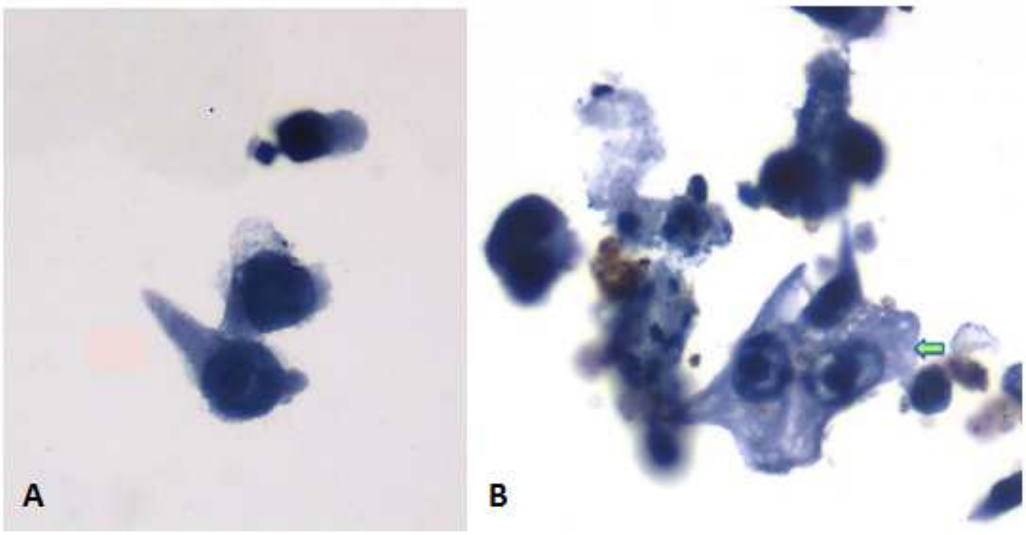


***Figure 7 : Aspect cytologique des « Decoy cells »***

*Noyaux volumineux excentrés avec trainée cytoplasmique : aspect en « comète »(A). Présence d'inclusions nucléaires virales (B) (d'aprèsTummidi et al.)* [43]

Le *Haufen test* quant à lui consiste en la mise en évidence en microscopie électronique à transmission de particules virales s'étant agrégées dans l'urine avec la protéine de Tamm-Horsfall. Il est alors visualisé des agrégats de capsides virales avec un aspect en trois dimension (**Figure 8**).

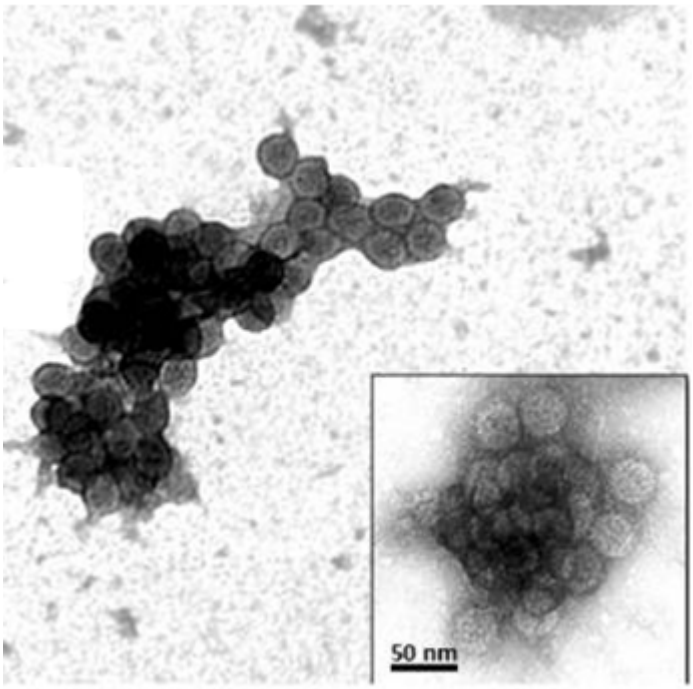


***Figure 8 : Haufen test***

*Aspect des agrégats de particules virales en microscopie électronique (d'après Nickeleit et al)* [44]

Enfin, les techniques les plus utilisées en pratique courante sont les techniques de biologie moléculaire consistant à mettre en évidence le génome viral, soit dans le sang, soit dans l'urine, par amplification des séquences codant les protéines de capsides VP1 et VP2 ou du LTAg du BKPyV. Ces techniques ont l'avantage d'être non seulement qualitative mais permettent également la quantification de la charge virale.

Des seuils cliniques de charge virale ont été validés pour déterminer au mieux la prise en charge des patients, à savoir 7 log10 copies/ml pour la virurie et 4 log10 copies/ml pour la virémie et conditionner ainsi l'attitude thérapeutique (**Figure 9)** [42].

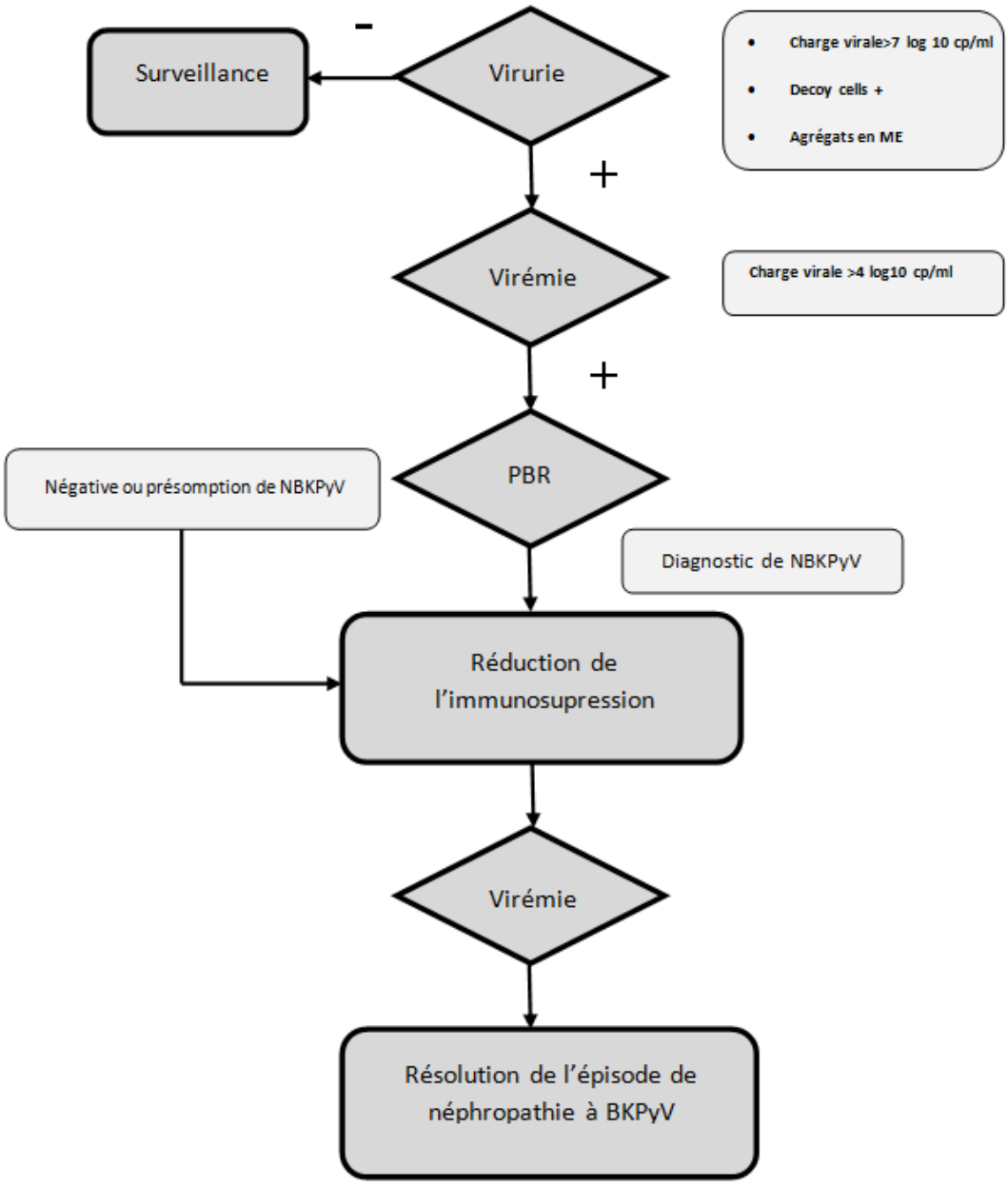


***Figure 9 : Dépistage et prise en charge des patients transplantés rénaux présentant une réactivation du BKPyV.*** *BKPVN : néphropathie à BKPyV (d'après Hirsch et al.)*[42]

Les Sensibilité, Spécificité, Valeur prédictive positive et Valeur prédictive négative des différentes techniques décrites ci-dessus sont présentées dans le **tableau 1.**

***Tableau 1*** *: Caractéristiques des méthodes diagnostiques non invasives d'infection à BKPyV (d'après Sawinski et al.)*[45]

| Méthode diagnostique | Sensibilité (%) | Spécificité (%) | Valeur prédictive positive (%) | Valeur prédictive négative (%) |
|---|---|---|---|---|
| **Cytologie urinaire (Decoy cells)** | 25 | 84 | 29 | 100 |
| **Haufen test** | 100 | 99 | 97 | 100 |
| **PCR urine** | 100 | 78 | 40 | 100 |
| **PCR sang** | 100 | 88 | 50-60 | 100 |

Cependant, ces méthodes ne font que mettre en évidence la présence et la réplication du BKPyV mais ne permettent pas d'évaluer une éventuelle altération du parenchyme rénal. Aussi, la ponction-biopsie rénale reste la clé de voûte du diagnostic de néphropathie à BKPyV. Ce geste, invasif, est à risque de complications et doit être réservé à des cas bien particuliers : une virémie élevée > 4 log 10 copies/ml accompagnée d'une anomalie de la fonction rénale.

### 3.4.3 Histologie des néphropathies à BKPyV

Histologiquement, la néphropathie tubulo-interstitielle associée au BKPyV (BKPVN) se traduit par une atteinte tubulaire avec présence d'inclusions virales basophiles au niveau des noyaux des cellules tubulaires qui présentent un aspect en verre dépoli et une atteinte interstitielle avec présence d'un infiltrat inflammatoire mononucléé interstitiel [40] (**Figure 10**).

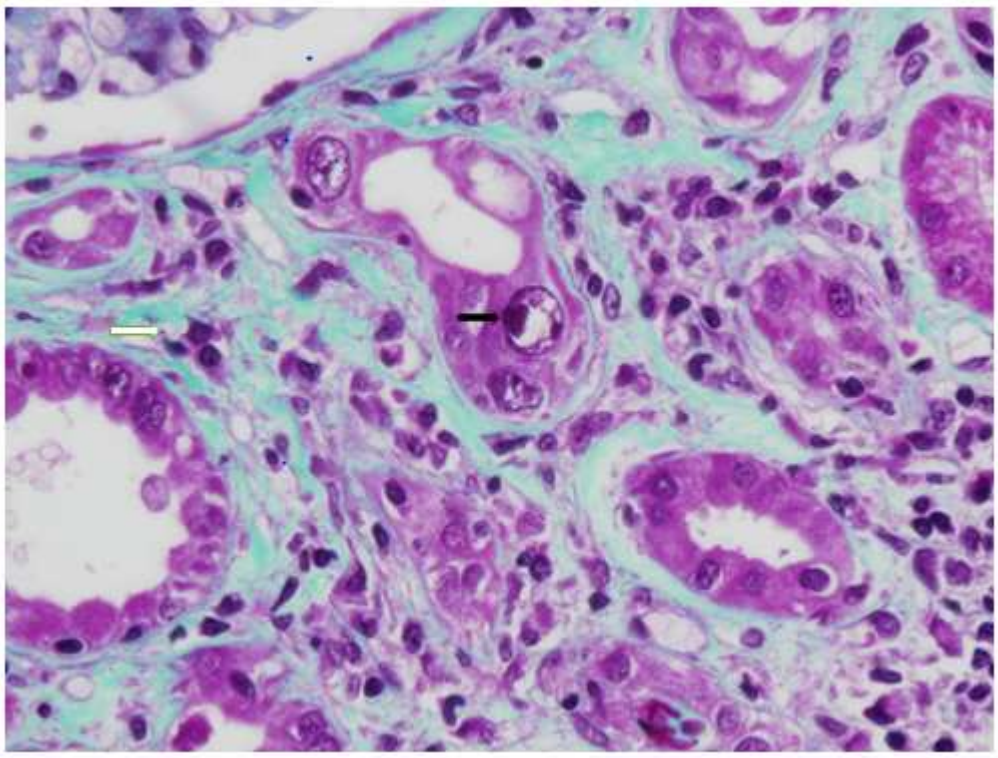

***Figure 10 : Aspect histologique de la néphropathie à BKPyV***

*Les noyaux des cellules tubulaires infectées (flèche noire) sont de grande taille, d'aspect en verre dépoli avec présence d'inclusion basophile. L'interstitium est le siège d'un infiltrat inflammatoire mononucléé (flèche blanche). (Cliché transmis par le Dr. Marie-Christine Machet-Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'hôpital Trousseau-CHRU de Tours.*

Le diagnostic de certitude de l'implication du BKPyV dans la pathologie est posé par une immunohistochimie réalisée avec un anticorps anti-LTAg du SV40, cross-réactif avec le LTAg du BKPyV.

### 3.4.4 Autres pathologies associées au BKPyV

Le BKPyV infectant l'urothélium, des atteintes spécifiques de ce revêtement sont également observées. Chez les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques, la symptomatologie est différente et se traduit par la survenue de cystite hémorragique. En effet, en plus d'une immunosuppression profonde, l'utilisation de molécules de chimiothérapie cytotoxiques pour les cellules urothéliales pourrait permettre au virus de se répliquer plus

facilement. De même, la réaction allo-immune lors d'une GVH pourrait également avoir un rôle pathogénique important [46].

Une autre manifestation consiste en des sténoses urétérales qui surviennent chez 3 % des patients transplantés rénaux dans l'année qui suit la transplantation [47]

Enfin, le pouvoir oncogène du BKPyV est encore débattu, mais plusieurs cas d'association entre le BKPyV et des tumeurs urologiques ont été rapportés chez des patients transplantés : carcinomes urothéliaux de vessie [48], carcinome rénal [49] et même des carcinomes de prostate dans une population non transplantée [50]. Néanmoins, l'intégration du génome du BKPyV dans les cellules tumorales reste un événement décrit mais extrêmement rare (un cas sur 268 patients atteints de carcinome urothélial de vessie, 0 cas sur 50 patients atteints de carcinome rénal à cellules claires, 0 cas sur 78 patients atteints de carcinome rénal papillaire et 0 cas sur 66 patients atteints de carcinome chromophobe [51])

Devant le manque de preuve suffisante, le BKPyV reste donc classé à ce jour « possiblement cancérigène pour l'homme » par l'IARC.

## 3.5 Complexe SMC5/6

Le complexe SMC5/6 (*Structural Maintenance of Chromosome*) est l'un des trois complexes SMC connu à ce jour chez les eucaryotes [52 53]. Il est composé d'un hétérodimère des protéines SMC5 et SMC6 associé à quatre protéines non SMC : NSMCE1, NSMCE2, NSMCE3, et NSMCE4 (**Figure 11**).

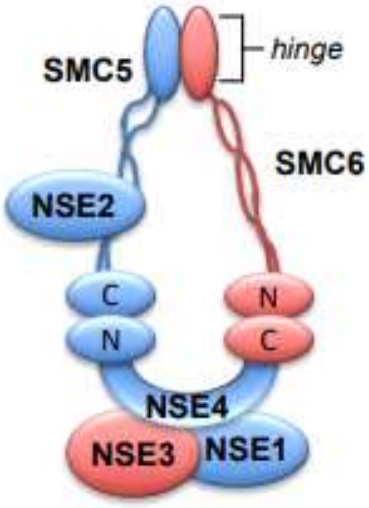


***Figure 11 : Organisation du complexe SMC5/6***

*Le complexe SMC5/6 est un composé de deux protéines SMC : SMC5 et SMC6 et de quatre protéines non SMC : NSMCE1, NSMCE2, NSMCE3 et NSMCE4 (orthologues humains des protéines NSE1-2-3-4 chez la levure). Les protéines SMC5 et SMC6 se connectent l'une à l'autre au niveau d'une région charnière (hinge) par leurs domaines N- et C- terminaux. Cette structure annulaire permet d'encercler l'ADN. La sous-unité NSMCE2 a une activité SUMO-ligase*[54].

Ce complexe a un rôle important dans la réplication, la ségrégation et la réparation des chromosomes [53]. Par ailleurs, plusieurs études ont montré son implication comme facteur limitant la réplication virale dans plusieurs modèles. Chez l'HPV-31 (*Human Papillomavirus* type 31), une déplétion de SMC6 et NSE1 induit une augmentation de la réplication virale. SMC6 interagit avec la protéine E2 et entre en compétition avec la protéine E1 [54]. Il a été montré que le complexe SMC5/6 était retrouvé au niveau du centre de réplication virale suggérant un rôle dans la réplication et la maintenance des épisomes [55]. Chez le virus de l'hépatite B (HBV), le complexe SMC5/6 est la cible d'HBx qui détourne l'E3 ubiquitine ligase DDB1 afin de dégrader le complexe SMC5/6 [56]. De plus, une déplétion du complexe SMC5/6 restaure la réplication d'un HBV ne codant plus HBx [57] apportant un argument supplémentaire sur le fait que le complexe SMC5/6 joue bien un rôle de limitation de la réplication chez ce virus. De plus, en entrainant la dégradation du complexe SMC5/6, HBx diminuerait la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, entrainant une

accumulation d'altérations génétiques conférant ainsi un pouvoir carcinogène à HBx [58]. Il a également été démontré que *via* une interaction avec PJA1, une autre ubiquitine-ligase, le complexe SMC5/6 serait un facteur limitant la réplication virale d'HSV-1 [59] .
Très récemment, une interaction entre SMC5/6 et HHV8 a également été démontrée. Là encore, la dégradation du complexe passe par un mécanisme d'ubiquitinylation *via* une interaction avec la protéine virale RTA.

Le complexe SMC5/6 interfère également avec le VIH-1. Le complexe SMC5/6 est recruté *via* la protéine SLF2 et vient alors contraindre et compacter la chromatine virale empêchant ainsi l'expression des gènes viraux (**Figure 12**).

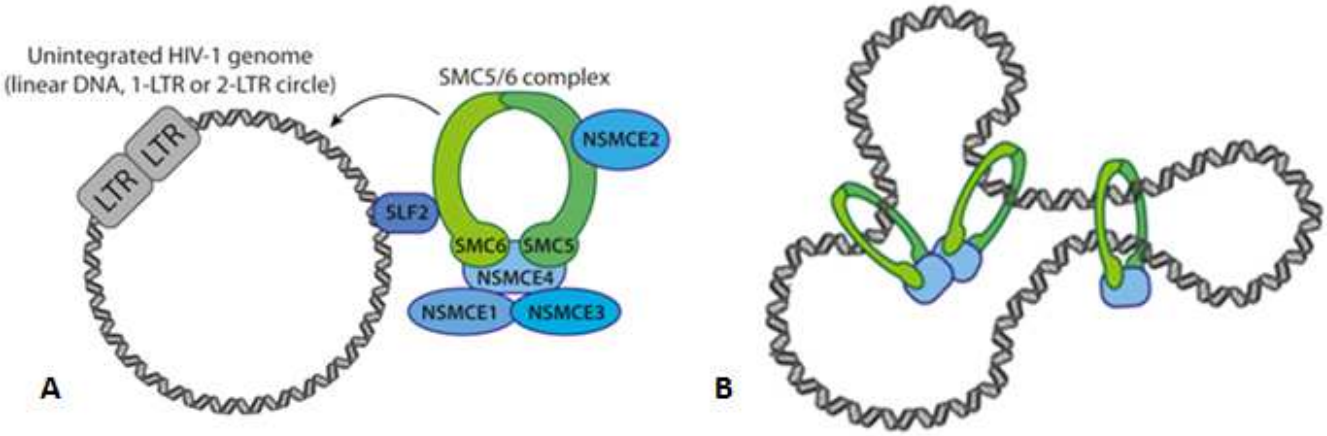


***Figure 12 :*** *Recrutement du complexe SMC5/6 à l'ADN non intégré du VIH-1 via la protéine SLF2 (A). Contrainte et compaction de l'ADN viral par le complexe SMC5/6 (B) (d'après Dupont et al.)*[60]

Pour contourner ce mécanisme, la protéine Vpr du VIH entraine une dégradation de SFL2 empêchant ainsi le recrutement du complexe SMC5/6 [60].

Enfin, en dehors de son rôle de facteur limitant la réplication virale, le complexe SMC5/6 pourrait présenter un rôle important en oncologie. En effet, une étude récente invite à considérer le gène SMC5 comme un gène suppresseur de tumeur. Les auteurs ont montré que chez des patients atteints de cancer colorectal (CCR), une diminution d'expression de SMC5 était associée à un moins bon pronostic [61]. Par ailleurs, la surexpression de SMC5 dans des lignées cellulaires de CCR diminue la prolifération cellulaire. Dans ce même article, il est même suggéré d'adapter le traitement en fonction du niveau d'expression de SMC5. Associer l'Oxaloplatine au Raltitrexed pourrait être en effet plus bénéfique que l'Oxalopatine seul.

## 3.6 Objectifs

Le premier objectif de ce travail est fondamental et consiste à mettre en évidence des facteurs pouvant limiter la réplication virale du BKPyV à des fins soit de connaissance générale sur l'interaction virus-cellule ou pour la thérapie. Pour ce faire, nous avons exploité des données d'interactomique entre l'LTAg et le protéome cellulaire. Cette étude, réalisée préalablement à ce travail, a permis, entre autres, de montrer que les protéines du complexe SMC5/6 interagissent avec le LTAg. Ce complexe, ayant déjà montré son rôle dans la réplication d'autres virus (HBV, HPV, HIV, HSV, HHV-8), nous avons évalué l'impact du BKPyV sur l'expression de ce complexe *in vitro* dans des cellules Vero ainsi qu'*in vivo* au cours de la néphropathie chez l'Homme.

Un objectif secondaire de ce travail était d'évaluer l'utilisation d'un anticorps anti-LTAg du BKPyV sur du matériel de biopsie rénale de patient et de comparer sa capacité à mettre en évidence une infection par le BKPyV à celle de l'anticorps utilisé en pratique courante, ce dernier étant parfois négatif alors que les patients présentent une virémie positive et des aspects histologique de néphropathie à BKPyV.

# 4.MATERIELS ET METHODES

## 4.1 Lignée cellulaire

La lignée cellulaire utilisée est la lignée Vero (CCL-81). Ces cellules de rein de singe vert sont cultivées en EMEM (*Eagle's Minimal Essential Medium*) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher) 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco) et 1% de L-Glutamine (Gibco) dans une étuve à 37°C avec 5% de $C0_2$ en atmosphère humide. Le passage des

cellules est réalisé 3 fois par semaine. Les cellules cultivées en F75 sont lavées avec du DPBS (Gibco) puis 3 ml de trypsine sont ajoutés. La flasque est incubée pendant 3 minutes à 37°C puis du milieu complet est ajouté pour arrêter l'effet de la tryspine. Puis, la suspension est centrifugée 5 minutes à 300 g. Le culot cellulaire est ensuite repris dans du milieu EMEM complet dans un volume adapté au culot. Puis les cellules sont remises en cultures en F75.

## 4.2 Production et titration du stock viral

Les cellules Vero sont mises en culture en F75 à $2.10^6$ cellules/ flasque pendant 24 h puis sont infectées avec 3 mL d'un stock viral de BKPyV de souche Dunlop ayant un titre viral de $1.10^6$ FFU/ml fourni par l'équipe AGIR de l'Université d'Amiens puis remis à l'incubateur à 37°C. Lorsque les cellules arrivent à confluence, celles-ci sont trypsinées et utilisées pour préparer de nouvelles flasques F75. L'opération est ainsi répétée jusqu'à l'obtention du volume de stock viral souhaité. La surface des flasques est ensuite grattée afin de récupérer les cellules adhérentes. Puis, le surnageant est récupéré, mis dans un tube à centrifuger de 50 ml auquel 0,1 volume de chloroforme est ajouté puis centrifugé 10 minutes à 300 g. Le surnageant est ensuite filtré (0,45 µm) et le filtrat est stocké à 4°C.

Afin de connaitre le titre en particules virales infectieuses du stock obtenu, des cellules Vero sont mises en culture en P96 à raison de $10^4$ cellules/puits dans 100 µL de milieu et infectées avec différentes dilutions du stock viral (100 µl/puits en octoplicats). Après 72h d'infection, un marquage en immunofluorescence est réalisé.

Dans un premier temps, les cellules sont lavées avec 100 µL de PBS, puis incubées 10 minutes avec 50 µL de paraformaldéhyde à 2% (PFA) en PBS. La solution de PFA-PBS est retirée puis les cellules sont incubées 15 min avec 50 µL de PBS 0,5X –Triton X100 0,5%. Puis, les cellules sont lavées 3 fois avec 100 µL de PBS. L'anticorps primaire est un anticorps murin développé au laboratoire dirigé contre l'LTAg du BKPyV (clone 8B4). Les cellules sont incubées 1 h à température ambiante avec 50 µL d'anticorps primaire dilué au 1/10 dans du PBS-Tween 0,05%. Après 3 lavages avec 100 µL de PBS, les cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière avec 50 µL de solution contenant du DAPI (Invitrogen) à 1 µg/ml dans du PBS-Tween 0,05% et l'anticorps secondaire anti-souris IgG (H+L) Alexa Fluor 594 *goat* (Thermofischer Scientific) dilué au 1/1000 dans du PBS-Tween 0,05%.

La lecture est réalisée sur un microscope à fluorescence (Olympus IX73). Des images sont acquises au format VSI puis analysées grâce au logiciel ImageJ pour lequel un module de macro déjà publié (Handala *et al.* 2019) est modifié pour pouvoir analyser des images au

format VSI (Dr. Côme Pasqualin, STIM, UFR Pharmacie Tours). Ce module compte le nombre de noyaux marqués par le DAPI, le nombre de noyaux marqués par l'anticorps primaire correspondant aux noyaux des cellules infectées exprimant le LTAg , puis superpose les deux images. Quand un noyau est à la fois marqué par le DAPI et l'anticorps primaire, il est considéré comme noyau d'une cellule infectée. Si un marquage par l'anticorps primaire n'est pas superposable à un noyau marqué au DAPI alors celui-ci est considéré comme un marquage non spécifique et n'est pas pris en compte. Une cellule infectée correspondant à une particule virale initiale, la concentration virale est déduite ou calculée par la formule suivante : $\frac{\%\ Cellules\ infectée * nombre\ de\ cellule\ pour\ un\ puit * facteur\ de\ dilution}{volume(ml)}$

Ce calcul est réalisé pour chaque dilution et une moyenne entre chaque condition est ensuite réalisée donnant alors la concentration virale du stock exprimée en FFU/ml (*Focus Forming Unit*/ml).

## 4.3 Mise en évidence des protéines par Immuno-empreinte

Le gel d'électrophorèse de polyacrylamide en condition dénaturante ou SDS-PAGE est composé d'un gel de séparation à 10% (Tris-HCl 0,56 M pH 8,8, acrylamide-bis acrylamide 10%, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 0,1%, Temed 0,5%) et d'un gel de concentration à 5% (Tris-HCL 0,125 M pH 6,8, acrylamide-bis acrylamide 5%, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 0,1%, Temed 0,1%). Les protéines sont diluées dans du tampon de charge 2X (Tris-HCl pH 6,8 100 mM, SDS 4%, β-mercaptoéthanol 1%, bleu de bromophénol 0,2%, glycérol 20%), puis dénaturées par chauffage durant 10 min à 95°C, avant d'être séparées dans le gel sous 120 V pendant 1 heure. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose par électro-transfert (*IBlot Gel transfert system*, Invitrogen). La membrane est ensuite saturée pendant 1 heure sous agitation dans du tampon TBST (15 mM Tris-HCl pH 8, 140 mM NaCl, 0,05% de Tween 20) contenant 5% de lait écrémé. La membrane est incubée 1 h sous agitation avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon de TBST-1% de lait écrémé. Les anticorps primaires sont : un anticorps souris anti-SMC5 humain dilué au 1/50$^{ème}$ (*Mouse monoclonal IgG2a kappa anti-SMC5*, 393282, Santa Cruz Biotechnology), et un anticorps souris anti-SMC6 humain (*Mouse monoclonal IgG1 kappa anti-SMC6*, 365742 Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/100$^{ème}$. Après trois lavages de 5 minutes dans du TBST avec 1% de lait écrémé, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire : anticorps polyclonal de lapin anti-IgG de souris couplé à l'*horseradish*

*peroxidase* (HRP) (0260, Dako) dilué au 1/1000$^{ème}$ dans du TBST-lait 1% écrémé pendant 1 h sous agitation. Avant l'étape de révélation, la membrane est lavée trois fois 5 minutes dans du tampon TBST avec 1% de lait écrémé, le dernier lavage étant réalisé en TBST seul. La révélation est effectuée en déposant un substrat chimioluminescent de l'HRP (ThermoFisher Scientific) engendrant une réaction enzymatique avec la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire. Cette réaction est détectée par l'Imageur iBright750 (ThermoFisher).

## 4.4 Transfection, inclusion des cellules en paraffine et immuno-histochimie

Les cellules Vero sont mises en culture dans des plaques de 6 puits (P6, TPP, Dutscher) à raison de $3.10^5$ cellules/puits pendant 24 h puis transfectées avec 4,5 µg du plasmide pIRES-BK LTAg/stAg, 13 µg de polyéthylène imine (PEI) et 650 µL de milieu EMEM non complémenté (MNC). Le mélange ADN-PEI est incubé 30 minutes à température ambiante puis est déposé sur les cellules. Après 4h d'incubation à 37°C, du milieu EMEM complet est ajouté et les cellules sont remises en incubateur à 37°C pendant 48 h.

Puis, l'expression du LTAg par les cellules Vero transfectées LTAg/stAg a été évaluée par immunohistochimie. Les cellules ont été fixées 30 minutes à température ambiante dans de l'AFA (Alcool Formolé Acétique). Ce fixateur a été retenu pour reproduire les conditions de fixation des biopsies rénales de patients. Puis, les cellules sont incluses dans un cylindre d'agar à 1,5% et l'ensemble est fixé dans l'AFA pendant 4 h. Puis, les cylindres sont inclus en paraffine et des coupes de 4 µm sont réalisées. Pour la réalisation de l'immunohistochimie, les coupes sont ensuite déparaffinées et réhydratées avant d'être soumises à une étape de démasquage antigénique, réalisée en tampon citrate (10 mM, pH 6) pendant 20 minutes à 121°C. Les peroxydases endogènes sont ensuite inhibées avec du méthanol contenant 1% d'$H_2O_2$ pendant 30 min à température ambiante. Les sites d'interactions non spécifiques des anticorps sont bloqués avec du PBS contenant 20% de sérum de chèvre et 30% de SVF, pendant 45 min à température ambiante. L'anticorps primaire anti-LTAg 8B4 est déposé dilué au 1/10, 1/20 et 1/50 dans du PBS supplémenté avec 15% de sérum de chèvre et 15% SVF puis incubé la nuit à 4°C en chambre humide. L'anticorps secondaire (polymère *N-histofine SimpleStain Max PO (Mouse)*, Nichirei Biosciences) conjugué à l'HRP, dilué avec 15% de sérum de chèvre et 15% de SVF, est incubé 30 min en chambre humide, à température ambiante. L'activité HRP est révélée par l'ajout du DAB (3,3'-diaminobenzidine, Quanto) qui permet, après 10 minutes d'incubation en chambre humide, la formation d'un précipité brun.

Une contre-coloration des noyaux en bleu est ensuite réalisée avec l'hématoxyline de Harris (Diapath)**.** Enfin, les lames sont déshydratées par des bains d'alcool successifs à concentration croissante, puis dans du xylène avant d'être montées en résine Eukitt.

## 4.5 Sélection des patients, matériel de biopsie rénale et immuno-histochimie anti-SMC5

Les seize biopsies analysées sont issues de quinze patients suivis au CHRU de Tours par le service de Néphrologie et pour lesquels une néphropathie à BKPyV était très fortement suspectée, ce qui a conduit à la réalisation d'une ponction-biopsie rénale. Ces patients étaient tous transplantés rénaux à l'exception d'un seul pour lequel il s'agissait d'une biopsie de rein natif **(Tableau 2)**. Une quantification de la virémie avait également été réalisée le jour même de la biopsie ou quelques jours avant ou après celle-ci. Le seuil de détection pour la virémie sanguine est de 2,3 log10 copies /ml. Un dosage de la créatininémie sanguine avait également été réalisé.

Parmi ces patients, un patient a eu deux biopsies réalisées à trois mois d'intervalle (patient n°8) .

***Tableau 2 : Caractéristiques des patients inclus dans la cohorte***

*Le patient 11 n'était pas transplanté rénal et a bénéficié d'une biopsie de rein natif (*)*

*Le seuil de détection pour la virémie sanguine est de 2,3 log10 copies /ml*

| N° Patient | N° Biopsie | Sexe | Age (années) | Délai greffe /biopsie (mois) | Néphropathie initiale | Virémie sanguine (log 10 copies/ml) | Créatininémie (µmol/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 1 | F | 61,7 | 139,4 | Syndrome d'Alport | Indétectable | 200 |
| **2** | 2 | M | 73,8 | 37 | Indeterminée | 6,71 | 208 |
| **3** | 3 | M | 68,6 | 2,1 | Diabète | 5,13 | 175 |
| **4** | 4 | F | 75,9 | 3,3 | Indeterminée | 4,05 | 180 |
| **5** | 5 | F | 43,1 | 50,7 | Néphropathie à IgA | Indétectable | 210 |
| **6** | 6 | F | 39,3 | 25,1 | Indeterminée | 3,81 | 97 |
| **7** | 7 | M | 50,8 | 12,4 | Diabète | 3,09 | 132 |
| **8** | 8 | M | 70,3 | 9,3 | Indeterminée | 5,5 | 255 |
| **8** | 9 | M | 70 | 6,6 | Indeterminée | 3,49 | 180 |
| **9** | 10 | M | 39,2 | 3,3 | Indeterminée | 4,97 | 142 |
| **10** | 11 | F | 65,2 | 76,6 | Polykystose hépato-rénale | 4,87 | 123 |
| **11** | 12 | M | 66,5 | * | * | Indétectable | 212 |
| **12** | 13 | M | 72,2 | 27,6 | Néphroangiosclérose | Indétectable | 127 |
| **13** | 14 | M | 75,1 | 3,2 | Indeterminée | 2,72 | 143 |
| **14** | 15 | M | 78,8 | 13,4 | Néphroangiosclérose | 2,47 | 593 |
| **15** | 16 | M | 80,1 | 2 | Indeterminée | 2,96 | 121 |

Un patient indemne de toute néphropathie à BKPyV a été sélectionné comme témoin. Il s'agissait d'un homme de 21 ans atteint de lésion glomérulaire minime (LGM), pathologie rénale se traduisant par une atteinte glomérulaire avec un effacement des pédicelles visible uniquement en microscopie électronique. Il n'y a donc aucune atteinte des cellules tubulaires rénales ou de l'interstitium ce qui en fait un témoin négatif de choix pour l'étude d'une néphropathie tubulo-interstitielle.

Les biopsies rénales ont été fixées en AFA pendant une durée minimale de 4 h, puis incluses en paraffine. Des coupes de 4 µm ont ensuite été réalisées. Les coupes ont été soumises à un protocole d'immunohistochimie identique à celui précédemment décrit pour les cellules Vero avec une étape de démasquage antigénique de 30 minutes au lieu de 20.
L'anticorps primaire anti-SMC5 (polyclonal lapin, HPA054900, Sigma) est déposé sur la lame dilué au 1/100, suivi de l'anticorps secondaire couplé à l'HRP, (polymère *N-histofine SimpleStain Max PO (Rabbit)* Nichirei Biosciences) et révélé par l'ajout de DAB.
Une contre-coloration des noyaux en bleu est ensuite réalisée avec l'hématoxyline de Harris (Diapath).

## 4.6 Interprétation de l'immuno-histochimie anti-SMC5 et tests statistiques

Une quantification de l'expression nucléaire physiologique de SMC5 a été élaborée à partir du cas témoin et des données de l'*Human Protein Atlas* avec un système à 3 catégories :

- 3+ correspondant à >75% d'expression physiologique
- 2+ correspondant à une expression physiologique comprise entre 25 et 75%
- 1+ correspondant à <25% d'expression physiologique

Le marquage a été lu en triple aveugle à la fois par deux néphropathologistes expérimentées (le Dr. Marie-Christine Machet et le Dr. Elodie Standley-Miquelestorena) et un pathologiste junior (William Pouillot). Les cas discordants ont été relus collégialement.

Les virémies et créatininémies moyennes associées aux trois groupes d'expression de SMC5 ont ensuite été calculées et un test de Kruskall-Wallis a été réalisé.

# 5.RESULTATS

## 5.1 Identification de facteurs limitant la réplication virale

### 5.1.1 Intéractomique proximale du LTAg

Des travaux d'interactomique proximale ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Etienne Coyaud (Inserm Prism, Lille). Ces travaux avaient pour objectif d'identifier des protéines cellulaires interagissant avec le LTAg et le stAg du BKPyV. Ces travaux reposaient sur la fusion de la biotine transférase BirA avec les protéines virales. Lorsqu'il y a interaction entre l'LTAg et la protéine cellulaire, BirA catalyse le transfert d'une ou plusieurs biotines sur la protéine ciblée. Les protéines biotinylées *in cellulo* sont purifiées par affinité avec la streptavidine puis sont analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines partenaires (**Figure 13**).

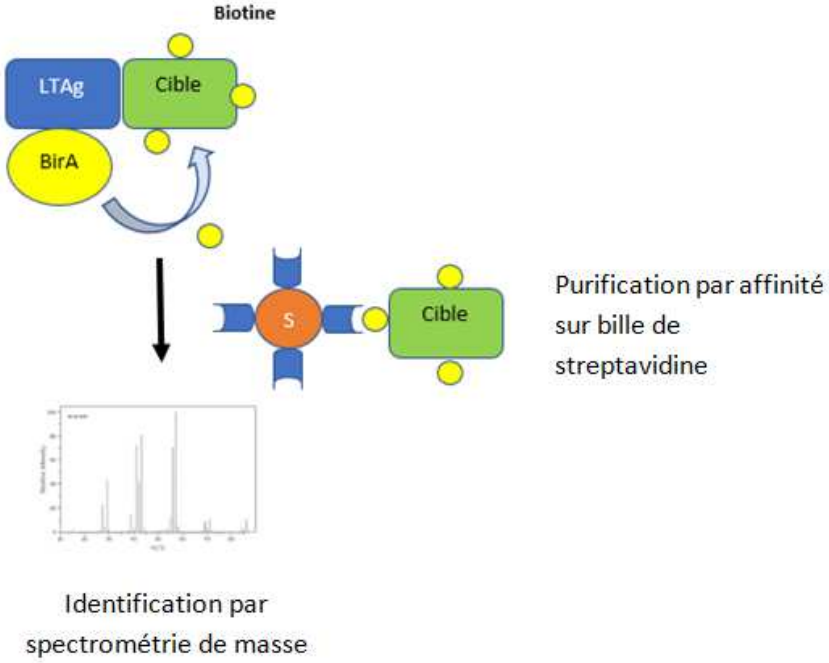


***Figure 13 : Principe d'intéractomique proximale pour l'identification de partenaires intéragissant avec le LTAg du BKPyV*** *. Le LTAg est fusionné avec la biotine transférase BirA. Lorsqu'il y a intéraction entre le LTAg et une cible, cette dernière est biotinylée par BirA. Cette cible est ensuite purifiée par affinité sur streptavidine puis identifiée par spectrométrie de masse.*

Parmi le grand nombre de partenaires identifiés (N=110 protéines), des protéines connues comme interagissant avec le LTAg étaient retrouvées : p53, pRb, DNA polymérase alpha, RPA) mais également les protéines du complexe SMC5/6 : SMC5, SMC6, NSE1, NSE3, NSE4. Au vu des données de la littérature sur le rôle dans plusieurs modèles viraux (cf introduction), le complexe SMC5/6 est apparu comme un candidat intéressant à étudier dans le modèle du BKPyV.

### 5.1.2 Expression du complexe SMC5/6 dans les cellules Vero

Afin de valider l'expression des protéines SMC5 et SMC6 dans des cellules d'origine rénale, les protéines ont été recherchées par immuno-empreinte dans les cellules Vero (**Figure 14**).

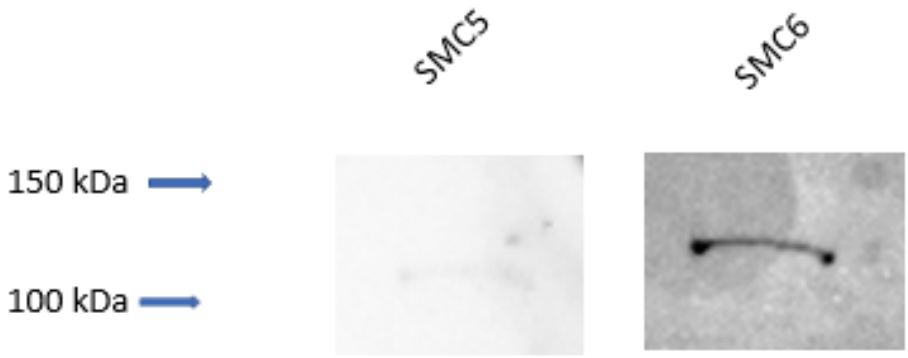


***Figure 14 : Expression des protéines SMC5 et SMC6 par les cellules Vero non infectées***
*Anticorps anti-SMC6 dilué au 1/100 et anticorps anti-SMC5 dilué au 1/50. L'expression de SMC5 est difficilement mise en évidence malgré une forte concentration de l'anticorps.*

La dilution des anticorps au 1/100 est optimale pour mettre en évidence la protéine SMC6 avec l'observation d'une bande à 135 kDa correspondant à la taille attendue pour cette protéine. En ce qui concerne, SMC5, malgré l'utilisation des conditions recommandées par le fournisseur de l'anticorps anti-SMC5, une très faible expression de la protéine a pu être mise en évidence.

### 5.1.3 Impact du BKPyV sur l'expression du complexe SMC5/6

Après 72 h d'infection de cellules Vero par le virus BK à une MOI de 1, l'expression de SMC6 a été évaluée par immuno-empreinte **(Figure 15)**.

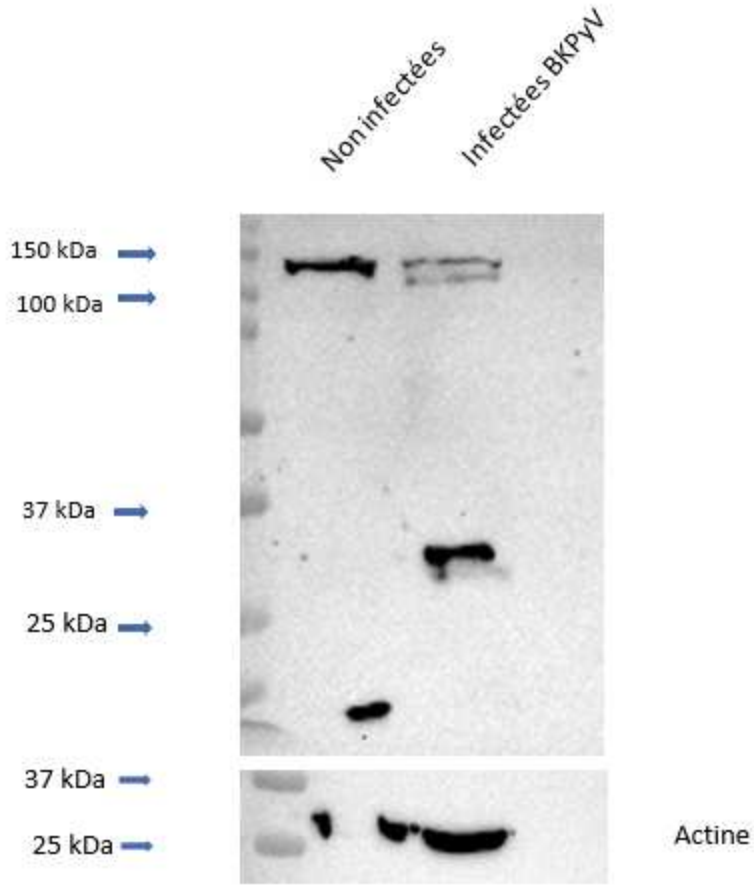


***Figure 15 : Expression de SMC6 dans les cellules Vero infectées par le BKPyV.*** *Une bande à 135 kDa est retrouvée à la taille attendue de SMC6 dans les cellules non-infectées. Pour les cellules infectées avec le virus BK, cette bande présente une intensité réduite. Dans cette condition, deux bandes supplémentaires sont observées, l'une d'une masse moléculaire réduite d'une dizaine de kDa et une seconde bande à environ 35 kDa. Ces deux bandes surnuméraires peuvent être des produits de dégradation de SMC6.*

Des cellules Vero non infectées ont été utilisées comme contrôle. Dans ces conditions, l'expression de SMC6 est confirmée dans les cellules Vero et de manière intéressante, une réduction de la présence de SMC6 est observée dans les cellules infectées. Dans cette condition, une bande à une masse moléculaire d'environ 125 kDa et une bande d'environ 35 kDa sont observées alors qu'elles sont absentes des cellules non infectées. Cette évaluation a été réalisée en duplicat et après normalisation sur l'actine il s'avère que la diminution moyenne observée de SMC6 dans le groupe des cellules infectées est de 55% par rapport aux cellules non infectées.

### 5.1.4 Impact de l'expression des protéines précoces sur le complexe SMC5/6

Afin de montrer que la réduction de la présence de SMC6 était liée à l'expression des protéines précoces du BKPyV, des cellules Vero ont été transfectées avec le plasmide pIRES-LTAg/stAg codant le LTAg et le stAg du BKPyV. Après 72h de transfection, l'expression de SMC6 a été évaluée par immunoempreinte**.** Des cellules Vero non transfectées ont été utilisées comme contrôle **(Figure 16).**

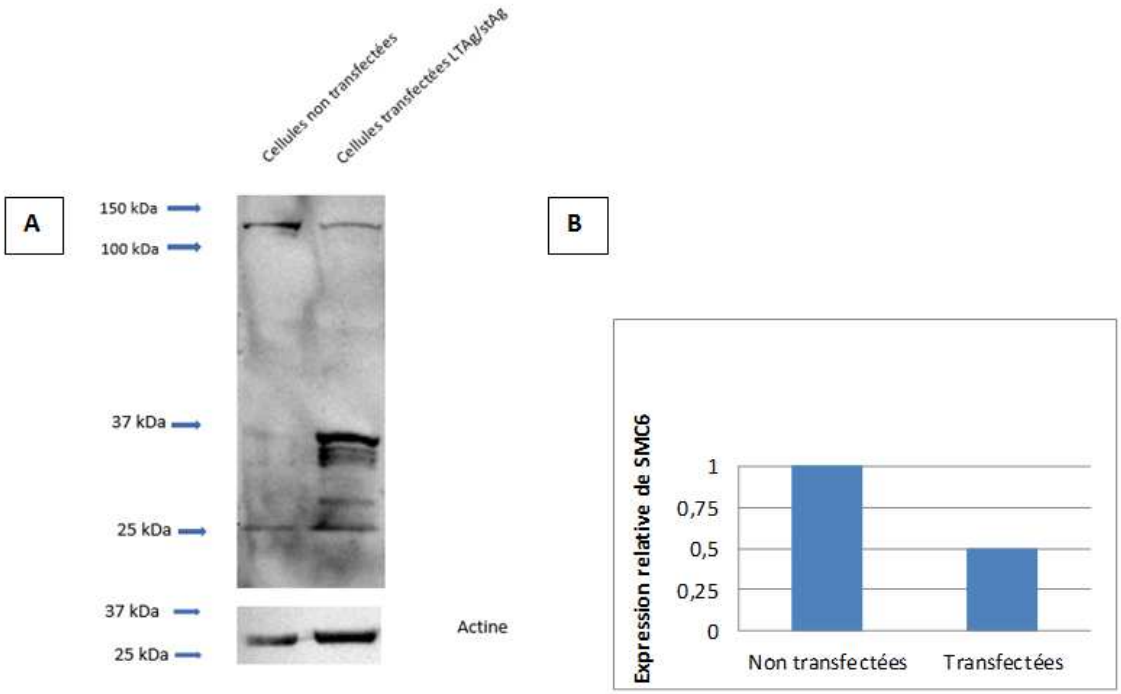


***Figure 16 : Expression de SMC6 dans les cellules Vero non transfectées et transfectées avec le plasmide LTAg/stAg. A : Immuno-empreinte.*** *Une bande à 135 kDa est retrouvée correspondant à la masse attendue de SMC6. Cette bande est moins intense dans le groupe cellules transfectées. Plusieurs bandes de taille comprises entre 35 kDa et 30 kDa sont présentes dans la piste correspondant aux cellules transfectées pouvant correspondre à des produits de dégradation.* ***B. Expression relative de SMC6.*** *L'expression a été rapportée à celle des cellules non transfectées. Une diminution de 50% de l'expression de SMC6 est observée pour les cellules transfectées comparées aux cellules non transfectées.*

Comme pour l'infection, une réduction de la présence de SMC6 est observée dans les cellules Vero exprimant les protéines précoces du BKPyV. Après normalisation avec l'actine la diminution observée pour SMC6 est de 50% **(Figure 16).** Tout comme dans les conditions de l'infection, des protéines immunoréactives sont observées aux environ de 35 kDa. Il est par ailleurs à noter que certaines de ces bandes sont visualisées mais de façon beaucoup moins intense dans les cellules Vero non transfectées.

## 5.2 Evaluation de l'effet *in* vivo de l'infection du BKPyV sur l'expression de SMC5/6 à partir de matériel de biopsie rénale.

### 5.2.1 Evaluation de l'expression de SMC5 en immuno-histochimie sur les biopsies rénales

Dans un premier temps, l'expression physiologique de SMC5 par étude immuno-histochimique a été évaluée chez un patient atteint de LGM . Chez ce patient, un marquage intense et homogène de SMC5 par la quasi-totalité des noyaux des cellules tubulaires est observé (**Figure 17**).

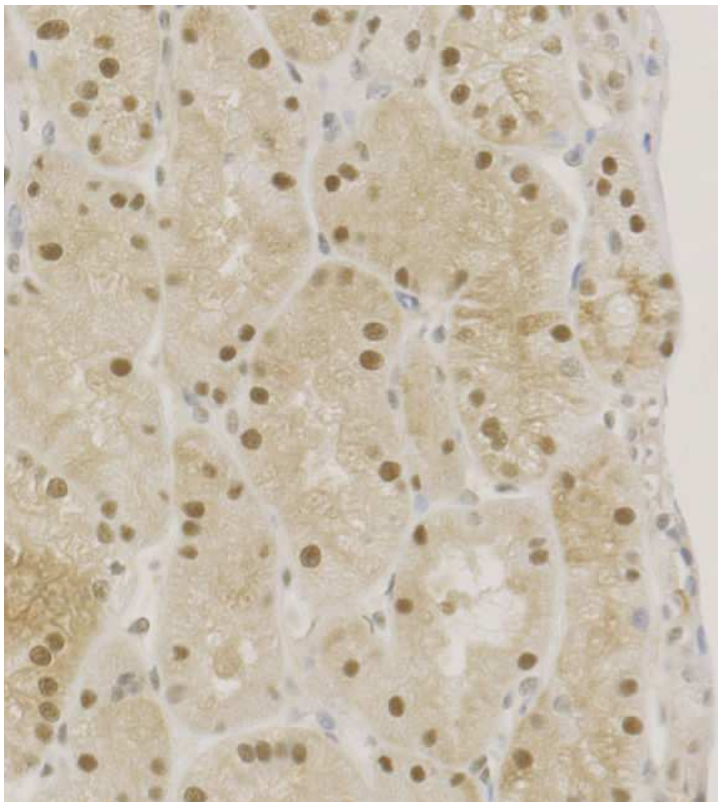

***Figure 17** : Expression de SMC5 en immunohistochimie chez un patient indemne de néphropathie à BKPyV microscope optique grossissement x200*

L'expression de SMC6 a été également évaluée mais l'interprétation de l'immunohistochimie étant complexifiée par la présence d'un marquage cytoplasmique intense, celle-ci n'a pas pu être exploitée.

Afin d'évaluer le plus objectivement possible l'expression de SMC5 dans les noyaux des cellules tubulaires, un système d'évaluation à 3 catégories a été mis au point : 3+ correspondant à un marquage normal de plus de 75% des noyaux des cellules tubulaires et donc très proche de l'expression physiologique basale, un groupe 2+ avec une expression comprise entre 25 et 75% de l'expression physiologique basale et un groupe 1+ avec une expression inférieure à 25% .
Des exemples de ces différents scores sont illustrés dans la **Figure 18.**

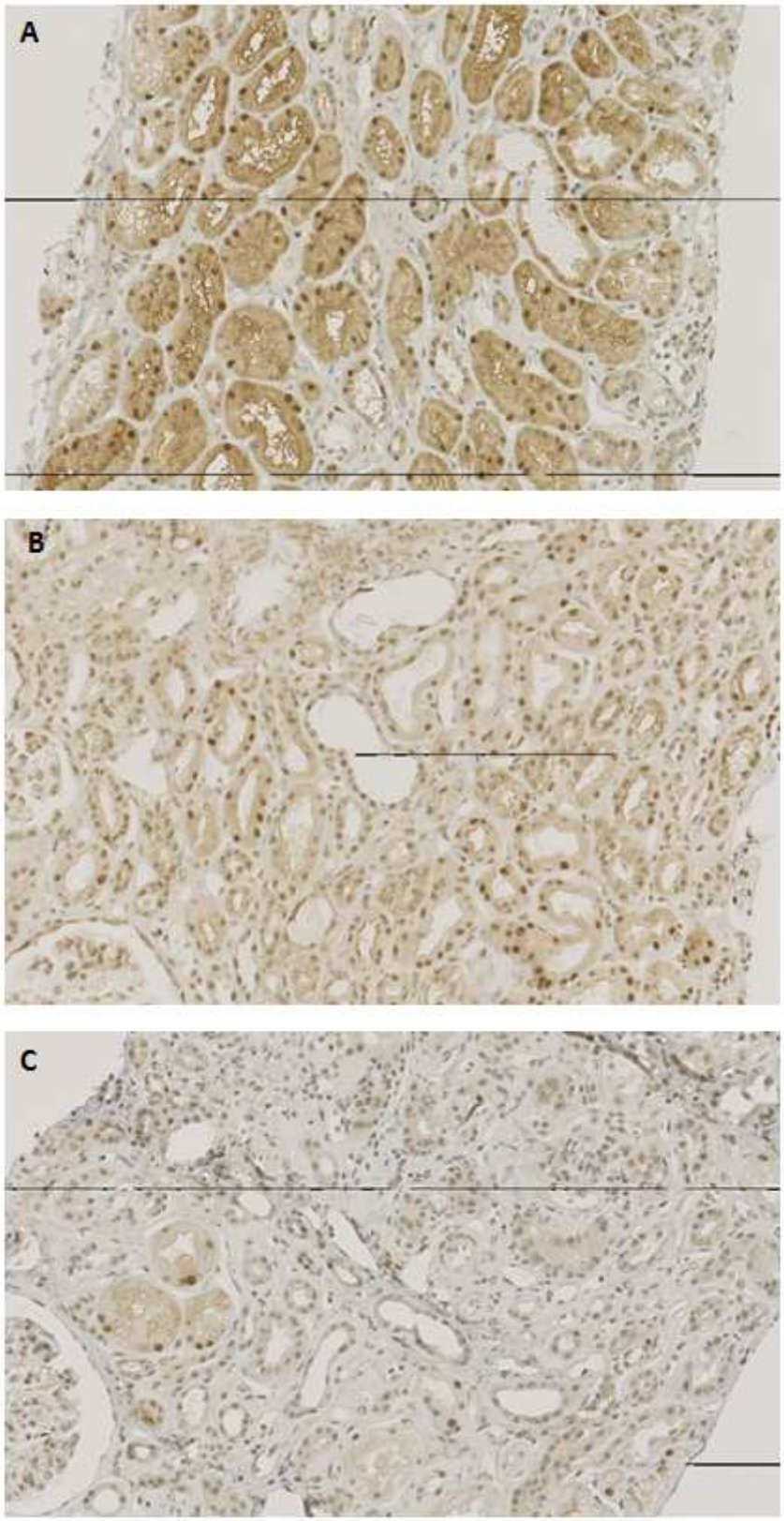


***Figure 18 :*** *Exemples des scores d'expression de SMC5 : 3+(A), 2+ (B), 1+ (C) microscope optique grossissement x200*

Une perte d'expression complète n'était jamais observée mais simplement une diminution de l'expression de SMC5.

Le groupes 3+ comportait 3 cas, le groupes 2+ 9 cas et le groupe 1+ 4 cas. La moyenne des virémies des groupes obtenus étaient les suivantes : 3+ 2,017 log10 copies/ml , 2+ 3,032 log10 copies/ml , 1+ 4,108 log10 copies/ml .

Les différences observées n'étaient pas statistiquement significatives (p=0.4587) (**Figure 19.A**).

De même, lorsque les virémies étaient corrélées au niveau d'expression de SMC5, une tendance était visualisée : plus la virémie était élevée, plus le niveau d'expression de SMC5 semblait faible ($R^2$=0.1087) (**Figure 19.B**).

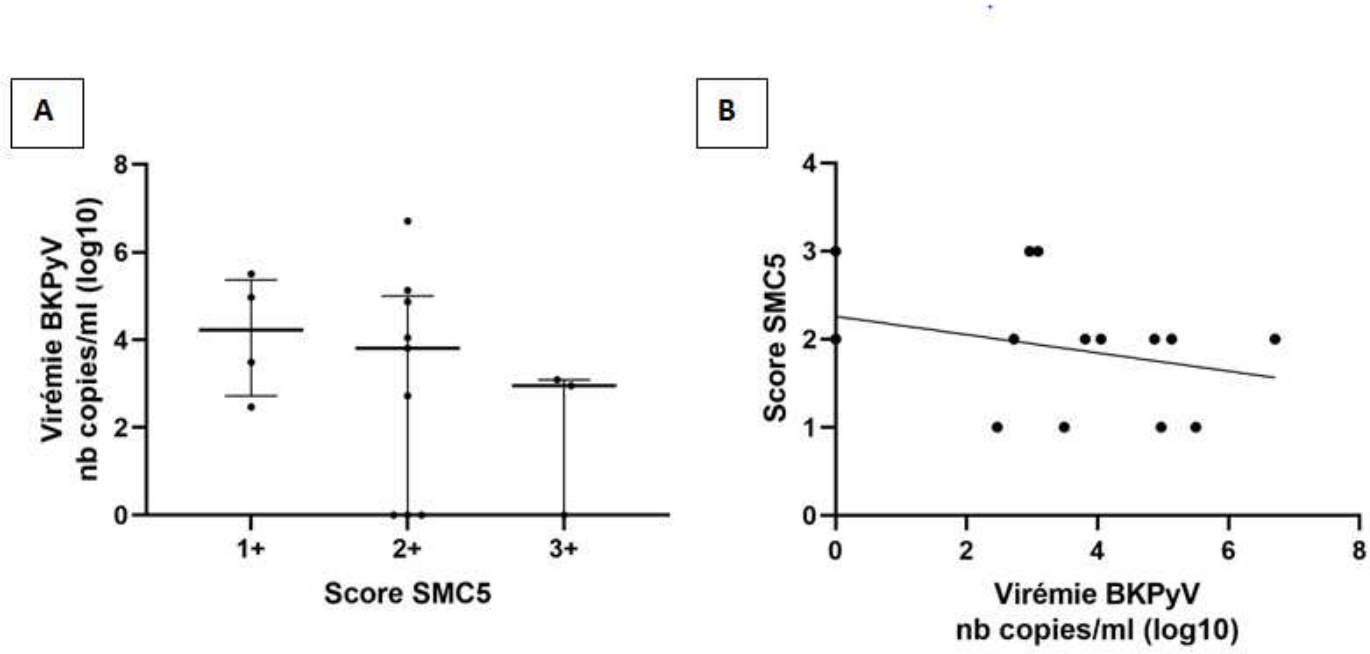


***Figure 19*** *Représentation graphique des moyennes des virémies en fonction du score d'expression de SMC5 (p=0.4587) (A) et de la corrélation entre la virémie et le score d'expression de SMC5 (R2=0,1087) (B).*

Les groupes 2+ et 3+ ont été fusionnés et la virémie moyenne de ces deux groupes fusionnés était de 2,97 log10 copies/ml. La différence avec le groupe 1+ (4,108 log10 copies/ml) n'était cependant pas statistiquement significative (p=0,33).

Les créatininémies moyennes au moment de la ponction-biopsie rénale des patients des différents groupes ont aussi été comparées. Les résultats étaient les suivants : 3+ 155µmol/L, 2+, 162,6 µmol/L et 1+ 292,5 µmol/L. La différence entre ces moyennes n'était pas statistiquement significatives (p=0,31) (Figure 20.A)

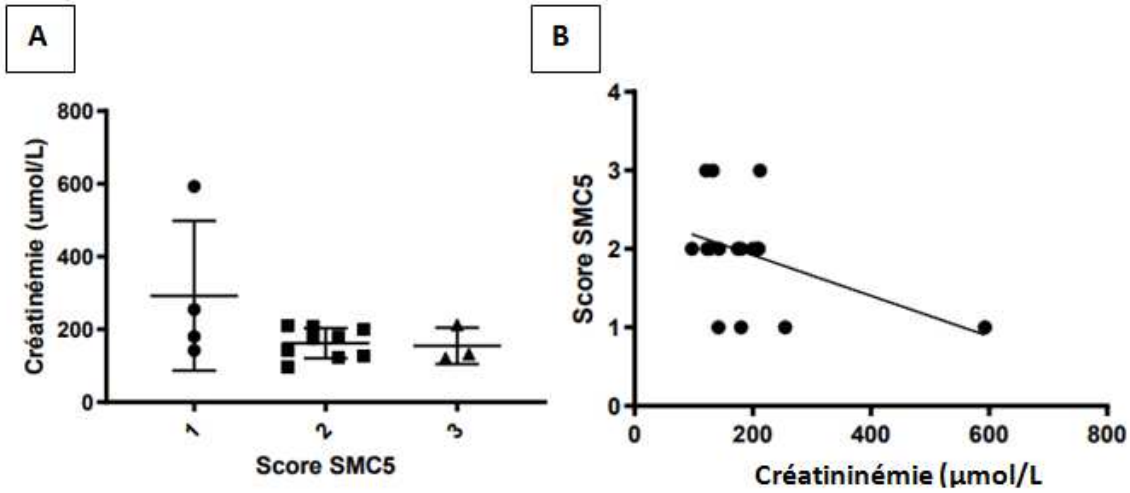


***Figure 20.*** *Représentation graphique des moyennes des créatininémies en fonction du score d'expression de SMC5 (p=0.31) (A) et de la corrélation entre la créatininémie et le score d'expression de SMC5 (R2=0,1905)(B).*

Lorsque les créatininémies étaient corrélées au niveau d'expression de SMC5, une tendance était également visualisée : plus la créatininémie était élevée, plus le niveau d'expression de SMC5 semblait faible ($R^2$=0.1905)

Les groupes 2+ et 3+ ont été fusionnés et la créatininémie moyenne de ces deux groupes fusionnés était de 160,7 µmol/L. La différence avec le groupe 1+ (292,5 µmol/L) n'était également pas statistiquement significative (p=0,12).

### 5.2.2 Evaluation d'un anticorps anti-LTAg du BKPyV en immuno-histochimie

En pratique courante, le diagnostic de néphropathie à BKPyV est porté par un faisceau d'argument comprenant une positivité de la virémie dans le sang du patient, la présence d'une néphropathie tubulo-interstitielle accompagnée d'un effet cytopathogène sur la biopsie rénale et la mise en évidence du BKPyV en immuno-histochimie par détection du LTAg par un anticorps commercial dirigé contre le LTAg du SV40 et croisant avec le LTAg du BKPyV. Dans certains cas, ce marquage immuno-histochimique s'avère négatif alors que les autres arguments précédemment décrits sont retrouvés.

Afin de disposer d'un outil diagnostique efficace, nous avons donc voulu évaluer un anticorps anti-LTAg du BKPyV (clone 8B4) disponible au laboratoire et ayant montré son efficacité en immmuno-empreinte et en immunofluorescence.

Dans un premier temps, nous avons transfecté des cellules Vero avec un plasmide codant le LTAg/stAg du BKPyV. Ces dernières ont été fixées dans de l'AFA pour se rapprocher le plus possible des conditions de fixations des ponctions biopsies rénales en pratique courante.

Le marquage avec notre anticorps a été comparé à celui de l'anticorps commercial et celui-ci s'est avéré très satisfaisant avec un marquage nucléaire intense et sans marquage cytoplasmique comme observé avec l'anticorps commercial (**Figure 21**).

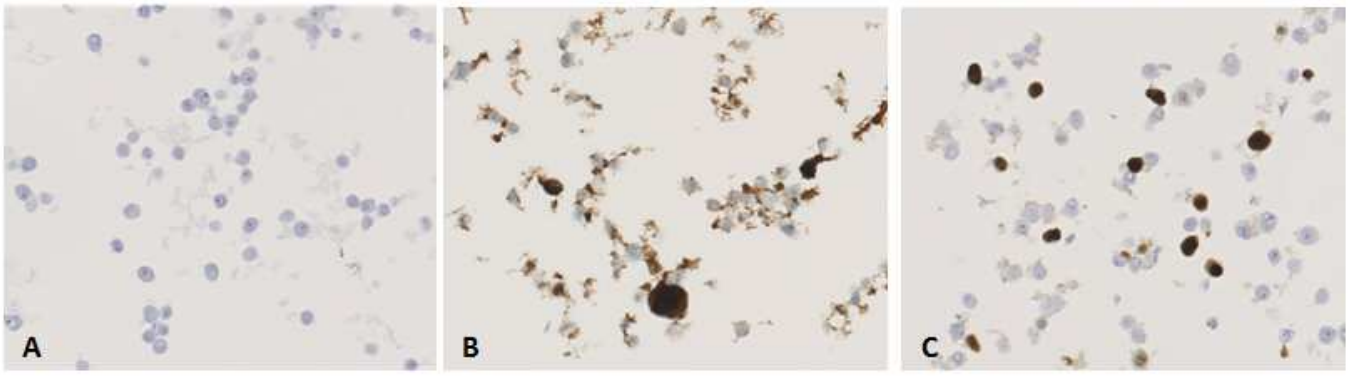


***Figure 21. Comparaison du marquage du LTAg du BKPyV par l'anticorps commercial anti-LTAg du SV40 et par l'anticorps anti-LTAg du BKPyV clone 8B4 en immuno-cytochimie***

***A :****Cellules Vero non transfectées marquées avec l'anticorps anti-LTAg du BKPyV clone 8B4*

***B** : Cellules Vero transfectées LTAg/stAg du BKPyV marquées avec l'anticoprps anti LTAg du SV40.* ***C :*** *Cellules Vero transfectées LTAg/stAg du BKPyV marquées avec l'anticoprps anti-LTAg du BKPyV clone 8B4.*

*Un marquage nucléaire net avec très peu de marquage non spécifique est constaté avec l'anticorps anti-LTAg du BKPyV. A l'inverse , un important marquage cytoplasmique est observé avec l'anticorps anti- LTAg du SV40.*

Dans un second temps, cet anticorps a été évalué sur la cohorte de patient avec néphropathie à BKPyV et comparer avec l'anticorps commercial qui avait été réalisé de façon systématique au moment du diagnostic.

La positivité de la virémie au delà du seuil de détection, témoin d'une réplication active du BKPyV, au moment de la biopsie ou dans une période rapprochée avant celle-ci (inférieure à 6 semaines) a été prise en référence .

Des exemples de marquages positifs avec notre anticorps sont présentés dans la **Figure 22**

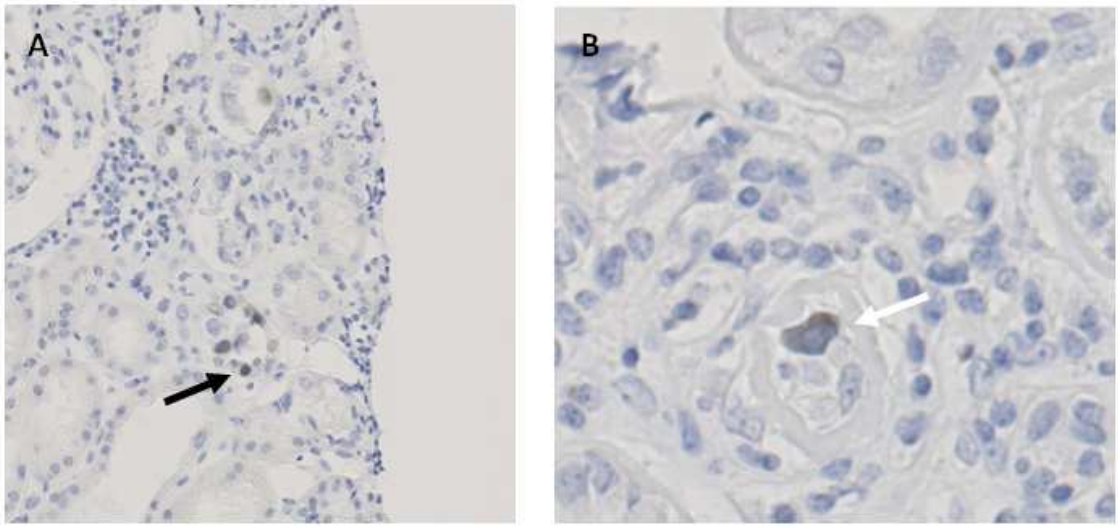


***Figure 22 : Exemples de marquages positifs en immuno-histochimie avec l'anticorps anti-LTAg clone 8B4***

*Nombreux noyaux marqués au sein d'un même tubule-flèche noire-microscopie optique x200 (A). Volumineux noyau de cellule tubulaire marqué-flèche blanche-microscopie optique x400 (B)*

Dans notre cohorte de patients, sur 10 cas avec une virémie positive, 4 présentaient un immuno-marquage positif avec notre anticorps. La sensibilité de ce dernier a détecter la présence du LTAg était donc de 0,4. Sur les 6 cas avec une virémie indétectable, 5 cas étaient négatifs en immuno-histochimie, la spécificité était donc de 0,83.

En compraison, la Sensibilité de l'anticorps commercial était de 0,8 et la Spécificité de 0,5.

# 6. DISCUSSION

## 6.1 Le complexe SMC5/6 interagit avec le BKPyV *in vitro*

A l'instar d'autres virus à ADN (HBV, HPV, HSV, HHV8), il semble que le BKPyV interagisse avec SMC5/6. Une diminution de SMC6 dans des cellules Vero infectées avec le BKPyV ou transfectées avec les deux protéines précoces LTAg/stAg du BKPyV a été montrée. La présence d'une bande intense à 35 kDa retrouvée dans les cellules infectées avec le BKPyV ou transfectées LTAg/stAg et beaucoup plus faiblement présente dans les cellules non infectées ou non transfectées pourrait suggérer qu'il s'agit d'un produit de dégradation de

SMC6 conservant l'épitope ciblé par l'anticorps anti-SMC6 et que cette dégradation existe physiologiquement et serait renforcée par l'infection et plus spécifiquement par LTAg et stAg. A la vue des données d'interactomique proximale, il semble que seule LTAg interagisse avec le complexe SMC5/6, il serait donc intéressant de réitérer l'évaluation de SMC6 en immuno-empreinte avec des plasmides codant indépendamment LTAg et stAg.
Les conséquences de cette interaction entre le complexe SMC5/6 et le LTAg sur la réplication virale n'ont pas pu être évaluées lors de ce travail. En effet à la suite de problèmes de constructions, nous n'avons pas réussi à mettre au point des shARN inhibant l'expression des protéines de ce complexe. Les constructions ont été très récemment obtenues. Il serait intéressant de réaliser cette inhibition et de quantifier la réplication virale avec ce complexe sous-exprimé. A l'inverse, il serait également intéressant de surexprimer ce complexe afin d'observer la potentielle restriction de la réplication du BKPyV. Cette surexpression pourrait être réalisée par utilisation de vecteurs lentiviraux comme réalisé dans les travaux portant sur HHV8 [62].

La confirmation de l'interaction du LTAg avec les protéines du complexe SMC5/6 devrait être réalisée par une méthode orthologue d'interactomique comme la co-immunoprécipitation. Faire la preuve d'une interaction entre les protéines du complexe SMC5/6 et l'ADN viral par CHIP permettrait également de montrer que le complexe SMC5/6 interagit bien avec le génome du BKPyV et pourrait donc bien constituer un facteur limitant potentiel de la réplication virale.

Seules des modulations de l'expression de la protéine SMC6 et non pas des protéines du complexe dans son ensemble on pu être mises en évidence. L'utilisation d'un anticorps plus sensible ciblant SMC5 aurait un intérêt et de façon plus globale la réitération de l'ensemble des expériences réalisées avec mesure de l'expression des autres protéines du complexe SMC5/6 pourrait pallier ce manque.
Il a cependant déjà été démontré dans un article qu'au sein d'une lignée cellulaire *knock-out* pour SMC5, les protéines SMC6 et NSMCE2 étaient également sous-exprimée [63] ce qui suggère que les protéines ne sont stables que lorsqu'elles sont organisées sous la forme de complexe.

L'observation d'une réduction de la présence de SMC6 en présence des protéines précoces du BKPyV et la présence de bandes immunoréactives de plus faible masse moléculaire laisse

penser à une dégradation de SMC6, comme observé chez l'HBV [56]. Cette dégradation passe par une interaction entre le complexe SMC5/6 et HBx qui recrute l'E3 ubiquitine-protéine ligase DDB1 et conduit à une dégradation du complexe SMC5/6 en passant par la voie du protéasome.

D'après les données d'interatomiques proximales réalisées, le LTAg interagit également avec RNF 169, une E3 ubiquitine-ligase. Il est donc possible d'imaginer un mécanisme de dégradation similaire à celui observé au cours des infections par l'HBV. Pour confirmer que le mécanisme de dégradation passe bien par l'E3 ubiquitine ligase et la voie du protéasome, la réalisation de shRNA ciblant cette ubiquitine ligase et l'utilisation d'inhibiteur du protéasome comme le MG132 pourrait répondre à cette question.

De même, pour HHV8, il a été démontré que RTA (*Replication and Transcription Activator*), une protéine virale possédant, entre autre, une activité ubiquitine E3 ligase, interagissait avec SMC5/6 et entrainait son ubiquitinylation et sa dégradation par la voie du protéasome [62]. L'acétylation du résidu lysine en position N-terminale 27 de la protéine histone H3 (H3K27ac) est associé à une transcription plus importante lorsque celle-ci est présente au niveau des promoteurs de gènes. Dans ce même article, les auteurs ont démontré qu'une surexpression de SMC6 entrainait une diminution de H3K27ac au niveau des promoteurs de plusieurs gène, dont RTA alors qu'à l'inverse une diminution de l'expression de SMC5 et SMC6 par shARN entrainait une augmentation de l'H3K27ac au niveau de ces mêmes promoteurs.

En entrainant la dégradation du complexe SMC5/6, l'HHV8 *via* sa protéine RTA permet donc une surexpression de plusieurs gènes, dont le gène codant la protéine RTA elle-même qui possède une activité d'échappement à l'immunité innée en entrainant la dégradation par la voie du protéasome de plusieurs protéines impliquées activatrices du système immunitaire comme IRF7, MyD88, TRIF, NF-κB, et HLA-DRα.

Il est donc envisageable que SMC5/6 interagisse de manière similaire avec le LTAg du BKPyV : en entrainant la dégradation de SMC5/6 par interaction avec celui-ci et recrutement de RNF69, le LTAg pourrait augmenter H3K27ac au niveau de promoteurs des gènes du BKPyV, dont le LTAg lui-même qui comme décrit en introduction possède un rôle fondamental pour l'initiation de la réplication virale. A ce titre il serait donc intéressant d'évaluer le statut H3K27ac de différents promoteurs de gène du BKPyV après surexpression ou inhibition de SMC5/6.

NSE2, l'une des sous-unités du complexe a une activité SUMO-ligase jouant un rôle important dans la réparation de l'ADN [36]. La sumoylation est une modification post-traductionnelle proche de l'ubiquitinylation dans son mécanisme d'action mais qui présente un effet inverse et conduit à la stabilité des protéines ayant subi cette modification. Une des hypothèses pouvant être suggérée est que l'LTAg cible NSE2 et empêche la sumoylation des protéines du complexe SMC5/6 qui perdrait alors leur stabilité et seraient dégradées. Cependant, la sumoylation est un mécanisme complexe et il a été montré qu'une complémentarité existe parfois entre sumoylation et ubiquitinylation où l'étape de sumoylation peut servir de signal alternatif pour la dégradation d'une protéine par la voie du protéasome comme c'est le cas pour HIF1-α (Hypoxia inductible Factor 1-α) en condition d'hypoxie [64].

Un article récent a montré que le complexe SMC5/6 interagissait avec les séquences non-intégrées du VIH-1 via la protéine SLF2 (*SMC5-SMC6 complex localization factor protein 2*), compacte cet ADN et empêche son expression [60]. Selon les travaux d'interactomique réalisés, SLF2 fait partie des protéines interagissant avec le LTAg, suggérant ainsi que le LTAg empêcherait l'interaction entre le complexe SMC5/6 et l'ADN viral en inhibant l'action de SLF2. Bloquer l'action de SLF2 et mesurer l'effet sur la réplication virale serait donc également d'un grand intérêt.

## **6.2** *Impact du BKPyV sur le complexe SMC5/6 in vivo*

A l'instar de l'étude en immuno-empreinte de SMC6, il semble y avoir une diminution d'expression de SMC5 sur du matériel de ponction-biopsie rénale. En effet, plus la virémie était élevée, plus l'expression de SMC5 était diminuée. Néammoins, cette différence n'était pas statistiquement significative. La créatininémie est le reflet de la fonction rénale. Son augmentation témoigne d'une dysfonction du rein mais n'est toutefois pas spécifique d'une néphropathie à BKPyV. Plus la créatininémie était élevée, plus l'expression de SMC5 était diminuée, avec là encore une absence de significativité statistique. Cette absence de significativité statistique peut s'expliquer par le faible nombre de cas (16 biopsies). Réaliser ce marquage immuno-histochimique sur un nombre de cas plus élevé et avec une cohorte de cas témoins non infectés également plus élevée pourrait donc être intéressant.

Une des difficultés d'interprétation de cet immuno-marquage consiste dans le fait qu'il ne s'agit pas d'une extinction d'expression mais bien d'une diminution, comme ce que nous observions *in vitro* dans cadre de l'infection ou de la transfections des gènes codant les protéines précoces. Une quantification d'une diminution est complexe en immuno-histochimie et implique une part potentiellement importante de subjectivité. De même, la complexité d'interprétation est renforcée par le fait qu'il peut exister une grande hétérogénéité d'infection au sein d'un même prélèvement avec une intrication de tubules avec des cellules présentant un effet cytopathogène et des tubules avec des cellules ne paraissant pas infectées.

De même, il n'a été retenu de quantifier l'expression de SMC5 qu'au sein de la corticale uniquement, en effet, l'expression de SMC5 apparait plus faible physiologiquement dans les noyaux des cellules tubulaires de la médullaire.

Le choix d'un système à trois catégories a été retenu pour sa facilité d'utilisation ainsi qu'une bonne reproductibilité entre les différents observateurs. Le choix de retenir un seuil supérieur à 75% permet de retenir les cas pour lesquels l'expression de SMC5 est quasiment physiologique. A l'inverse le choix de retenir une valeur inférieure à 25% permet de bien retenir les cas avec une forte diminution d'expression de SMC5. Cela a en partie pour conséquence de créer une catégorie intermédiaire représentant la majorité des cas avec une grande variation d'expression. Une façon plus précise pourrait consister en une détermination pour chaque biopsie du pourcentage d'expression conservée avec néanmoins un risque de variabilité inter-observateur plus importante étant donné la difficulté d'interprétation du marquage.

A l'instar de SMC6 en immuno-empreinte, seules des variations d'une seule des protéines du complexe SMC5/6 ont pu être mises en évidence en immuno-histochimie. Il faudrait donc réaliser des marquages immuno-histochimiques avec des anticorps ciblant les autres protéines du complexe afin de valider les observations réalisées avec SMC5.

## **6.3** Evaluation d'un anticorps anti LTAg du BKPyV en immuno-histochimie

Notre anticorps anti-LTAg du BKPyV n'a pas montré de supériorité par rapport à l'anticorps anti-LTAg du SV40 utilisé en routine avec une sensibilité moindre ne permettant pas de le

proposer pour le diagnostic en routine. Néanmoins, notre anticorps faisait preuve d'une meilleure spécificité.

Le fait que notre anticorps fonctionne pour détecter le LTAg des cellules Vero transfectées avec un plasmide codant le LTAg/stAg permet d'exclure une totale inefficacité de celui-ci. Cependant, la quantité d'antigène exprimée par une cellule transfectée avec ce type de plasmide possédant un promoteur puissant (CMV) est très importante comparée à une infection « naturelle » par le BKPyV. Un argument supplémentaire allant en ce sens est le marquage également très intense de très nombreuses cellules par l'anticorps commercial sur les mêmes cellules Vero transfectées alors qu'il existe un marquage de très rares cellules sur le matériel de biopsie de patients infectés.

Ces cellules Vero ayant été fixées dans les mêmes conditions que le sont les ponctions-biopsies rénales de patients permet également d'exclure une diminution de l'antigénicité par l'étape de fixation en AFA .

Cette difficulté à marquer les noyaux de cellules infectées peut donc s'expliquer par une trop faible quantité d'antigène viral.

Une évaluation sur une plus grande cohorte pourrait être intéressante pour réévaluer la capacité de notre anticorps à détecter le BKPyV dans les néphropathies.

L'hybridome permettant la production de cet anticorps n'étant plus disponible (clone non revivifiable), les anticorps encore présents dans le surnageant de culture cellulaire de l'hybridome ont été purifiés et séquencés par clivages enzymatiques combinés à la spectrométrie de masse par la société Rapid Novor. L'anticorps est actuellement en cours de production en cellules CHO par Nicolas Aubrey (UFR des Sciences Pharmaceutiques de Tours).

# REFENCE BIBLIOGRAPHIQUES


1. Gross, L. A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **83**, 414–421 (1953).
2. Sweet, B. H. & Hilleman, M. R. The Vacuolating Virus, S.V.40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **105**, 420–427 (1960).
3. An, P., Sáenz Robles, M. T. & Pipas, J. M. Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 213–236 (2012).
4. Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V. & Hulme, B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 1253–1257 (1971).
5. Moens, U. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 1159–1160 (2017).
6. Solis, M., Gallais, F., Velay, A. & Fafi-Kremer, S. [BK-virus and pathophysiology of associated diseases]. *Virol. Montrouge Fr.* **23**, 7–22 (2019).
7. Helle, F. *et al.* Biology of the BKPyV: An Update. *Viruses* **9**, (2017).
8. Kelley, W. L. & Georgopoulos, C. The T/t common exon of simian virus 40, JC, and BK polyomavirus T antigens can functionally replace the J-domain of the Escherichia coli DnaJ molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3679–3684 (1997).
9. Harris, K. F., Christensen, J. B., Radany, E. H. & Imperiale, M. J. Novel mechanisms of E2F induction by BK virus large-T antigen: requirement of both the pRb-binding and the J domains. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1746–1756 (1998).
10. White, M. K. & Khalili, K. Interaction of retinoblastoma protein family members with large T-antigen of primate polyomaviruses. *Oncogene* **25**, 5286–5293 (2006).
11. Delbue, S., Comar, M. & Ferrante, P. Review on the relationship between human polyomaviruses-associated tumors and host immune system. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 542092 (2012).

12. Abend, J. R., Joseph, A. E., Das, D., Campbell-Cecen, D. B. & Imperiale, M. J. A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *J. Gen. Virol.* **90**, 1238–1245 (2009).
13. Pallas, D. C. *et al.* Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* **60**, 167–176 (1990).
14. Krumbholz, A., Bininda-Emonds, O. R. P., Wutzler, P. & Zell, R. Evolution of four BK virus subtypes. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **8**, 632–643 (2008).
15. Hurdiss, D. L. *et al.* New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Struct. Lond. Engl. 1993* **24**, 528–536 (2016).
16. Johannessen, M., Myhre, M. R., 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* **379**, 97–109 (2008).
17. Johannessen, M. *et al.* BKV agnoprotein interacts with α-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein, and negatively influences transport of VSVG-EGFP. *PloS One* **6**, e24489 (2011).
18. Gerits, N. *et al.* Agnoprotein of polyomavirus BK interacts with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication. *Virol. J.* **12**, (2015).
19. Bauman, Y. *et al.* An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell Host Microbe* **9**, 93–102 (2011).
20. Gosert, R. *et al.* Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J. Exp. Med.* **205**, 841–852 (2008).
21. Yang, J. F. & You, J. Regulation of Polyomavirus Transcription by Viral and Cellular Factors. *Viruses* **12**, (2020).
22. Neu, U. *et al.* A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus. *PLoS Pathog.* **9**, e1003688 (2013).

23. Eash, S., Querbes, W. & Atwood, W. J. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J. Virol.* **78**, 11583–11590 (2004).
24. Moriyama, T. & Sorokin, A. Intracellular trafficking pathway of BK Virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology* **371**, 336–349 (2008).
25. Zhao, L. & Imperiale, M. J. Identification of Rab18 as an Essential Host Factor for BK Polyomavirus Infection Using a Whole-Genome RNA Interference Screen. *mSphere* **2**, (2017).
26. Jiang, M., Abend, J. R., Tsai, B. & Imperiale, M. J. Early Events during BK Virus Entry and Disassembly. *J. Virol.* **83**, 1350–1358 (2009).
27. Inoue, T. *et al.* ERdj5 Reductase Cooperates with Protein Disulfide Isomerase To Promote Simian Virus 40 Endoplasmic Reticulum Membrane Translocation. *J. Virol.* **89**, 8897–8908 (2015).
28. Bennett, S. M., Zhao, L., Bosard, C. & Imperiale, M. J. Role of a nuclear localization signal on the minor capsid proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. *Virology* **474**, 110–116 (2015).
29. Brady, J., Bolen, J. B., Radonovich, M., Salzman, N. & Khoury, G. Stimulation of simian virus 40 late gene expression by simian virus 40 tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 2040–2044 (1984).
30. Low, J., Humes, H. D., Szczypka, M. & Imperiale, M. BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro. *Virology* **323**, 182–188 (2004).
31. Evans, G. L., Caller, L. G., Foster, V. & Crump, C. M. Anion homeostasis is important for non-lytic release of BK polyomavirus from infected cells. *Open Biol.* **5**, (2015).
32. Handala, L. *et al.* BK Polyomavirus Hijacks Extracellular Vesicles for En Bloc Transmission. *J. Virol.* **94**, e01834-19 (2020).
33. Goudsmit, J., Dillen, P. W., van Strien, A. & van der Noordaa, J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J. Med. Virol.* **10**, 91–99 (1982).
34. Bofill-Mas, S., Pina, S. & Girones, R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 238–245 (2000).

35. Vanchiere, J. A. *et al.* Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2388–2391 (2009).

36. Andrews, C. A., Shah, K. V., Daniel, R. W., Hirsch, M. S. & Rubin, R. H. A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J. Infect. Dis.* **158**, 176–181 (1988).

37. Cheungpasitporn, W. *et al.* Reactivation of BK polyomavirus during pregnancy, vertical transmission, and clinical significance: A meta-analysis. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **102**, 56–62 (2018).

38. Chatterjee, M., Weyandt, T. B. & Frisque, R. J. Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *J. Med. Virol.* **60**, 353–362 (2000).

39. Bennett, S. M., Broekema, N. M. & Imperiale, M. J. BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes Infect.* **14**, 672–683 (2012).

40. Lanot, A. *et al.* [BK virus infections in kidney transplantation]. *Nephrol. Ther.* **12**, 76–85 (2016).

41. Schmidt, T. *et al.* BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **14**, 1334–1345 (2014).

42. Hirsch, H. H., Randhawa, P., & AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **13 Suppl 4**, 179–188 (2013).

43. Tummidi, S., Kothari, K., Agnihotri, M., Naik, L. & Rojekar, A. Diagnostic utility of urine cytology in detection of decoy cells in renal transplant patients: Report of five cases and review of literature. *Diagn. Cytopathol.* **48**, 222–227 (2020).

44. Nickeleit, V., Davis, V. G., Thompson, B. & Singh, H. K. The Urinary Polyomavirus-Haufen Test: A Highly Predictive Non-Invasive Biomarker to Distinguish “Presumptive” from “Definitive” Polyomavirus Nephropathy: How to Use It—When to Use It—How Does It Compare to PCR Based Assays? *Viruses* **13**, 135 (2021).

45. Sawinski, D. & Goral, S. BK virus infection: an update on diagnosis and treatment. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **30**, 209–217 (2015).
46. Leung, A. Y. H., Yuen, K.-Y. & Kwong, Y.-L. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant.* **36**, 929–937 (2005).
47. Pahari, A. & Rees, L. BK virus-associated renal problems--clinical implications. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* **18**, 743–748 (2003).
48. Alexiev, B. A. *et al.* BK virus-associated urinary bladder carcinoma in transplant recipients: report of 2 cases, review of the literature, and proposed pathogenetic model. *Hum. Pathol.* **44**, 908–917 (2013).
49. Dao, M. *et al.* BK virus-associated collecting duct carcinoma of the renal allograft in a kidney-pancreas allograft recipient. *Oncotarget* **9**, 15157–15163 (2018).
50. Gorish, B. M. T., Ournasseir, M. E. H. & Shammat, I. M. A correlation study of BK Polyoma Virus infection and prostate Cancer among Sudanese patients - immunofluorescence and molecular based case-control study. *Infect. Agent. Cancer* **14**, (2019).
51. Cantalupo, P. G., Katz, J. P. & Pipas, J. M. Viral sequences in human cancer. *Virology* **513**, 208–216 (2018).
52. Cobbe, N. & Heck, M. M. S. The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 332–347 (2004).
53. Uhlmann, F. SMC complexes: from DNA to chromosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 399–412 (2016).
54. Gibson, R. T. & Androphy, E. J. The SMC5/6 Complex Represses the Replicative Program of High-Risk Human Papillomavirus Type 31. *Pathog. Basel Switz.* **9**, (2020).
55. Bentley, P., Tan, M. J. A., McBride, A. A., White, E. A. & Howley, P. M. The SMC5/6 Complex Interacts with the Papillomavirus E2 Protein and Influences Maintenance of Viral Episomal DNA. *J. Virol.* **92**, (2018).

56. Decorsière, A. *et al.* Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* **531**, 386–389 (2016).
57. Murphy, C. M. *et al.* Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication. *Cell Rep.* **16**, 2846–2854 (2016).
58. Sekiba, K. *et al.* HBx-induced degradation of Smc5/6 complex impairs homologous recombination-mediated repair of damaged DNA. *J. Hepatol.* **76**, 53–62 (2022).
59. Xu, W. *et al.* PJA1 Coordinates with the SMC5/6 Complex To Restrict DNA Viruses and Episomal Genes in an Interferon-Independent Manner. *J. Virol.* **92**, (2018).
60. Dupont, L. *et al.* The SMC5/6 complex compacts and silences unintegrated HIV-1 DNA and is antagonized by Vpr. *Cell Host Microbe* **29**, 792-805.e6 (2021).
61. Gong, X., Tian, X., Xie, H. & Li, Z. The structural maintenance of chromosomes 5 is a possible biomarker for individualized treatment of colorectal cancer. *Cancer Med.* (2022) doi:10.1002/cam4.5074.
62. Han, C. *et al.* KSHV RTA antagonizes SMC5/6 complex-induced viral chromatin compaction by hijacking the ubiquitin-proteasome system. *PLoS Pathog.* **18**, e1010744 (2022).
63. Hwang, G., Verver, D. E., Handel, M. A., Hamer, G. & Jordan, P. W. Depletion of SMC5/6 sensitizes male germ cells to DNA damage. *Mol. Biol. Cell* **29**, 3003–3016 (2018).
64. Cheng, J., Kang, X., Zhang, S. & Yeh, E. T. H. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* **131**, 584–595 (2007).

**Vu, le Directeur de Thèse**

**Vu, le Doyen**
**De la Faculté de Médecine de Tours**
**Tours, le**

POUILLOT William

63 pages – 2 tableaux – 22 figures – 64 références

**Résumé :** Le polyomavirus BK (BKPyV) est un virus ubiquitaire dont la séroprévalence dans la population générale est de 90%. Il induit chez les patients transplantés rénaux une néphropathie tubulo-interstitielle pouvant conduire à une perte du greffon. Il n'existe pas de molécule approuvée pour le traitement de cette pathologie et la prise en charge consiste en une diminution du traitement immunosuppresseur.
L'un des objectifs de ce travail était d'identifier des facteurs limitant la réplication virale. Le complexe SMC5/6 a déjà été identifié comme facteur de restriction virale dans d'autres virus à ADN (VHB, HPV, HSV) ainsi que le VIH. De manière intéressante, des expériences d'interactomique proximale ont permis de montrer l'interaction de l'AgT du BKPyV avec ce complexe. Une évaluation par immuno-empreinte a montré une diminution de 50% de l'expression de SMC6 dans des cellules Vero, cellules de rein de singe vert, infectées avec le BKPyV ou exprimant de façon transitoire les protéines virales précoces (LTAg et stAg).
L'autre objectif de ce travail était d'évaluer l'expression *in vivo* chez des patients atteints de néphropathie à BKPyV à partir de matériel de biopsie rénale. L'évaluation de l'expression par immuno-histochimie de SMC5 a été évaluée sur seize biopsies rénales issues de quinze patients suivis au CHRU de Tours et pour lesquels une néphropathie à BKPyV était affirmée ou fortement suspectée. Pour évaluer l'expression de SMC5, un système à trois catégories a été proposé (>75% d'expression normale, 75-25% d'expression normale et <25% d'expression normale). Les virémies moyennes de ces trois groupes étaient bien corrélées au niveau d'expression : plus l'expression était diminuée, plus la virémie était haute, sans que ces différences soient néanmoins statistiquement significatives.
L'anticorps utilisé en immuno-histochimie en pratique courante pour affirmer l'implication du virus BK dans une néphropathie, dirigé contre le LTAg du SV40 étant parfois négatif sur des biopsies montrant pourtant des effets cytopathogènes et chez des patients avec une virémie positive, nous avons voulu, afin de disposer d'un outil diagnostique efficace, évaluer un anticorps dirigé contre le LTAg du BKPyV disponible au laboratoire (clone 8B4) et ayant montré son efficacité en immuno-empreinte et en immuno-fluorescence. Cet anticorps n'a cependant pas montré une efficacité supérieure à l'anticorps utilisé en routine.

**Mots clés : Polyomavirus BK, transplantation rénale, néphropathie tubulo-interstitielle, complexe SMC5/6, antigène T, immuno-histochimie.**

## Jury :

| | |
|---|---|
| Président du Jury : | Professeur Serge GUYETANT |
| Directeur de thèse : | Professeur Antoine TOUZE |
| Membres du Jury : | Docteur Marie-Christine MACHET |
| | Docteur Elodie STANDLEY-MIQUELESTORENA |
| | Docteur Thibault KERVARREC |

Date de soutenance : 06 octobre 2022